

プレバイオティクスとしてのガラクトオリゴ糖 (GOS) ～担子菌酵母を活用した製造プロセスとビフィズス菌による代謝～

石川英司・秋山拓哉

(株)ヤクルト本社中央研究所, 〒186-8650 東京都国立市泉5丁目11号)

Galactooligosaccharides as prebiotics: manufacturing process by basidiomycetous yeasts and its metabolism by bifidobacteria

Eiji Ishikawa, and Takuya Akiyama

Yakult Central Institute 5-11 Izumi, Kunitachi-shi, Tokyo 186-8650 Japan

要約

担子菌酵母は極めて糖転移活性の高いガラクトオリゴ糖 (galacto-oligosaccharide: GOS) 生成酵素を持っており, GOS 製造の生体触媒として有用である。担子菌酵母の1種, *Sporobolomyces singularis* を育種改良し, 微生物変換法による GOS 製造プロセスを確立した。この方法で製造された GOS は, アレルギー原因物質をほとんど含まなかった。また, *Sp. singularis* の GOS 生成酵素は高等植物由来の β -グルコシダーゼに相同性を有するタンパク質であったが, N-末端に機能未知のドメインを持つユニークな構造をしていた。

Sp. singularis を用いた微生物変換法で製造した GOS は, 4'-Galactosyl-lactose (GL), 6'-GL および 3'-GL の3糖類が主要成分であった。4'-GL, 6'-GL および 3'-GL がビフィズス菌によって代謝されるメカニズムをマイクロアレイや表面プラズモン共鳴法などを駆使して解析したところ, 各構成糖に特異的な取り込み・分解系が複数存在する事が示唆された。

担子菌酵母のガラクトオリゴ糖生成酵素やビフィズス菌 GOS 代謝酵素に関する知見は, 更なる GOS の改良に有用と考えられる。

1. はじめに

GOS は, ヒトをはじめとする哺乳動物の乳汁中に見いだされる。工業的には, 高濃度の乳糖 (ガラクトースとグルコースが β -1,4 結合した2糖) に加水分解酵素を作用させ, 糖転移反応によって2~6糖の GOS を生成させる。この GOS は, ヒトの消化酵素では消化されないが, ビフィズス菌などの腸内細菌には利用されるヒト難消化性の糖質である。したがって, 経口摂取することにより, 腸内有用菌

であるビフィズス菌の増殖を活発にすることが知られている^{1,2)}。現在 GOS は, 微生物由来の β -ガラクトシダーゼの糖転移活性を利用して工業生産されている。一方, これまでに数多くの β -ガラクトシダーゼや類似の加水分解酵素が細菌^{3,4)}や真菌^{5~8)}から単離精製されたものの, その多くは収量が低く, 工業的な GOS 生産には数種類しか用いられていない^{9,10)}。また, 特定の酵素で製造した GOS は日本国内¹¹⁾や東南アジア^{12,13)}において, アレルギーの発症が報告されており, 安心安全な GOS を製造でき

る酵素を開発することが重要である。

本稿では、前半部分にアレルギーリスクが低い GOS を製造できる担子菌酵母由来の GOS 生成酵素を取り上げ、その生化学的性質を概説する。ついで、担子菌酵母 *Sp. singularis* を利用した GOS の製造方法について述べる。後半部分では、当該プロセスで製造した GOS の主要成分のビフィズス菌による代謝について、最新の知見を紹介する。

2. 担子菌酵母のガラクトオリゴ糖 (GOS) 生成酵素の生化学的特徴

担子菌酵母に存在する細胞壁結合性で極めて糖転移活性の高い GOS 生成酵素は、古くは1960年代に、*Sp. singularis* ATCC24193 からの精製がカナダの研究者、Blakely らによって報告された¹⁴⁾。彼らは、この酵素が乳糖のみならずセロビオースにも作用することから、 β -ヘキソシダーゼと命名している。続く1990年代には、Ohtsuka らによって *Cryptococcus laurentii* OKN-4 からの GOS 生成酵素の分離精製が報告された¹⁵⁾。彼らは、当該酵素を β -ガラクトシダーゼと称した。その後、Onishi らによって類似の酵素が、*Sterigmatomyces elviae*

CBS8119¹⁶⁾、*Sirobasidium magnum* CBS6803¹⁷⁾、*Rhodotorula minuta* IFO879¹⁸⁾にも存在することが明らかにされた。彼らも、これら酵素群を当初 β -ガラクトシダーゼと称していたものの、乳糖だけでなくセロビオースにも作用する事を見だし、最終的には β -グリコシダーゼと改称した。

上記の GOS 生成酵素には、次のような共通点があり、一群の酵素と解されている。①ホモダイマー構造、②糖タンパク、③乳糖だけでなくセロビオースにも作用しオリゴ糖を生成する、④ *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONP-Gal) よりも *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNP-Glc) の方が K_m 値は小さい、⑤細胞壁に局在する、⑥至適 pH が酸性域、などである。一方で至適温度 (45~85°C) や分子量 (135,000~200,000) については、比較的多様である (表1)。また、*Cryptococcus laurentii* OKN-4 は土壌から、*Sterigmatomyces elviae* CBS8119 はベーカリーのオープン付近から、*Sirobasidium magnum* CBS6803 は腐った木材から、*Rhodotorula minuta* IFO879 は空気中から、*Sporobolomyces singularis* ATCC24193 は西洋梅に生息するニレクイムシという昆虫の糞屑から¹⁹⁾

表 1 担子菌酵母のガラクトオリゴ糖 (GOS) 生成酵素の特徴

起 源	<i>Rh. minuta</i> ¹⁸⁾	<i>Cr. laurentii</i> ¹⁵⁾	<i>St. elviae</i> ¹⁶⁾	<i>Si. magnum</i> ¹⁷⁾	<i>Sp. singularis</i> ¹⁴⁾
サブユニット	2	2	2	2	2
局在	細胞壁	細胞壁	細胞壁	細胞壁	細胞壁
等電点	4.8	5.4	4.1	3.8	5.0
分子量	144,000	200,000	170,000	135,000	146,000
糖タンパク質	○	?	○	○	○
ガラクトース転移活性	○	○	○	○	○
グルコース転移活性	○	?	?	?	○
至適 pH	4.7-5.2	4.3	4.5-5.0	4.5-5.5	3.5
pH 安定性	3.0-7.0	2.8-9.3	2.5-7.0	4.0-7.0	3.5-7.0
至適温度	70°C	60°C	85°C	65°C	45°C
温度安定性	~55°C	~57.5°C	~80°C	~65°C	~40°C
加水分解活性					
β -D-galactopyranoside	○	○	○	○	○
β -D-glucopyranoside	○	○	○	○	○
β -D-fucopyranoside	○	?	○	○	?
β -L-arabinopyranoside	○	?	○	○	?
Km 値 (mM)					
ONP-Gal	6.2	18.2	9.5	14.3	5.4
PNP-Glc	1.2	?	?	?	2.0
Lactose	2.4	11.4	2.4	5.5	?

分離されており、いずれの菌株も乳糖がほとんど存在しない環境から分離されていることも共通している。おそらくこれらの担子菌酵母に存在する GOS 生成酵素は、本来乳糖を加水分解する酵素ではなく、他の糖質や配糖体を加水分解する為に存在している（していた）と解するのが妥当であろう。

3. *Sporobolomyces (Sp.) singularis* 高力価変異株の育種

前述の通り、担子菌酵母 *Sp. singularis* は GOS 製造に好適な酵素を有しており¹⁴⁾、GOS の製法検討の報告もされている²⁰⁾。しかしながら、*Sp. singularis* が産生する GOS 生成酵素は量的に少なく、これを用いて GOS を生産するには菌体が多量に必要となる。そのため、この酵母を用いて GOS を製造した場合には、菌体由来の不純物が GOS に混入し、濁りや酵母臭が出るといった問題があった。そして、この GOS の濁りや酵母臭による品質低下を回避するためには、精密ろ過やイオン交換等の煩雑な後（あと）精製が不可欠であった。この問題を解決するには、菌体あたりの酵素活性を高める必要がある、*Sp. singularis* の高力価変異株を取得する方法が効果的と考えられた。そこで Ishikawa らは、*Sp. singularis* の 2-デオキシ D-グルコース耐性変異株をスクリーニングし、カタボライトリプレッションが解除された高力価変異株を育種した²¹⁾。この変異株では湿重量あたりの酵素活性が野生株の 8 倍であるため、添加量を著しく軽減する事が可能であった。この高力価変異株を用いて、GOS 製造用の酵母菌体濃縮液（商品名：YC-Y）が商品化され、GOS の製造プロセスで利用されている²²⁾。

4. *Sp. singularis* 高力価変異株を利用した安全な GOS の開発

GOS にはアレルギーが報告されており¹¹⁻¹³⁾、中性 4 糖である Gal β 1-4(Gal β 1-4Gal β 1-6)Glc が原因物質であることが分かっている²³⁾。*Aspergillus oryzae* (麹菌) β -ガラクトシダーゼと *Streptococcus thermophiles* β -ガラクトシダーゼの組み合わせや

Bacillus circulans の β -ガラクトシダーゼ単独で糖転移反応を行うと、Gal β 1-4(Gal β 1-4Gal β 1-6)Glc が産生され、アレルギーリスクの高い GOS が出来てしまう。

Kaneko らは、アレルギー分析に基づき、*Sp. singularis* 高力価変異株の濃縮液（前述の YC-Y）を乳糖に作用させた後に *Kluyveromyces lactis* β -ガラクトシダーゼ (GODO-YNL) を作用させるという二段階反応を行うことで、Gal β 1-4(Gal β 1-4Gal β 1-6)Glc がほとんど含まれない GOS を製造できることを見出した²³⁾。この方法で製造された GOS は既に上市されており、乳製品、清涼飲料、育児用粉乳に広く添加利用されている。

5. *Sp. singularis* の GOS 生成酵素の遺伝子

Ishikawa らは、*Sp. singularis* から GOS 生成酵素を精製し、部分アミノ酸配列から縮重プライマーを合成し、cDNA および遺伝子をクローニングした²¹⁾。*bglA* と名付けられたこの遺伝子は 18 のイントロンと 19 のエキソンから構成され、594 個のアミノ酸で構成される分子量 66.4 kDa のポリペプチド鎖をコードしていた。この酵素の推定アミノ酸配列は、高等植物由来の glycoside hydrolase family 1²⁴⁾ に属する β -グルコシダーゼに弱いながらも有意な類似性（35%の同一性）を有したが、N-末側 110 アミノ酸残基は既知タンパクに類似性を有しないユニークな配列であった。微生物由来のタンパクでは、唯一 *Candida wickerhamii* 由来の β -グルコシダーゼ²⁵⁾ がヒットしたものの、同一性は 30% 程度であり、高等植物の β -グルコシダーゼに対する類似性に比べると有意に低かった。

高等植物の β -グルコシダーゼと多重整列を行ったところ、この GOS 生成酵素の活性中心は 275 番目と 496 番目に存在する 2 つのグルタミン酸と予測された。しかし、高等植物由来の glycoside hydrolase family 1 に属する β -グルコシダーゼで保存されている活性中心付近のモチーフ²⁶⁾とは異なり、ユニークなものであった。

Dagher らは、メチトロフ酵母、*Pichia pastoris*

を用いて *Sp. singularis* の GOS 生成酵素を機能的に発現させ、GOS を製造できることを示した。興味深いことに、分泌シグナルを付与しても同酵素の組換えタンパク質の大半は細胞表層に留まったままであった²⁷⁾。

6. GOS の健康効果とその作用機作について

これまでの研究から、GOS は腸内環境改善作用^{28,29)}、便性改善^{30~32)}、ミネラル吸収促進^{33,34)}などの生理効果を有することが分かっている。以上の効果は主として、GOS が腸管内のビフィズス菌によって優先的に利用され、酢酸が活発に産生されるためと考えられている。腸管内に酢酸が蓄積されると、pH の低下ならびに酢酸分子そのものが有する抗菌効果によって、フェノール、パラクレゾールなどの腐敗産物を生成する細菌群（いわゆる悪玉菌）の活性が抑制される^{35~37)}。また pH の低下および酢酸の蓄積は、腸内環境の改善に加え、腸管蠕動運動を促進することで便性を改善する³⁸⁾。ミネラル吸収についても、pH の低下によりミネラルの溶解性が高まることで促進されると考えられている^{33,34)}。

さらに近年、GOS 分子そのものが持つ有益な生理効果についても報告がなされている。Newburg らは、複数の腸管上皮細胞由来細胞株において、GOS がサルモネラ菌や TNF- α 刺激によって誘導される NF- κ B シグナルを抑制し、その後の炎症反応を軽減させることを確認している³⁹⁾。本効果は対照として用いたセロビオースでは認められなかったことから、GOS に特徴的な性質であることが考察される。また Shoaf らは *in vitro* 試験にて、GOS が *Clostridium difficile* ならびに腸管病原性大腸菌 (EPEC) の腸管上皮細胞への吸着を阻害することを報告している⁴⁰⁾。しかしながら、こうした GOS 分子の直接的な効果が実際の腸管内でどの程度導かれるかについては、いまだ十分な検証がなされていないのが実情である。

以上をまとめると GOS は、分子そのものが有する生理効果についても一定の報告はあるものの、主としてビフィズス菌に優先的に利用され、本菌群の

酢酸産生を基調とした健康効果を導いていることが示唆される。一方、GOS が腸管内のビフィズス菌数に及ぼす効果には個人差があり、期待したビフィズス菌数の増加、いわゆる「bifidogenic 効果」が認められない被験者も存在する⁴¹⁾。本原因を解明し、個々人に最適なプレバイオティクスやシンバイオティクス（プレバイオティクスとプロバイオティクス組み合わせ）処方を検討するには、ビフィズス菌の GOS 利用メカニズムを正しく理解する必要がある。次節ではこれまでの研究から明らかになった GOS 代謝に関する知見を紹介する。

7. ビフィズス菌の GOS 利用メカニズムについて

ビフィズス菌によって取り込まれた糖質は、単糖へと分解された後、ビフィズス経路 (bifidus shunt) と呼ばれる特殊な代謝経路によって乳酸と酢酸に代謝される。一般的な解糖系として有名な「エムデン-マイヤーホフ経路」では、グルコース 1 分子あたり 2 分子の ATP が生成される一方、ビフィズス経路では、グルコース 2 分子あたり 5 分子の ATP が生成されるため^{42,43)}、1.25 倍効率が良い経路であると考えられている。ビフィズス経路における乳酸と酢酸の理論生成比は 2 : 3 であるが、本比率は菌体を取り巻く環境に応じて大きく変動する。とくにビフィズス菌は、貧栄養下において、中間代謝産物であるピルビン酸を乳酸ではなく酢酸もしくはエタノールへと変換することで、代謝を追加 ATP が確保可能な経路へと“ブースト”させることが知られている^{44~47)}。

GOS がビフィズス経路に沿って代謝されるためには、第一にオリゴ糖が単糖ユニットへと分解され、これが菌体内に取り込まれている必要がある。そのために不可欠なのが、 β -ガラクトシダーゼ (β -gal) および細胞膜上に発現する糖輸送体である。 β -gal は、GOS の還元末端に存在する乳糖 (Gal β 1-4Glc) 骨格から伸長するガラクトース残基を切断するために必要な糖分解酵素であり、高分子構造を端から順々に分解する「エキソ型」と内部から分断

する「エンド型」に大別される。一方、糖輸送体は、ATPの化学エネルギーを輸送に用いるABC (ATP-Binding Cassette) トランスポータ⁴⁸⁾と、細胞膜両側の電気化学ポテンシャル差を利用するMFS (Major Facilitator Superfamily) トランスポータ⁴⁹⁾に分類される。ビフィズス菌は複数種の糖輸送体をゲノム上にコードしており、利用する基質に応じてこれらを使い分けていることが示唆されている^{50~53)}。

GOSは代表的なプレバイオティクスの一つとして一つの名前がついているが、その構成成分は単一ではなく、糖鎖長や結合様式は様々である。こうした構造的差異を考慮してビフィズス菌のGOS利用機構を検討することが重要である。以下では*Sp. singularis*を利用して製造したGOSの主要構成糖である3糖のGOS (4'-GL, 3'-GLおよび6'-GL)を中心とし、これまでの研究から得られている知見を紹介する。

7-1 ビフィズス菌の4'-GL利用機構

Shigehisaらは*B. breve*ヤクルト株をモデル菌株とし、ビフィズス菌の4'-GL利用機構を検証している⁵⁴⁾。彼らは第一に、4'-GLを唯一の糖源とした培養条件下において、ABCトランスポータを構成する基質結合タンパク (Solute binding protein) (以降、4GL-SBP) と、その横にコードされるシグナルペプチドを有さない β -gal (以降、4GL-BG)のmRNA発現が顕著に誘導されることをマイクロアレイ解析によって明らかにした。本結果は、ビフィズス菌がABCトランスポータによって直接4'-GLを菌体内へと取り込み、これを細胞質内に誘導された4GL-BGによって単糖ユニットへと分解していることを示唆していた。

そこで彼らは各タンパクのリコンビナントタンパクを精製し、4GL-SBPと4GL-BGの基質特異性を確認することとした。第一に、4GL-SBPの基質結合性を表面プラズモン共鳴法により評価した結果、本タンパクは4'-GLに結合する一方、乳糖、3'-GLおよび6'-GLには結合しないことが明らか

となった。これは4GL-SBPが、4'-GLに対する基質特異性の高い基質結合タンパクであることを示していた。そして4GL-BGの糖分解活性も、4'-GLに対する特異性が高いものだった。本酵素は4'-GLの非還元末端に存在するGal β 1-4Gal結合を切断し、反応液中にガラクトースと乳糖を蓄積させる一方、乳糖、3'-GLおよび6'-GLに対しては殆ど分解活性を示さなかった。以上の結果は、4GL-SBPと4GL-BGが共に4'-GLの利用に特化した酵素であり、主に非還元末端に存在するGal β 1-4Gal構造を認識して作用していることを示唆していた。

一方で彼らは、本オペロンのホモログが4'-GLを資化する全てのビフィズス菌にコードされている訳ではなく、*B. bifidum*や*B. adolescentis*をはじめとする一部菌種では認められなかったことを注釈している。本事実、全てのビフィズス菌が単一のシステムを用いてGOSを利用しているのではなく、菌種 (菌株) それぞれの生存戦略に適する利用機構を活用していることを示唆している。それでもなお、*B. breve*以外のビフィズス菌種に広く保存されていた本ABCトランスポータならびに β -galは、多くのビフィズス菌の4'-GL利用に関与していることが推察される。

7-2 ビフィズス菌の3'-GLおよび6'-GL利用機構

Sotoyaらはビフィズス菌の3'-GLおよび6'-GL利用機構を詳細に検証した⁵⁵⁾。彼らは第一に、各基質を唯一の糖源とした際、前述の4'-GL利用システムとは異なる基質結合タンパク (以降、GL-SBP1) およびその上流にコードされた β -gal (以降、GL-BG) がグルコース培養時と比較して顕著に発現亢進されることに注目した。

続いて、リコンビナントタンパクを精製して各酵素の3'-GL、6'-GL、4'-GLおよび乳糖に対する活性を確認した結果、GL-BGは期待通り、3'-GLと6'-GLを乳糖とガラクトースへと特異的に分解し、乳糖と4'-GLに対する分解活性は示さなかった。一方、GL-SBP1は6'-GLを強力に吸着したも

の、3'-GLに対する活性は極めて低かった。以上の結果は、GL-BGが3'-GLと6'-GLの非還元末端の切断に寄与する一方、GL-SBP1は6'-GLの吸着にのみ寄与し、3'-GLの取り込みには異なるSBPが関与することを示唆していた。なお、GL-SBP1は4'-GLに対しても強い結合能を示したことから、本基質結合タンパクはビフィズス菌の4'-GL利用にも関与することが推察された。

そこで彼らは3'-GLに対するSBPは恒常的に発現しているとの仮説を立て、発現量が高かった遺伝子座の見直しを行った。その結果、ABCトランスポータの横にコードされた基質結合タンパク(以降、GL-SBP2)が糖源の種類に関わらず高いレベルで発現しており、かつ3'-GLに対し高い結合性を示すことが明らかとなった。GL-SBP2の3'-GLに対する結合特異性は高く、乳糖、6'-GLや4'-GLにはほとんど結合しなかったことから、本SBPはGal β 1-3Galを特異的に認識していることが推察された。

以上、GL-BG、GL-SBP1とGL-SBP2は、前述の4'-GL利用システムである4GL-SBPと4GL-BG同様、必ずしも全てのビフィズス菌に保存されているものではなかった。今後、各遺伝子座を破壊して、各遺伝子の役割を精査していく必要があるものの、上記の遺伝子座はビフィズス菌のGOS利用に一定の役割を果たしている可能性が高い。

7-3 ビフィズス菌の3糖GOSに対するその他利用機構

Akiyamaらの研究では、異なる遺伝子座の関与が示唆されている⁵⁶⁾。本研究では第一に、ビフィズス菌7菌種14菌株のGOSの3糖以上画分(GOS-P)に対する①増殖性、②嗜好性および③これを利用したときの有機酸産生(代謝能)を確認することで、ビフィズス菌間での「GOSとの相性」の差異を検証した。その結果、すべての試験ビフィズス菌がGOS-Pで増殖した一方、ビフィズス菌株によってその利用能が大きく異なることが明らかになった。具体的には、*B. adolescentis*、*B. catenulatum*や

*B. pseudocatenulatum*は他菌株と比較して①GOS-Pを迅速に利用し、②乳糖やグルコースなどの少糖類が存在している状況でも3糖GOS画分を優先的に利用した。更に、③各ビフィズス菌はGOS-P利用に伴い、少糖類を利用したときと同様、乳酸と酢酸をビフィズス経路から予測されるおよそ2:3の比率で生成した。一方、*B. breve*や*B. bifidum*をはじめとする菌株は対照的に、GOS-Pの利用能および嗜好性が低かった。加えて、少糖類資化時と異なり、乳酸の代わりに大量のギ酸産生が認められ、ビフィズス経路が貧栄養時に利用される経路へと切り替わっていることが推察された。以上の結果は、同じ*Bifidobacterium*に属する細菌であっても、3糖GOSの利用効率が大きく異なることを示していた。

続いて、特にGOSの利用能が高かった*B. adolescentis*基準株をモデルとし、GOS-Pによって誘導される遺伝子座を探索した。そして最終的にLacSシンポーターと β -galが逆方向にコードされた遺伝子座が、グルコース糖源時と比較してGOS-P糖源時に極めて顕著に発現亢進されることを見出した。興味深いことに、本LacS- β -gal遺伝子座は調査をおこなったビフィズス菌全てに保存されていた。さらに、本遺伝子座のアミノ酸配列の差異は、前述のGOS-P利用能と高い相関性を示した。GOS-Pの利用能との相関が認められたLacS- β -galもまた、ビフィズス菌によるGOS利用を決定づける一因子であることが推察される。

代表的なシンポーターであるLacSは、ラクトースとカチオン(H⁺もしくはNa⁺)を同時に菌体内に取り込む能動輸送系として見出されたトランスポータである。本トランスポータはカチオンを取り込む際に生じる電気ポテンシャルを基質の輸送に利用し、ATP分子を直接必要としない点でABCトランスポータよりエネルギー的に有利であり、かつ基質の存在に対する反応の早い輸送系であると考えられている^{57,58)}。GOSの摂取により腸管内で優位に増殖することが知られるビフィズス菌が、こうした遺伝子を普遍的に備え、取り込みの際に応答させることは理に適っているように考えられる。また

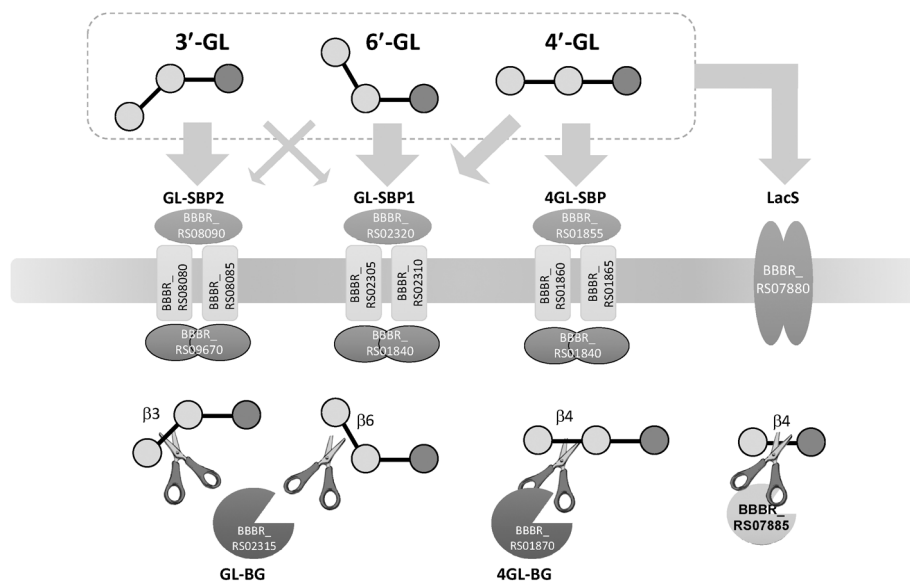


図1 *Sp. singularis* を用いて製造したガラクトオリゴ糖に対するビフィズス菌の利用機構まとめ。遺伝子 ID は *B. breve* 基準株のものを示した。

Andersen らは、*Lactobacillus acidophilus* の GOS 取り込みに LacS シンポーターが必須であることを報告している（本試験でもガラクトシルラクトースを主成分とする GOS を使用している）⁵⁸⁾。本知見からも、特に短い鎖長の GOS 利用に LacS シンポーターが重要な役割を果たしていることが推察される。

以上では、*Sp. singularis* を用いて製造した GOS を構成する比較的鎖長の短いオリゴ糖に対するビフィズス菌の利用機構を示した。図1にまとめた通り、いずれの機構においても、3糖からなるガラクトシルラクトースは菌体外で分解されることなく菌体内に取り込まれ、その後、単糖へと分解されることが示唆されている。

8. おわりに

担子菌酵母の GOS 生成酵素に関しては、酵素精製の報告は数多く存在するが、*Sp. singularis* ATCC24193 の GOS 生成酵素をコードする遺伝子 (*bglA* 遺伝子) 以外は未だ単離されていない。前述の *Cryptococcus laurentii* OKN-4, *Sterigmatomyces elviae* CBS8119, *Sirobasidium magnum* CBS6803, *Rhodotorula minuta* IFO879 などの酵素は、耐熱性や糖転移活性が異なるので、酵素的見地からもホ

モログが単離されることが望まれる。一次構造や高次構造と GOS の生成パターンとを比較することで、糖転移反応の特異性に関与するモチーフやドメインを特定できる可能性がある。将来的には、タンパク質工学的検討によって、GOS 生成酵素の糖転移反応をコントロールし、GOS 組成の改良など実用面の研究が進むことが期待される。

またビフィズス菌の GOS の各種構成成分がビフィズス菌に代謝されるメカニズムの全容が解明されれば、ビフィズス菌を選択的に増やす糖組成をデザインすることが出来るかもしれない。上述の GOS 生成酵素の改変とあいまって、コンビナトリアルケミストリー的な手法により、GOS を、より bifidogenic なプレバイオティクスに進化させることができる時代が来るかもしれない。

引用文献

- 1) Ohtsuka, K., Effect of 4'-galactosyllactose intake on human fecal microflora. *Bifidus* 2, 143-149 (1989).
- 2) Tanaka, R., Takayama, H., Morotomi, M., Kuroshima, T., Ueyama, S., Matsumoto, K., Kuroda, A., and Mutai, M., Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006

- on the human fecal flora. *Bifidobacteria and Microflora* 2, 17–24 (1983).
- 3) Mozaffar, Z., Nakanishi, K., Matsuno, R., and Kamikubo, T., Purification and properties of β -galactosidases from *Bacillus circulans*. *Agricultural and Biological Chemistry* 48, 3053–3061 (1984).
 - 4) Huber, R. E., Kurz, G., and Wallenfels, K., A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose. *Biochemistry* 15, 1994–2001 (1976).
 - 5) Asp, N. G., Burval, A., Dahlquist, A., Hallgren, P., and Lundblad, A., Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase (Maxilact®). II. Oligosaccharide structures. *Food Chemistry* 5, 147–153 (1980).
 - 6) Toba, T., Yokota, A., and Adachi, S., Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry* 16, 147–162 (1985).
 - 7) Cho, Y., Shin, H., and Bucke, C., Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing β -galactosidase from *Bullera singularis*. *Biotechnology Letters* 25, 2107–2111 (2003).
 - 8) Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M. D., and Besson, T., Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Letters* 25, 623–629 (2003).
 - 9) Torres, D. P. M., Goncalves, M. F., Teixeira, J. A., and Rodrigues, L. R., Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 438–454 (2010).
 - 10) Gänzle, M. G., Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. *International Dairy Journal* 22, 116–122 (2012).
 - 11) Ohtsuka, T., Tsuboi, S., Katsutani, T., Jyo, T., Kuwahara, M., Kodomari, Y., Tanemori, N., Satoh, H., Ono, K., and Oka, S., Results of 29-year study of hoyo (sea-squirt) asthma in Hatsukaichi, Hiroshima prefecture. *Aerugi* 42, 214–218 (1993).
 - 12) Chiang, W. C., Huang, C., Llanora, G. V., Gerez, I., Goh, S. H., Shek, L. C., Nauta, A. J., Van Doorn, W. A., Bindels, J., Ulfman, L. H., Knipping, K., Delsing, D. J., Knol, E. F., and Lee, B. W., Anaphylaxis to cow's milk formula containing short-chain galacto-oligosaccharide. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130, 1361–1367 (2012).
 - 13) Vo, T. H., Le, N. H., Patel, M. S., Phan, L. T., and Tran Minh, N. N., Acute allergic reactions in Vietnamese children after drinking a new milk product. *Foodborne Pathogens and Diseases* 9, 156–159 (2012).
 - 14) Blakely, J. A., and MacKenzie, S. L., Purification and properties of a β -hexosidase from *Sporobolomyces singularis*. *Canadian Journal of Biochemistry* 47, 1021–1025 (1969).
 - 15) Ohtsuka, K., Tanoh, A., Ozawa, O., Kanematsu, T., Uchida, T., and Shinke, R., Purification and properties of a β -galactosidase with high galactosyl transfer activity from *Cryptococcus laurentii* OKN-4. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70, 301–307 (1990).
 - 16) Onishi, N., and Tanaka, T., Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide-producing β -galactosidase

- from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4026–4030 (1995).
- 17) Onishi, N., Kira, I., and Yokozeki, K., Galacto-oligosaccharide production from lactose by *Sirobasidium magnum* CBS6803. *Letters of Applied Microbiology* 23, 253–256 (1996).
 - 18) Onishi, N., and Tanaka, T., Purification and properties of a galacto- and gluco-oligosaccharide-producing β -glycosidase from *Rhodotorula minuta* IFO879. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82, 439–443 (1996).
 - 19) Phaff, H. J., and do Carmo-Sousa, L., Four new species of yeast isolated from insect frass in bark of *Tsuga heterophylla* (Raf.) Sargent. *Antonie van Leeuwenhoek* 28, 193–207 (1962).
 - 20) Shin, H., Park, J., and Yang, J., Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. *Process Biochemistry* 33, 787–792 (1998).
 - 21) Ishikawa, E., Sakai, T., Ikemura, H., Matsumoto, K., and Abe, H., Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis* β -galactosidase-like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99, 331–339 (2005).
 - 22) Sakai, T., Tsuji, H., Shibata, S., Hayakawa, K., and Matsumoto, K., Repeated-batch production of galactooligosaccharides from lactose at high concentration by using alginate-immobilized cells of *Sporobolomyces singularis* YIT 10047. *Journal of General and Applied Microbiology* 54, 285–293 (2008).
 - 23) Kaneko, K., Watanabe, Y., Kimura, K., Matsumoto, K., Mizobuchi, T., and Onoue, M., Development of hypoallergenic galactooligosaccharides on the basis of allergen analysis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 78, 100–108 (2014).
 - 24) Henrissat, B., and Bairoch, A., New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 293, 781 (1993).
 - 25) Skory, C. D., and Freer, S. N., Cloning and characterization of a gene encoding a cell-bound, extracellular β -glucosidase in the yeast *Candida wickerhamii*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 518–525 (1995).
 - 26) Zhou, J., Hartmann, S., Shepherd, B. K., and Poulton, J. E., Investigation of the microheterogeneity and aglycone specificity-conferring residues of black cherry prunasin hydrolases. microheterogeneity and aglycone specificity-conferring residues of black cherry prunasin hydrolases. *Plant Physiology* 129, 1252–1264 (2002).
 - 27) Dagher, S. F., Azcarate-Peril, M. A., and Bruno-Barcena, J. M., Heterologous expression of a bioactive β -hexosyltransferase, an enzyme producer of prebiotics, from *Sporobolomyces singularis*. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 1241–1249 (2013).
 - 28) Ito, M., Deguchi, Y., Matsumoto, K., Kimura, M., Onodera, N., and Yajima, T., Influence of galactooligosaccharides on the human fecal microflora. *Journal of Nutrition, Science and Vitaminology (Tokyo)* 39, 635–640 (1993).
 - 29) Tamai, S., Nakamura, Y., Ozawa, O., and Yamauchi, K., Effects of Galactooligosaccharides intake on human fecal flora and metabolites. *Journal of Applied Glycoscience* 41, 333–338 (1994).
 - 30) Niittynen, L., Kajander, K., and Korpela, R., Galacto-oligosaccharides and bowel function.

- Scandinavian *Journal of Food and Nutrition* 51, 62–66 (2007).
- 31) Beleli, C. V., Antonio, M. M., dos Santos, R., Pastore, G. M., and Lomazi, E. A., Effect of 4'-galactooligosaccharide on constipation symptoms. *Journal of Pediatrics (Rio J)* 91, 567–573 (2015).
 - 32) Vulevic, J., Tzortzis, G., Juric, A., and Gibson, G. R., Effect of a prebiotic galactooligosaccharide mixture (B-GOS®) on gastrointestinal symptoms in adults selected from a general population who suffer with bloating, abdominal pain, or flatulence. *Neurogastroenterology and Motility* 30, e13440 (2018).
 - 33) Weaver, C. M., Martin, B. R., Nakatsu, C. H., Armstrong, A. P., Clavijo, A., McCabe, L. D., McCabe, G. P., Duignan, S., Schoterman, M. C., and van den Heuvel, E. M., Galactooligosaccharides improve mineral absorption and bone properties in growing rats through gut fermentation. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 59, 6501–6510 (2011).
 - 34) Chonan, O., Matsumoto, K., and Watanuki, M., Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59, 236–239 (1995).
 - 35) Lawhon, S. D., Maurer, R., Suyemoto, M., and Altier, C., Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Molecular Microbiology* 46, 1451–1464 (2002).
 - 36) Sun, Y., and O'Riordan, M. D., Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain Fatty acids. *Advances in Applied Microbiology* 85, 93–118 (2013).
 - 37) Silk, D. A., Davis, A., Vulevic, J., Tzortzis, G., and Gibson, G. R., Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology Therapeutics* 29, 508–518 (2009).
 - 38) Sarna, S. K., Colonic Motility: from bench side to bedside. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.
 - 39) Newburg, D. S., Ko, J. S., Leone, S., and Nanthakumar, N. N., Human milk oligosaccharides and synthetic galactosyloligosaccharides contain 3'-, 4-, and 6'-galactosyllactose and attenuate inflammation in human T84, NCM-460, and H4 cells and intestinal tissue *ex vivo*. *Journal of Nutrition* 146, 358–367 (2016).
 - 40) Shoaf, K., Mulvey, G. L., Armstrong, G. D., and Hutkins, R. W., Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infection and Immunity* 74, 6920–6928 (2006).
 - 41) Davis, L. G., Martinez, I., Walter, J., Goin, C., and Hutkins, R. W., Barcoded pyrosequencing reveals that consumption of galactooligosaccharides results in a highly specific bifidogenic response in humans. *PLoS One* 6, e25200 (2011).
 - 42) de Vries, W., and Stouthamer, A. H., Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *Journal of Bacteriology* 93, 574–576 (1967).
 - 43) Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., and van Sinderen, D., Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes and Nutrition* 6, 285–306 (2011).
 - 44) Macfarlane, S., and Macfarlane, G. T., Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society* 62, 67–72 (2003).
 - 45) Riviere, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., and De Vuyst, L., Bifidobacteria and butyrate-

- producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontier Microbiology* 7, 979 (2016).
- 46) Palframan, R. J., Gibson, G. R., and Rastall, R. A., Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 4, 71–75 (2003).
 - 47) Van der Meulen, R., Makras, L., Verbrugghe, K., Adriany, T., and De Vuyst, L., *In vitro* kinetic analysis of oligofructose consumption by *Bacteroides* and *Bifidobacterium* spp. indicates different degradation mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1006–1012 (2006).
 - 48) Wilkens, S., Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime Reports* 7, 14 (2015).
 - 49) Yan, N., Structural biology of the major facilitator superfamily transporters. *Annual Review of Biophysics* 44, 257–283 (2015).
 - 50) James, K., Motherway, M. O., Bottacini, F., and van Sinderen, D., *Bifidobacterium breve* UCC2003 metabolises the human milk oligosaccharides lacto-N-tetraose and lacto-N-neo-tetraose through overlapping, yet distinct pathways. *Scientific Reports* 6, 38560 (2016).
 - 51) Parche, S., Amon, J., Jankovic, I., Rezzonico, E., Belet, M., Barutcu, H., Schendel, I., Eddy, M. P., Burkovski, A., Arigoni, F., and Titgemeyer, F., Sugar transport systems of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 12, 9–19 (2007).
 - 52) Wei, X., Guo, Y., Shao, C., Sun, Z., Zhurina, D., Liu, D., Liu, W., Zou, D., Jiang, Z., Wang, X., Zhao, J., Shang, W., Li, X., Liao, X., Huang, L., Riedel, C. U., and Yuan, J., Fructose uptake in *Bifidobacterium longum* NCC2705 is mediated by an ATP-binding cassette transporter. *Journal of Biological Chemistry* 287, 357–367 (2012).
 - 53) Sela, D. A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J. H., Chen, F., Whitehead, T. R., Lapidus, A., Rokhsar, D. S., Lebrilla, C. B., German, J. B., Price, N. P., Richardson, P. M., and Mills, D. A., The genome sequence of *Bifidobacterium longum subsp. infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proceeding of National Academy of Sciences U. S. A.* 105, 18964–18969 (2008).
 - 54) Shigehisa, A., Sotoya, H., Sato, T., Hara, T., Matsumoto, H., and Matsuki, T., Characterization of a bifidobacterial system that utilizes galacto-oligosaccharides. *Microbiology* 161, 1463–1470 (2015).
 - 55) Sotoya, H., Shigehisa, A., Hara, T., Matsumoto, H., Hatano, H., and Matsuki, T., Identification of genes involved in galactooligosaccharide utilization in *Bifidobacterium breve* strain YIT 4014^T. *Microbiology* (2017).
 - 56) Akiyama, T., Kimura, K., and Hatano, H., Diverse galactooligosaccharides consumption by bifidobacteria: implications of β -galactosidase—LacS operon. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 79, 664–672 (2015).
 - 57) Saier, M. J., Families of transmembrane sugar transport proteins. *Molecular Microbiology* 35, 699–710 (2000).
 - 58) Andersen, J. M., Barrangou, R., Abou Hachem, M., Lahtinen, S., Goh, Y. J., Svensson, B., and Klaenhammer, T. R., Transcriptional and functional analysis of galactooligosaccharide uptake by lacS in *Lactobacillus acidophilus*. *Proceeding of National Academy of Sciences U. S. A.* 108, 17785–17790 (2011).