

【公開版】

平成29年度  
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業  
戦略的基盤技術高度化支援事業

「希少糖D-アロースの大量生産技術の確立とその応用技術の開発」

研究開発成果等報告書

平成30年5月

担当局 近畿経済産業局  
補助事業者 公益財団法人かがわ産業支援財団

## 目 次

第1章 研究開発の概要	・・・・・・・・3
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	・・・・・・・・3
1-2 研究体制	・・・・・・・・5
1-3 成果概要	・・・・・・・・7
1-4 当該研究開発の連絡窓口	・・・・・・・・7
第2章 本論	・・・・・・・・8
2-1 D-アロース生成酵素の活性向上	・・・・・・・・8
2-1-1 既存酵素：遺伝子組換による酵素活性の向上	・・・・・・・・8
2-1-2 新規酵素：新規なD-アロース生成酵素産生微生物の選抜	・・・・・・・・8
2-2 D-アロースの効率的な連続生産性システムの開発	・・・・・・・・8
2-2-1 酵素反応の検討	・・・・・・・・8
2-2-2 D-アロースの高純度化及び結晶化の条件検討	・・・・・・・・10
2-2-3 パイロットプラントの構築	・・・・・・・・10
2-3 D-アロースの安全性確認	・・・・・・・・10
2-3-1 培養細胞及びラットを用いた安全性確認	・・・・・・・・11
2-3-2 ヒトによる安全性試験	・・・・・・・・11
2-3-3 食経験の調査	・・・・・・・・12
第3章 全体総括	・・・・・・・・12

## 第1章 研究開発の概要

### 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

#### (1) 研究開発の背景

健康志向の世情と相まって、対症療法ではなく根源からの改善ができ、治癒すれば継続摂取の必要がなくなり、降圧薬非服薬者のみならず降圧薬服薬者にも利用可能な高血圧改善を目的とした食品素材が求められている。このニーズに応えるため、本事業では高血圧改善効果を有するカロリーゼロの希少糖D-アロースを高効率酵素反応技術により、低コストで大量生産可能な技術を確認し、食品素材として活用可能な応用技術を開発する。従来技術と新技術の比較を図1に示す。

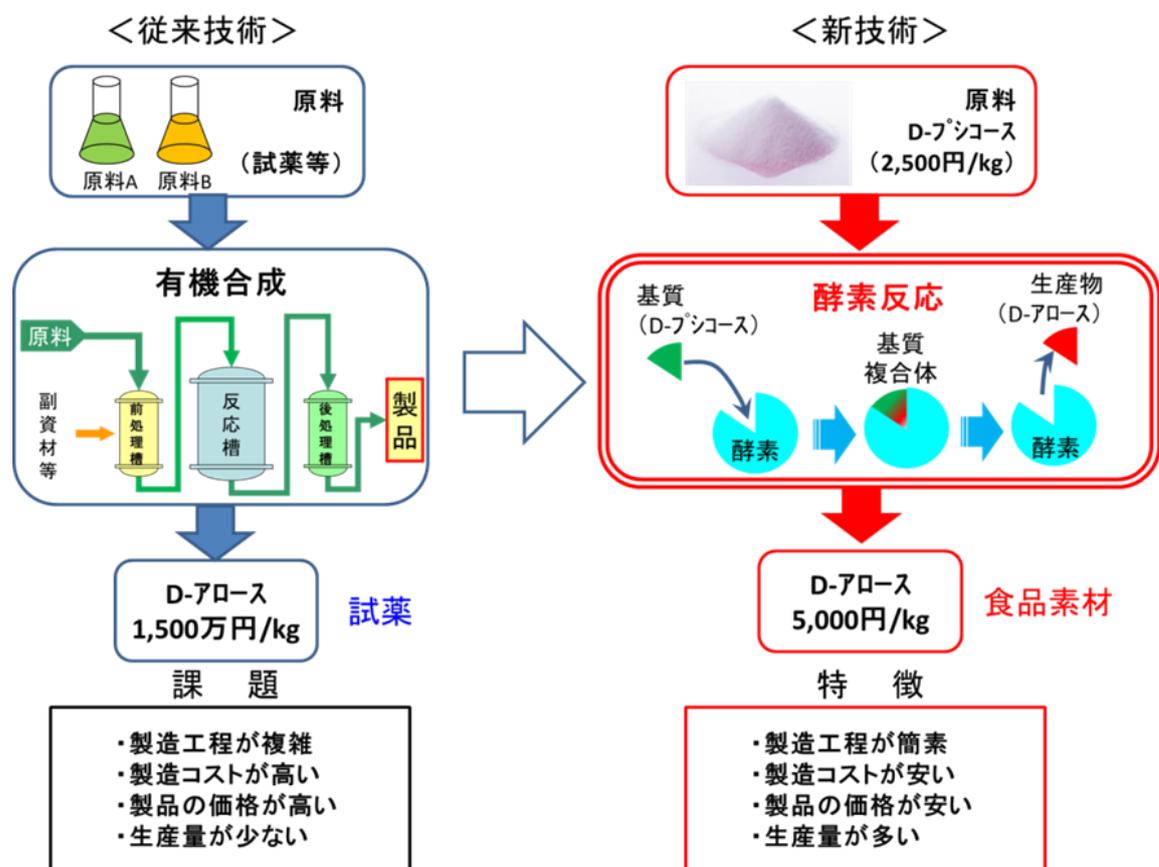


図1 従来技術と新技術の比較

#### (2) 研究目的及び目標

従来技術の課題を解決し目的とする新技術を開発するためには、原料からD-アロースを生成するための酵素反応の効率を高める、すなわちD-アロース生成酵素の活性向上による酵素コストの削減、D-アロースを効率的かつ連続的に生産するシステムの開発による生産コストの削減、及びD-アロースを食品素材として用いるための安全性確認が研究課題となる。

酵素コストの削減については既存酵素の改良と新規酵素の選抜の2つのアプローチから検討を行うこととした。生産コスト削減については連続的な酵素反応の検討、D-ア

## 【公開版】

ロースの高純度化及び結晶の条件検討、パイロットプラントの構築に取り組むこととした。なお、この検討ではコスト以外の項目としてD-アロースの純度を高める検討及び研究開発に必要な量のD-アロースを生産する検討についても実施することとした。安全性確認については培養細胞及びラットを用いた安全性確認、ヒトによる安全性試験、食経験の調査を実施することとした。

以上を踏まえ、本研究開発の高度化目標は次のとおりとした。

### 高度化目標

- D-アロース生成酵素の活性向上 : 既存の酵素と比較して5倍以上
- パイロットプラントの構築 : D-アロースの年間生産量 300kg
- D-アロースの純度 : 95%以上
- D-アロースの販売価格 : 5,000 円/kg以下

## 1-2 研究体制

### (1) 研究組織・管理体制、協力者

2011年、松谷化学工業株式会社の研究と取組によって、D-グルコースやD-フラクトースをベースとしたシロップ中に、D-プシコースやD-アロースなどの希少糖が15%程度含まれる「希少糖含有シロップ」が商品化され、希少糖が事業化された。その成果に伴い、香川大学発ベンチャー企業として、株式会社希少糖生産技術研究所や株式会社レアスウィートが設立され、香川大学や香川県、民間企業との連携が進み、香川県発の希少糖産業が形成された。これらの経緯から、公益財団法人かがわ産業支援財団を事業管理機関とし、松谷化学工業株式会社、香川大学及び香川県産業技術センターが研究実施機関となり研究開発に取り組むこととした（図2）。

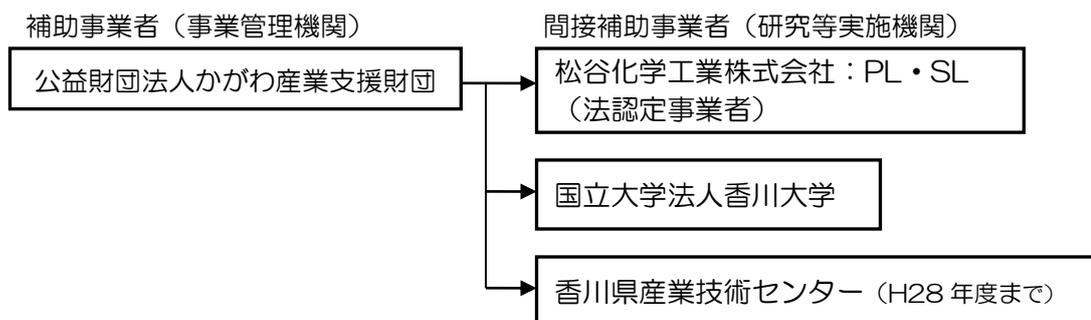


図2 研究開発の実施体制

## (2) 管理員、研究員及び補助員

管理員、研究員及び補助員は表1のとおりである。

表1 管理員、研究員及び補助員

## 【管理員】

公益財団法人かがわ産業支援財団

氏名	所属・役職
今雪 良智	技術振興部・参与（兼）技術振興部長 （平成29年4月～）
森 敏樹	技術振興部・参与（兼）技術振興部長 （平成27年9月～平成29年3月）
佐藤 恵子	技術振興部産学官連携推進課・専門員

## 【研究員】

松谷化学工業株式会社

氏名	所属・役職
山田 晃士（PL）	研究所・取締役研究所所長 （平成28年4月～）
大隈 一裕（PL）	研究所・専務取締役研究所所長 （平成27年9月～平成28年3月）
菅野 祥三	希少糖事業本部・希少糖事業推進室長
勝田 康夫	研究所第一部・部長
島田 研作（SL）	研究所第一部4グループ・主任研究員
ブシュパ キラン グラッパリ	研究所第一部4グループ・副主任研究員
新谷 知也	研究所第一部3グループ・主査研究員
大谷 耕平	研究所第一部4グループ・副主任研究員 香川大学農学部（協力研究員）
香月 和敬	研究所第一部4グループ・研究員 （平成28年11月～）
ホセイン・アクラム	研究所第一部3グループ・副主任研究員 香川大学医学部（協力研究員）
飯田 哲郎	研究所第一部3グループ・主任研究員
岸本 由香	研究所第一部2グループ・主任研究員
山田 貴子	研究所第一部2グループ・主査研究員
田中 美涼	研究所第一部3グループ・研究員
西岡 純一郎	研究所第一部3グループ・主査研究員 （平成27年9月～平成28年11月）
高岡 晴造	研究所第一部・部長代理 （平成27年9月～平成29年8月）

## 国立大学法人香川大学 農学部

氏名	所属・役職
秋光 和也	香川大学農学部・教授
何森 健	香川大学農学部・研究顧問
吉原 明秀	香川大学国際希少糖研究教育機構・准教授
神鳥 成弘	香川大学総合生命科学研究センター・教授
吉田 裕美	香川大学総合生命科学研究センター・准教授

## 国立大学法人香川大学 医学部

氏名	所属・役職
徳田 雅明	香川大学医学部・教授
山口 文徳	香川大学医学部・准教授
神鳥 和代	香川大学医学部・助教
塚本 郁子	香川大学医学部・客員教授
董 有毅	香川大学医学部・助教
広瀬 加容子	香川大学医学部・技術補佐員

## 香川県産業技術センター

氏名	所属・役職
佃 昭	所長（平成29年4月～平成30年3月）
濱中 忠勝	所長（平成27年9月～平成29年3月）
稲津 忠雄	食品研究所・主席研究員
藤井 玲子	食品研究所（平成28年9月～平成29年3月）
竹内 ちひろ	食品研究所（平成27年9月～平成28年8月）

### 1-3 成果概要

本研究開発に係る3年間の成果をまとめると表2のとおりである。

表2 成果のまとめ

最終目標値	実施機関	研究成果
D-アロース生成酵素の活性向上： 既存の酵素から5倍以上	松谷化学工業 香川大学農学部	酵素活性が2.5倍に向上 固定化酵素のD-アロース生産量が3倍に向上 以上の結果は固定化酵素のコスト削減効果として酵素活性5倍以上に相当
パイロットプラントの構築： D-アロースの年間生産量 300kg	松谷化学工業	年間300kgを生産できるプラントを構築 工場設営のための準備を整えた
D-アロースの純度： 95%以上	松谷化学工業	純度95%以上に向上
D-アロースの販売価格： 5,000円/kg以下	松谷化学工業 香川大学農学部	5,000円/kgに低減
D-アロースの安全性評価： 特定保健用食品制度に準じた 安全性確認	松谷化学工業 香川大学医学部 香川県産業技術 センター	ヒトが長期間摂取しても臨床問題なし ヒトの血圧低減及び酸化ストレス低減効果を確認 血圧低減効果の機序の一つを解明 市販の菓子類からD-アロースを検出 以上のとおり特定保健用食品制度に準じた安全性を確認

### 1-4 当該研究開発の連絡窓口

松谷化学工業株式会社 担当：研究所 主任研究員 島田研作

電話：072-771-2032 FAX：072-771-2023

メール：kensaku-shimada@matsutani.co.jp

## 第2章 本論

「第1章 1-1 (2) 研究目的及び目標」に記載した通り、今回我々は、D-アロース生成酵素の活性向上による酵素コストの削減、D-アロースを効率的かつ連続的に生産するシステムの開発による生産コストの削減、及び D-アロースを食品素材として用いるための安全性確認について検討した。

酵素コストの削減、生産コストの削減及び安全性確認に関する検討結果について、それぞれ「2-1 D-アロース生成酵素の活性向上」、「2-2 D-アロースの効率的な連続生産システムの開発」及び「2-3 D-アロースの安全性確認」に記載する。

### 2-1 D-アロース生成酵素の活性向上

#### 2-1-1 既存酵素：遺伝子組換えによる酵素活性の向上

##### <松谷化学工業・香川大学農学部>

大腸菌を宿主とした遺伝子組換え酵素である既存酵素について培養液当たりの酵素活性を向上させるために培地組成及び遺伝子発現誘導条件（OD、温度）等を最適化した（図3）。その結果、培養液当たりの酵素活性を2倍に向上させることができた。

既存酵素についてX線立体構造解析を実施し、構造を決定した。この構造情報をもとに変異を導入すると酵素活性が向上すると考えられる部位（特定のアミノ酸あるいはアミノ酸配列）を推定し、その変異を導入して酵素活性の向上を試みた。その結果、酵素活性が1.2倍と1.5倍、耐熱化指数（高いほど酵素の耐熱性が高いことが予想される）が1.3倍と2倍の2種類の有望な変異酵素を得ることができた。

また、別の変異導入方法としてランダムに変異を導入して酵素活性の向上を試みた結果、酵素活性は1/2であるものの、耐熱化指数が2倍の1種類の有望な変異酵素を得ることができた。これらの有望な酵素は後述する「2-2-1 (3) 酵素を固定化する固定化担体の選定」の評価対象とした。



図3 試験に用いた微生物培養槽

#### 2-1-2 新規酵素：新規なD-アロース生成酵素産生微生物の選抜

##### <香川大学農学部>

新規酵素の選抜を試みた結果、既存の酵素よりも高い活性を示す9菌株を得ることができた。この9菌株の遺伝子からD-アロース生成酵素遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主として遺伝子組換え酵素を調製して活性と耐熱化指数を評価した。その結果、9酵素のうち2酵素は既存酵素と比べて酵素活性が2倍と2.5倍、耐熱化指数が4.7倍と4.8倍であり、有望な酵素であった。これらの有望な酵素は後述する「2-2-1 (3) 酵素を固定化する固定化担体の選定」の評価対象とした。

### 2-2 D-アロースの効率的な連続生産システムの開発

#### 2-2-1 酵素反応の検討 <松谷化学工業>

既存酵素を対象に酵素反応について（1）D-アロース生成酵素産生微生物の大量培養条件の最適化、（2）酵素の抽出及び精製条件の確立、（3）酵素を固定化する固定化担体の選定、（4）固定化酵素の評価、の4項目を検討した。

(1) D-アロース生成酵素産生微生物の大量培養条件の最適化

D-アロース生成酵素産生微生物は10Lのジャーファーメンターでも培養液当たりの酵素活性は同等であり、問題なく培養できることを確認し、後述するパイロットスケールでの生産を可能とした。

(2) 酵素の抽出及び精製条件の確立

菌体を分解する酵素を用いた酵素抽出法を検討し、従来のミル破碎抽出法に比べて酵素活性ベースの歩留まりを1.3倍に向上させることができた。酵素抽出法は、破碎設備を導入しなければならないミル破碎抽出法に比べて設備導入費分のプラントコストを抑えるメリットもあると考えられた。

(3) 酵素を固定化する固定化担体の選定

D-アロース生成酵素は担体に吸着させて固定化酵素とすることができる。固定化酵素は反応塔に充填されて連続的な酵素反応に利用できる。また、連続的な酵素反応において活性の低下が緩慢な固定化酵素は酵素コストが低いと想定される。そこで既存酵素を対象に、種々の固定化担体を網羅的に検討し、担体へ酵素が吸着する量が多かつ活性の低下が緩慢な固定化酵素の開発を試みた。活性の低下が緩慢な固定化酵素の指標は熱処理前後の固定化酵素の残存活性とした。その結果、吸着量が多かつ残存活性が高い数種類の固定化担体を選定することができた。

また、2-1-1及び2-1-2で得られた有望な酵素を対象に同様の検討を実施し、3種類の変異酵素のうち1種類、2種類の新規酵素のうち1種類において、吸着量及び残存活性が既存酵素に比べて同等か高いことを確認した。

これらの固定化酵素は後述する「2-2-1(4)固定化酵素の評価」の評価対象とした。

(4) 固定化酵素の評価

固定化酵素は固定化酵素単位容積当たりのD-アロース生成量で評価することができる。また、このD-アロース生成量からD-アロース生産にかかる固定化酵素コストを算出できる。そこで、実生産に即した連続反応による固定化酵素の評価系を構築した。この評価系は固定化酵素を反応塔に充填し、ポンプを用いて連続的に基質を供給し、反応液をHPLC分析に供し、生成したD-アロース量を確認するものである。

本評価系を用いて「2-2-1(3)酵素を固定化する固定化担体の選定」で評価が高かった固定化酵素を評価した結果、変異酵素を新たな担体に固定化した固定化酵素のD-アロース生成量が、既存の固定化酵素のおよそ3倍に向上したことを確認した(図4)。

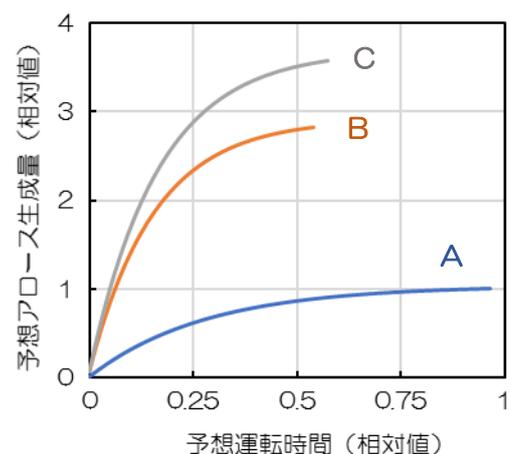


図4 予想D-アロース生成量

A: 既存酵素と既存担体 (既存の固定化酵素)  
 B: 既存酵素と新たな担体  
 C: 変異酵素と新たな担体

## 【公開版】

以上の「2-1 D-アロース生成酵素の活性向上」及び「2-2 D-アロースの効率的な連続生産システムの開発」のデータをもとに固定化酵素コストを試算したところ（コスト試算は秘密情報につき非開示）、D-アロースの販売価格が目標の 5000 円/kg に低減できることを確認した。

### 2-2-2 D-アロースの高純度化及び結晶化の条件検討 <松谷化学工業>

平成 27 年度は、本事業で導入した疑似移動層クロマト分離装置を用いて D-アロースと D-プシコースを含む酵素反応液から D-アロースのみを連続的にクロマト分離する運転条件を最適化した。また、既存の晶析装置を用いて純度 95%以上の結晶 D-アロースを得た（図5）。

平成 28 年度は、2L スケールの晶析装置を用いて種々の晶析条件を検討し、晶析時間を短縮、収率を 10%向上させることができた。

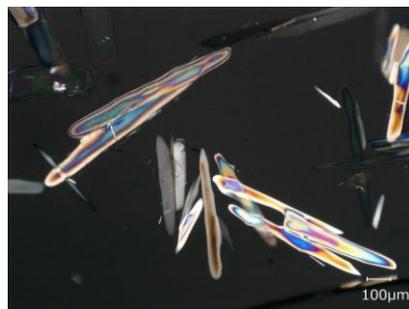


図5 結晶 D-アロース  
(偏光顕微鏡像)

### 2-2-3 パイロットプラントの構築 <松谷化学工業>

平成 27 年度にパイロットプラントを構築した。

平成 28 年度はそのプラントを用いて年間 300 kgの D-アロースの生産が可能であることを確認し、8L スケールの固定化酵素の活性データ等、工場設営のためのデータ取得を実施した。結晶化について、20L スケールでも「2-2-2 D-アロースの高純度化及び結晶化の条件検討」と同様の結果が再現され、効率的に純度 95%以上の結晶 D-アロースを製造できることを確認した。

平成 29 年度は、年間 300kg の D-アロースの安定生産を実現し、固定化酵素の生産性、イオン交換による酵素反応液の脱塩効率等の基礎データを取得し、工場設営のための準備を整えた。

### 2-3 D-アロースの安全性確認

D-アロースの食品素材としての利用には安全性確認が必須である。また、有効性とその作用機序を解明することも安全性の根拠になり得る。D-アロースについてはこれまで、ラットによる急性毒性試験及び 6 ヶ月間の反復投与試験（Biosci. Biotechnol. Biochem., 74(7), 1476-1478, 2010）やラットによる体内動態（日本栄養・食糧学会誌 第 63 巻 第 1 号 17-19 2010）等の安全性試験が実施されている。そこで今回我々は、特定保健用食品申請等の申請過程で問われると考えられる項目について培養細胞及びラットを用いた安全性試験を実施した。さらに、ヒトによる種々の安全性試験を実施した。なお、これらの試験は、D-アロースが機能性食品素材として応用可能であることを明らかにするために、「2-3-2 ヒトによる安全性試験」に記載するとおり有効性及び作用機序の解明にもつながる試験になるようデザインした。また、新規食品素材の開発にあたっては安全性試験だけでなく食経験の調査も必須であるため実施した。

### 2-3-1 培養細胞及びラットを用いた安全性確認 <香川大学医学部>

#### (1) D-アロースの体内での代謝調節作用

D-アロースを投与したラットの体内での代謝調節作用について、肝臓細胞を用いたメタボロミクス解析を実施した結果、D-アロースを肝臓細胞に投与すると、糖代謝が抑制されている可能性が示された。また肝臓の還元性（抗酸化性）を高めている結果が得られた。

#### (2) AGEs 産生への影響（AGEs は生体内の糖化反応によってできる産物で、老化や臓器障害に關与する物質といわれている。）

正常なラットに対して D-アロース 2g/kg 体重を摂取しても、AGEs は産生なし、または正常と比較して上昇しなかったため、D-アロース摂取で AGEs による障害が起こる可能性はほぼ無いことが分かった。

(1) (2) の結果より、D-アロースは、糖代謝の上では人体に悪影響を及ぼす可能性は低いことが示唆された。

#### (3) 臍帯血中の D-アロースの評価

人間の臍帯血中に D-アロースが検出され、特に難産の際に多く検出されたという報告から、ストレスとの関連性を確認するため、ラットを用いて臍帯血中の D-アロースの有無を確認したところ、D-アロースが検出された。またヒト臍帯血管内皮細胞を用いて酸化ストレスを与えた場合に、D-アロースが抗酸化的に働いていることを確認した。

### 2-3-2 ヒトによる安全性試験 <松谷化学工業>

平成 27 年度はヒトにおける D-アロースの体内動態についての検討を行った。健常成人男女 10 名に D-アロースを単回摂取させ、その際の尿中への排泄率、大腸での発酵率、エネルギー消費量を測定した。その結果、大腸での発酵率および体内でのエネルギー消費は認められず、一方で尿中への排泄率は約 70%であることが明らかとなった。これらの結果より、D-アロースは摂取後約 70%が上部消化管で吸収され、代謝を受けずに全て尿中に排泄され、吸収を逃れた約 30%は大腸において腸内細菌による発酵をほとんど受けないことが判明した。

平成 28 年度は D-アロース長期摂取時のヒトにおける安全性および血圧上昇抑制効果についての試験を実施した。試験はダブルブラインドとし、プラセボ群（D-アロース 0g/日、高甘味度甘味料で甘味調整）、低用量群（D-アロース 5g/日）、高用量群（D-アロース 15g/日）の 3 群、被験者は正常高値血圧者および I 度高血圧者とし、各群 30 名、摂取期間 12 週間とした。測定項目は安全性の指標として生化学的検査、有効性の指標として血圧、酸化ストレス指標、血管内皮機能とした。安全性について生化学的検査における異常変動の有無および有害事象の発現状況等を確認したところ、いずれの項目においても臨床上問題となる変動・事象は認められず、D-アロースの安全性が確認された。有効性について D-アロース摂取群において摂取前と比較して収縮期血圧および拡張期血圧の有意な低下が認められた。また、酸化ストレス指標に関しても D-アロース摂取群の摂取前後において有意な低下が認められた。

平成 29 年度は単回摂取時の血管内皮機能改善効果及び酸化ストレス低減効果について検討を行った。試験はダブルブラインドとし、健常男性 24 名にプラセボ飲料（グルコース 75 g）またはアロース含有飲料（グルコース 75 g+D-アロース 5 g）を早朝空腹時に摂取させ、摂取前、摂取 1 時間後および 2 時間後の血管内皮機能及び酸化ストレス指標の測定を行った。その結果、血管内皮機能については有意な差はみられなかったが、酸化ストレス指標において D-アロース摂取群でプラセボ摂取群と比較して有意な低下が確認され、D-アロースの単回摂取による酸化ストレス低減作用が示唆された。

### 2-3-3 食経験の調査

平成 27 年度に D-アロースの最適な分析条件を決定した。平成 28 年度に市販食品を用いて定量範囲、定量下限・定量上限における変動係数及び添加回収等の試験を実施し、本分析法の妥当性を確認した。次に市販食品に含まれる D-アロース含量を分析し、揚げせんべいに 5 mg/100g、クッキーでは 31 mg/100g の D-アロースが含まれることを確認した。以上より、D-アロースはヒトによる食経験があることを明らかにした。

## 第3章 全体総括

### 3-1 複数年の研究開発成果

既存酵素について、産生菌の培養条件及び抽出方法を検討して酵素活性をおよそ 2.5 倍に向上させることができた。また、遺伝子組み換えによる酵素活性の向上及び活性の低下が緩慢になる固定化酵素の担体の選定を検討して D-アロース生成量をおよそ 3 倍に向上させることができた。これらのデータをもとに固定化酵素のコストを試算したところ（コスト試算は秘密情報につき非開示）、酵素活性が 5 倍に相当するコスト削減効果を認め、目標として掲げた酵素活性が 5 倍以上を実質クリアすることができた。また、D-アロースの販売価格が 5000 円/kg に低減できることを確認し、この目標もクリアすることができた。

D-アロースの純度について、疑似移動層クロマト分離装置を用い、さらに結晶化させて純度 95%以上のものを得ることができた。

パイロットプラントを構築して D-アロースを年間 300kg 生産し、安全性試験などのサンプルに用いた。同時に 6L の固定化酵素の生産性、イオン交換樹脂による反応液の脱塩効率等のデータを取得し、工場設営のための準備を整えた。

D-アロースの安全性に係る試験で、培養細胞及びラットを用いる安全性試験において、メタボロミクス解析による代謝調節作用、AGEs 産生への影響及び臍帯血中の D-アロースの評価等の検討から D-アロースは糖代謝の上では人体に悪影響を及ぼす可能性は低いことが示唆された。ヒトにおける試験において、D-アロースの体内動態及び長期摂取時の安全性を確認することができた。また、D-アロース摂取による血圧低下作用および酸化ストレス低減作用に対する有効性を確認し、D-アロースは機能性食品素材として応用できることを明らかにした。食経験の調査において、D-アロースは揚げせんべいに 5 mg/100g、クッキーに 31 mg/100g 含まれることが確認され、食経験があることを明らかにした。

以上のことより、本事業を始める際に立案した高度化目標をすべてクリアすることができ、D-アロースを血圧低下作用や酸化ストレス低減作用を有する安全な食品素材すなわち、トクホや機能性表示食品の関与成分として上市する道筋をつけることができた。

### 3-2 研究開発後の課題

(1) 酵素の許認可

D-アロース生成酵素は食品添加物に収載されていないため、「食品添加物への指定」を厚生労働省に要請しなければならない。また、本酵素は遺伝子組換え酵素であるため、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価」を厚生労働省に要請しなければならない。

(2) D-アロースの有効性に係る本試験の実施（補完研究）

血圧トクホ向けの本試験、あるいはトクホにはない酸化ストレス低減作用等のヘルスクレームの機能性食品をターゲットとした本試験を実施しなければならない。

(3) 生産プラント設営

新たに生産プラントを設営しなければならない。

### 3-3 事業化展開

松谷化学工業株式会社、香川大学および香川県が連携し、既に上市している希少糖含有シラップの販売強化による希少糖市場の拡大及び希少糖の認知度向上を図り、香川発の希少糖をブランド化させたいと考えている。希少糖のブランド化には希少糖の機能性に係る研究及び啓蒙活動が欠かせないと認識しており、D-アロースのみならずその他希少糖の機能性について、論文、学会、展示会及びメディア等を通じて発信していく。「3-2 研究開発後の課題」に記した項目を実施してD-アロースを、上市の最終段階にある希少糖 D-プシコースの次なる希少糖としてなるべく早く上市し、希少糖市場の活性を図りたい。

以上