

放線菌由来難分解性 trehalose 類縁体化合物の 物性評価と利用法の検討

公益財団法人微生物化学研究会微生物化学研究所

和田 俊一

Nonreducing disaccharide trehalose is used as a stabilizer and humectant in various products including cosmetics and skincare products. However, its use has some problems. Trehalose is hydrolyzed by trehalase, a widely expressed enzyme in multiple organisms including microbes on the skin and environment. When trehalose is hydrolyzed, two glucose molecules are released, and it can be a nutrient of the microbes and promote their growth. It may disturb the microbial flora on the skin and may be a cause of the deterioration and putrefaction of products containing it. The released glucose can glycate proteins and lipids in the skin cells and accelerate the aging of the skin. New trehalose analogs that have adequate moisture retention and protective activities and cannot be hydrolyzed and digested by trehalase and microbes are expected. More than 40 trehalose analogs were prepared including microbial metabolites and synthetic compounds. Among them, a mass-producible metabolite of an actinomycete 4-trehalosamine and its derivative detergent compounds IMCTA-Cns (n=8-15) were selected to be analyzed their properties in this study. Compared with trehalose, 4-trehalosamine exhibited better or comparable protective activities on a starch, proteins, and microbial cells. 4-Trehalosamine also exhibited a high buffer capacity around the neutral pH. 4-Trehalosamine was biologically stable that was not assimilated by microbes and not hydrolyzed by mammalian trehalases. While IMCTA-Cn detergents could be effectively used in membrane protein extraction without the denaturing activity, long-chain detergents IMCTA-C13 – IMCTA-C15 showed 1000–3000-fold stronger autophagy-inducing activity in cultured cells than trehalose and are expected to become a drug lead and research reagent. These results indicate that 4-trehalosamine and the derivative detergents are potential trehalose substitute for various purposes. They can be useful ingredient of cosmetics and skincare products.

1. 緒言

Trehalose は glucose 二分子が 1,1 結合した二糖である。Glucose の還元末端同士が結合により相殺されているため非還元性となる。還元糖は反応性の高いアルデヒドやケトンをも有するため、タンパク質や脂質など多種の分子に結合し構造や活性に悪影響を及ぼすが、非還元糖である trehalose はそうした反応性が低く、分子量が小さい安定な親水性ユニットの一種として考えることができる。保湿作用や水分子代替能の強さによるものと思われるが、trehalose はタンパク質、多糖、細胞、組織などの保護、品質維持機能に優れている。多くの動植物や微生物が保有し、乾燥条件下での保護物質、浸透圧調節物質、あるいは貯蔵糖などとして利用されている。ヒトは trehalose を産生しないが、特異的分解酵素 trehalase を小腸や腎臓などで発現させており、食事から摂取した trehalose は分解して glucose にし、エネルギー源とすることができる。また、trehalose は、保湿、保護作用をもとに、現在、様々な製品の添加物として利用されている。スキンケア分野でも、

乾燥肌や皮膚炎の緩和、創傷被覆、あるいは皮膚再生能の向上などの効果が期待でき、化粧品や保湿クリームに広く利用されている。

しかしながら、trehalose は多くの微生物にも発現の見られる trehalase により分解され、微生物の栄養源となり得るため、スキンケア製品への利用においては皮膚常在微生物叢への悪影響や、保管時の製品腐敗、劣化に注意が必要となる。また、分解産物である glucose は皮膚組織の糖化を促し、老化の原因ともなり得る。このため、保湿、保護作用などの期待される機能を維持しつつ分解されにくい新たな trehalose 類縁体化合物の開発が期待される。

我々はこれまでに放線菌より新規 trehalose 類縁体 lentztrehalose A, B, C を発見し、これらが trehalase や各種微生物に分解されず安定であることを明らかにしてきた¹⁻³⁾。さらに、他の難分解性類縁体の探索、合成も行い、現在は 40 種余りを保有している。これらの類縁体の化粧品を含めた様々な製品への利用を目指して、保湿、保護作用や生産条件などに関する検討を行うこととした。特に、工業スケールでの大量生産が可能と見込まれた 4-trehalosamine とその誘導体化合物 IMCTA-C14 について(図 1)⁴⁾、本研究での主な検討対象とすることとした。

2. 方法

2.1. 4-Trehalosamine 増産法の検討

微生物化学研究所で保有する放線菌のうち、生産菌候補と考えられた約 50 株を培養し、その抽出物を



Characterization and application of enzyme-stable trehalose analogs derived from actinomycetes

Shun-ichi Wada

The Microbial Chemistry Research Foundation
Institute of Microbial Chemistry

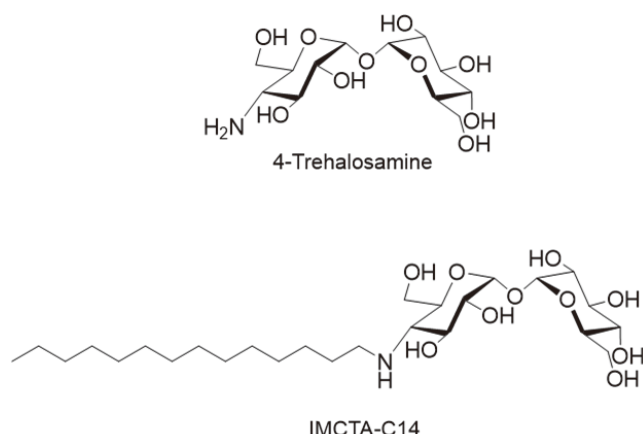


図 1 4-Trehalosamine と IMCTA-C14

薄層クロマトグラフィーおよびLC-MSにより分析し、4-trehalosamineの高生産株を選抜した。また、基本液体培地の成分組成を調整し、高生産条件について検討を行った。

2.2. 4-Trehalosamineのでんぷん老化抑制作用の検討

β -アミラーゼを用いた酵素法と動的粘弾性測定法により、4-trehalosamineによるコーンスターチゲル老化抑制作用について検討した。

2.3. 4-Trehalosamineのタンパク質および微生物の乾燥保護作用の検討

ウシalkaline phosphatase (CIP)、酵母alcohol dehydrogenase (ADH)、およびウシcollagen Type Iを4-trehalosamineやtrehaloseなど各種の糖を加えた条件で凍結乾燥した。凍結乾燥後、元の量の水を加え、酵素2種については活性を測定し、collagen Type IについてはSirius redの取り込みによる立体構造の維持を評価した。微生物については、大腸菌および酵母に対してタンパク質同様凍結乾燥実験を行った。凍結乾燥物を再懸濁して寒天プレート上にまき、生えたコロニー数を測定して各糖による微生物の乾燥保護効果を評価した。

2.4. 4-TrehalosamineのpH緩衝作用の評価

10mM 4-trehalosamine水溶液に1M HClあるいは1M NaOHを滴定し、pH緩衝能を評価した。

2.5. 4-Trehalosamineの微生物による分解、資化性の評価

グラム陽性菌、陰性菌、抗酸菌、および真菌を含む12種類の微生物の最低栄養培養液中にglucose、trehalose、4-trehalosamineなどを加え、菌の増殖を測定し、各糖に対する資化性の有無を評価した。

2.6. 4-Trehalosamineの哺乳類trehalaseに対する分解耐性

4-Trehalosamineやlentztrehalose Aなどのtrehalose類縁体化合物をブタ腎臓由来trehalaseやヒトtrehalase発現細胞抽出液により反応させ、分解の有無を調べた。

2.7. IMCTA-Cn化合物の界面活性剤としての評価

4-Trehalosamineに脂肪属アルデヒドを結合させ還元し、界面活性剤化合物群IMCTA-Cn ($n=8-15$)を合成した。各化合物の臨界ミセル化濃度は測定キットにより評価した。ミセルサイズは動的光散乱法により測定した。HLB値はグリフィン法により計算した。また、ヒト培養細胞OVK18からのタンパク質抽出量を調べ、各化合物によるタンパク質可溶化能を評価するとともに、抽出タンパク質のフォスファターゼ活性を調べ、タンパク質変性の有無についても評価を加えた。

2.8. 4-TrehalosamineおよびIMCTA-C14によるオートファジー誘導能の評価

ヒト培養細胞OVK18やMewoなどを4-trehalosamineやIMCTA-C14を含む各種のtrehalose類縁体により処理し、オートファジー関連タンパク質の発現、修飾、および局在についてウェスタンブロットティングや免疫染色により調べた。

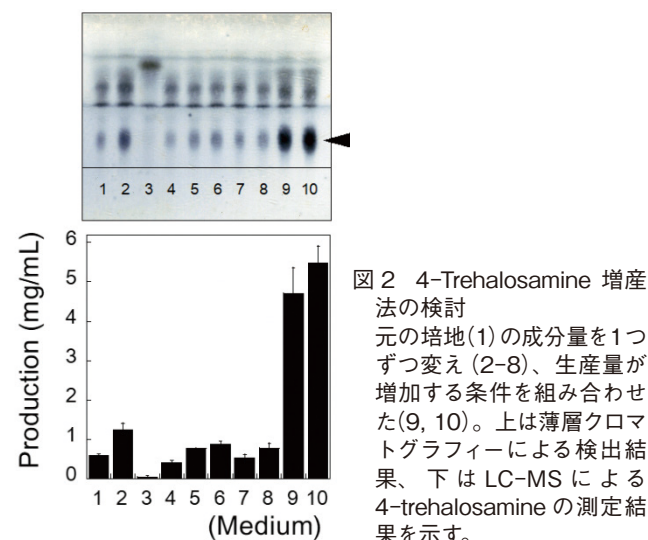
3. 結果

3.1. 4-Trehalosamine増産法の検討

予備実験において4-trehalosamineの生産菌株候補として考えられた約50株のうち、4-trehalosamineの生産が確認されたのは3株であった。このうち、生産量が最も多かった*Streptomyces* sp. MK186-mF5株を以降の実験に使用することとした。初期の培地での生産量は液体培養物中で0.5g/L程度(未精製物の含有量として)であった。培地成分を調整した結果、最適な培地、培養条件下では5.48g/Lまで生産量が上昇した(図2)。ファーメンターによる大量培養物からの精製を試みた結果、純度97%以上、1水和物と考えられる精製物が540g得られた。

3.2. 4-Trehalosamineのでんぷん老化抑制作用の検討

でんぷんの老化(硬化)抑制は、trehaloseの代表的な機能として知られるものである。これにより、現在trehaloseは多くのでんぷん加工食品に添加利用されている。4-Trehalosamineについて、でんぷんの老化抑制作用を調べ、trehaloseによる作用との比較を試みた。2つの系により96時間低温保存後のコーンスターチゲルの老化度の比較を行ったところ、4-trehalosamineを加えて調製



したゲルは trehalose、sucrose、あるいは glycerol を加えたものに比べて有意に老化の進行が遅くなることが確認された(図3)。酵素法(EA)では、4-trehalosamineを加えた場合、老化が抑制され、酵素の反応性が高く維持されることが確認された。一方、直接的なゲルの硬さや粘度を評価する動的粘弾性測定法(DV)では、他の糖を加えたゲルでは一つの指標である Tan δ 値が硬化を示す減少傾向を見せたのに対し、4-trehalosamineを加えたものでは若干の

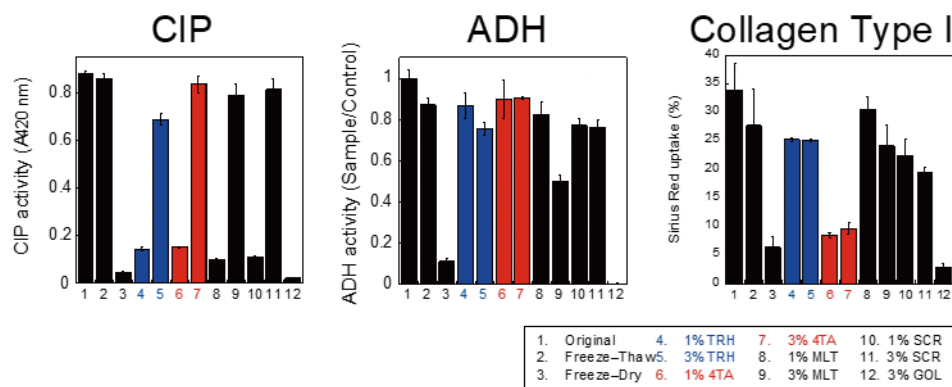
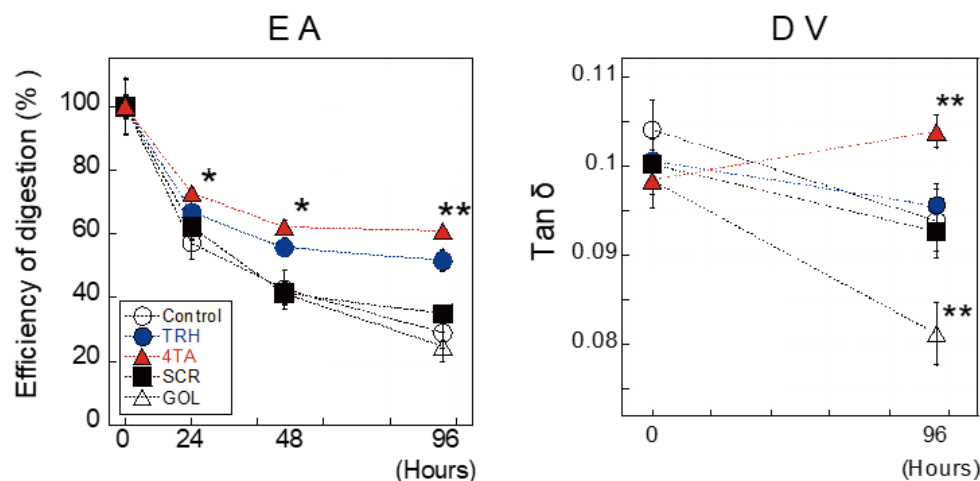
増加傾向を見せた。

3.3. 4-Trehalosamineのタンパク質および微生物の乾燥保護作用の検討

Trehaloseの機能としてよく知られたものの一つが、タンパク質の乾燥からの保護作用である。凍結乾燥時に4-trehalosamineを加えた場合、CIPとADHでは、他の糖を加えた場合に比べて活性の保護作用が高く見られた(図4)。一方、collagen Type Iでは、4-trehalosamine添加による立体構造の維持効果は見られなかった。また、細胞、組織の乾燥からの保護作用を評価していくための前段階の実験として、微生物の乾燥からの保護作用について検討した。微生物では、大腸菌、パン酵母ともに4-trehalosamineを加えた場合では、他の糖を加えた場合に比べて若干、菌の生存率が上昇することが確認された(図5)。

3.4. 4-TrehalosamineのpH緩衝作用の評価

Trisとの部分構造の類似性から、4-trehalosamineのpH緩衝能について検討を行った。4-TrehalosamineにはTris、MES、あるいはHEPESといった代表的な緩衝物質と同程度に強力なpH緩衝作用があることが明らかとなった。緩衝pH範囲はTrisより1.0ほど低く、pH7.0付近で最も強



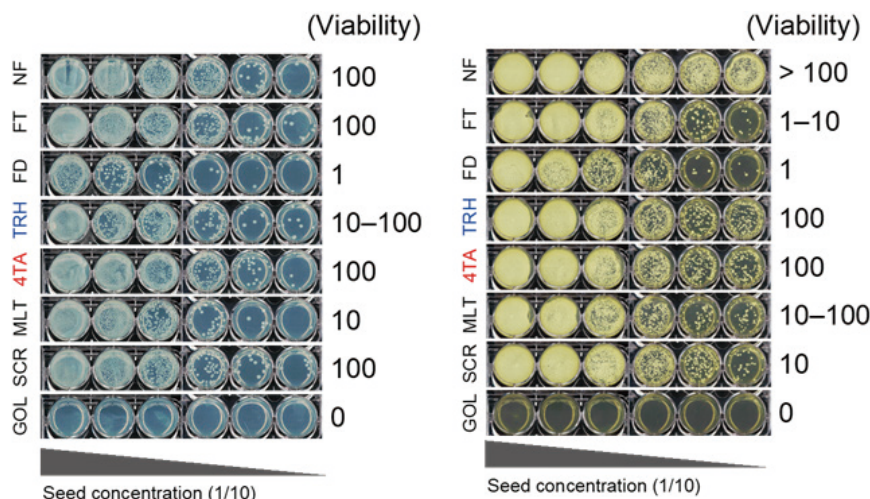


図5 4-Trehalosamine の微生物の乾燥保護作用の検討

大腸菌(左)とパン酵母(右)の水懸濁液中に trehalose (TRH)、4-trehalosamine (4TA)、maltose (MLT)、sucrose (SCR)、および glycerol (GOL) を加え凍結乾燥((FD) したのち、元の量の水を加え、1/10の希釈系列で作製した懸濁液を寒天プレート上にまいた。NFは凍結していない元の微生物懸濁液、FTは凍結後そのまま解凍した懸濁液。Viabilityは、糖を加えずに凍結乾燥した場合のコロニー数を1としたときの、それぞれのコロニー数を示す。

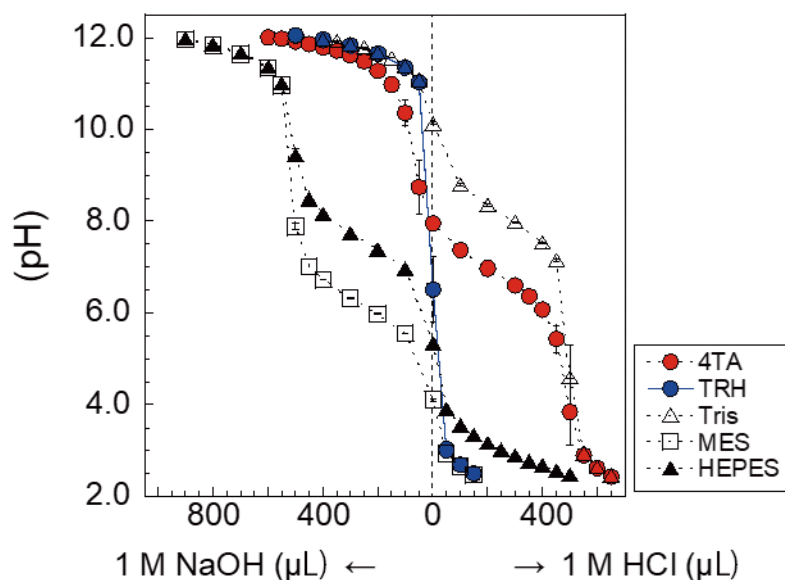


図6 4-Trehalosamine の pH 緩衝作用の評価

4-Trehalosamine (4TA)、trehalose (TRH)、Tris、MES、および HEPES の 10mM 水溶液に 1 M HCl または 1 M NaOH を滴定し、pH の変化を調べた。

力な緩衝能を発揮した(図6)。

3. 5. 4-Trehalosamineの微生物による資化性の評価

4-Trehalosamineが微生物に分解され栄養源となるのか調べることにした。12種類の各種微生物それぞれに対し、炭素源の不足した最低栄養培地を用意し培養を行った(図7bar 1)。いずれの場合も glucoseの添加(bar 2)により菌の増殖率の上昇が見られる培地とした。Glucoseの代わりに trehaloseを添加した場合(bar 3)でも、6種類ほどの菌では増殖率の上昇が確認された。4-Trehalosamineを添加した場合(bar 4)ではどの菌でも増殖率の上昇は見られず、微生物の栄養源とはならないことが示された。

3. 6. 4-Trehalosamineの哺乳類 trehalase に対する分解耐性

ブタ trehalase(図8A)を反応させた場合では、trehalose

のみ分解産物の glucoseの産生が見られ、4-trehalosamine と他の trehalose 類縁体では glucoseの産生は見られなかった。また、ヒト trehalase 発現細胞抽出液を用いた実験(図8B)では、抽出液反応後の trehalose 類縁体化合物の残存量を測定したが、やはり trehaloseのみが分解され、他の類縁体は分解されないことが確認された。4-Trehalosamineは哺乳類 trehalase に分解されないことが示された。

3. 7. IMCTA-Cn 化合物の界面活性剤としての評価

4-Trehalosamineを原料として合成した化合物 IMCTA-Cn (n=8-15)について、界面活性剤としての性質を調べた。IMCTA-C12 と n-dodecyl-β-D-maltoside (DDM) の同じ長さの脂肪鎖をもつものの比較では、

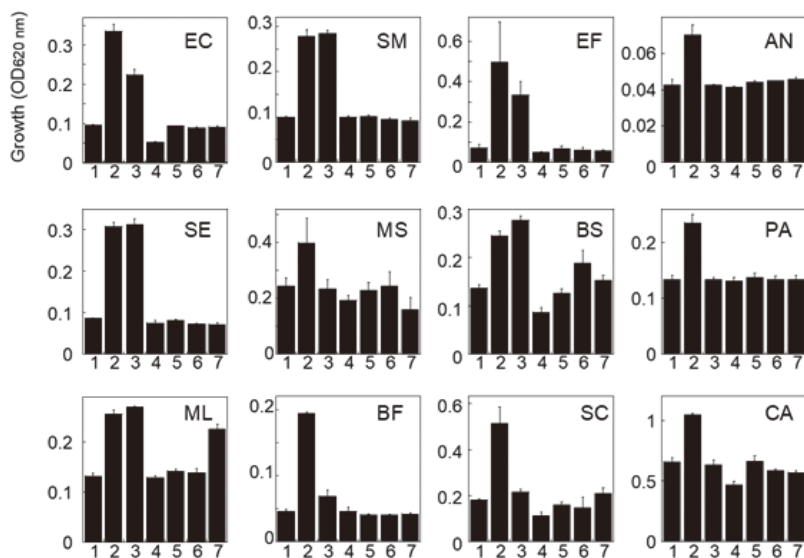


図7 4-Trehalosamine の微生物による資化性の評価
12 種類の微生物それぞれの最低栄養培地 (bar 1) に、glucose (bar 2)、trehalose (bar 3)、4-trehalosamine (bar 4)、およびその他の trehalose 類縁体 (bars 5-7) を加え、各菌の増殖を測定した。

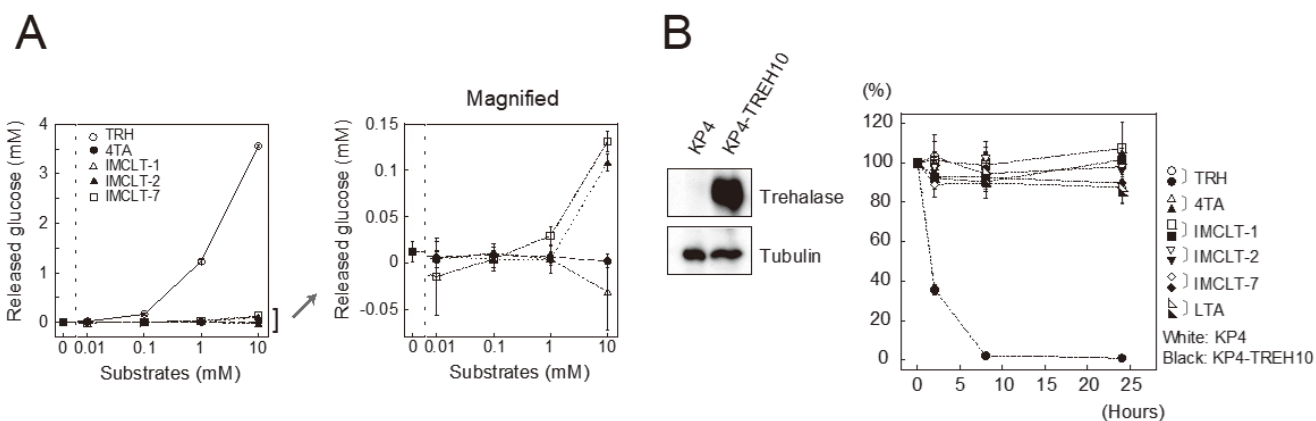


図8 4-Trehalosamine の哺乳類 trehalase に対する分解耐性

A. ブタ腎臓由来 trehalase を trehalose (TRH)、4-trehalosamine (4TA)、およびその他の trehalose 類縁体化合物に反応させ、分解産物である glucose の放出量を測定した。右は 4TA とその他の類縁体のプロットの重なりを拡大したもの。
B. ヒト培養細胞 KP4 でヒト trehalase を発現させ、その抽出液による trehalose 類縁体の分解について調べた。KP4-TREH10 は trehalase 安定発現株。グラフ中、白印は親株 KP4 抽出液で trehalose 類縁体を反応させたもの。黒印は KP4-TREH10 抽出液で反応させたもの。

IMCTA-C12の方が臨界ミセル濃度が高く、ミセルサイズが大きかった(図9A)。培養細胞からのタンパク質抽出、可溶化効率について調べた結果、IMCTA-C11-C14は効率がよく、特にIMCTA-C13ではSDSと同等に高い効率を示した(図9B)。抽出液中のEGFR、TRPV6、あるいは Na^+/K^+ ATPaseの存在量を確認した結果、これらの化合物では膜タンパク質の抽出も効率よくできていることが明らかとなった(図9C)。一方、抽出液のフォスファターゼ活性を調べたところ、SDSで抽出したものでは、フォスファターゼが変性し活性が低下していたが、IMCTA-Cnではフォスファターゼ活性が維持されており、これらがタンパク質変性作用を示さない界面活性剤であることが確認された(図9D)。

3. 8. 4-TrehalosamineおよびIMCTA-C14によるオートファジー誘導能の評価

Trehalose類の生理機能として、50-100mM程度の高濃度で用いた場合に細胞にオートファジーを誘導することが知られている。4-TrehalosamineとIMCTA-Cn化合物のオートファジー誘導能の有無について調べた。4-Trehalosamineによる処理では、trehaloseより強いオートファジーマーカーLC3-IIの発現が確認された(図10A)。IMCTA-Cn類はさらに強いオートファジー誘導能を示した。IMCTA-C13-C15では、trehaloseの1/3000-1/1000ほどの濃度で、Trehaloseよりも強くオートファジーマーカーの発現が確認された。4-TrehalosamineやIMCTA-Cnによる処理時、rapamycinの場合と異なりp70S6Kの脱リン酸化が確認されていなかった(図10B)

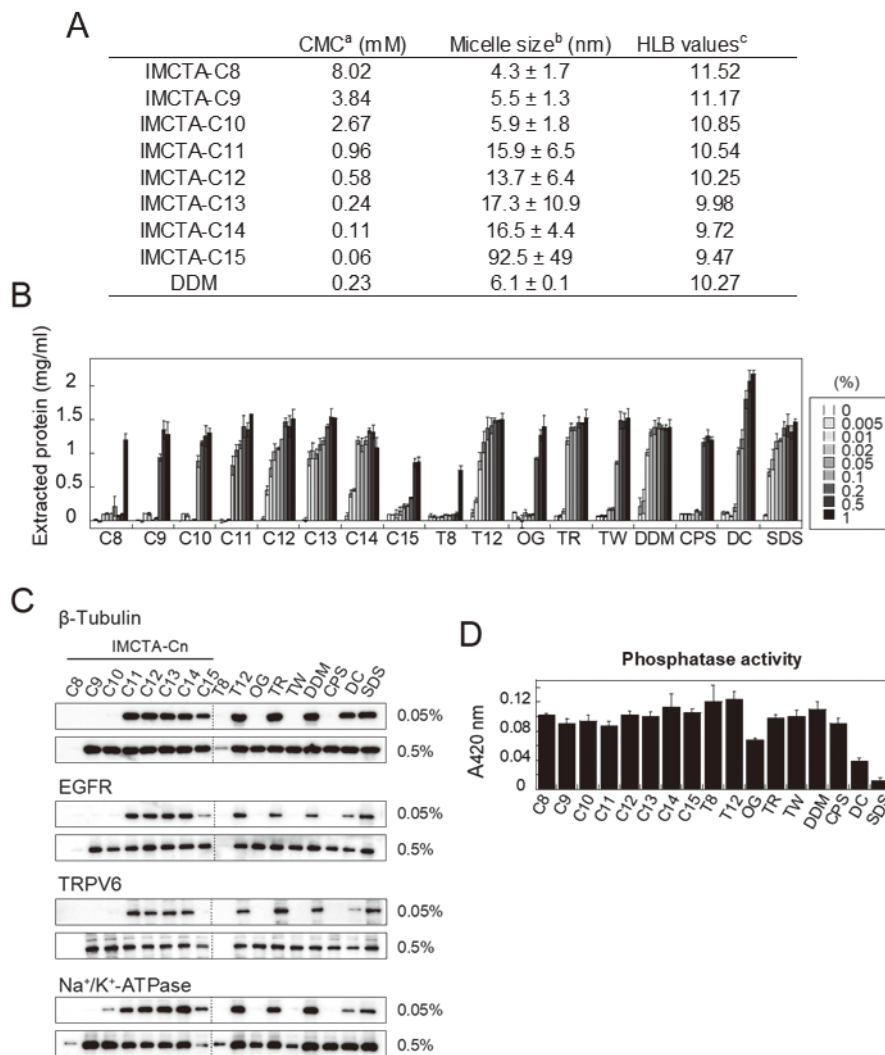


図9 IMCTA-Cn 化合物の界面活性剤としての評価

- A. IMCTA-Cn (n=8-15) 化合物の臨界ミセル濃度、ミセルサイズ、およびHLB値を示す。
- B. IMCTA-Cn (C8-C15) と各種界面活性剤を右に示す濃度で使用した際のOVK18細胞抽出液中のタンパク質濃度をBCA法により測定した。
- C. Bの抽出液の一部をウェスタンブロッティングにより分析し、各化合物による膜タンパク質の抽出、可溶化効率を確認した。
- D. 各化合物抽出液のフォスファターゼ活性を測定し、タンパク質変性を検討した。

ことから、これらもtrehaloseと同様、mTOR非依存的にオートファジーを誘導するものと考えられた。また、4-TrehalosamineとIMCTA-C14はtrehalose同様、細胞内の凝集性ペプチドを減少させ(図10C)、オートファジー関連転写因子TFEBの核移行を促進させた(図10D)。

4. 考察

本研究は我々が長期的に行っている難分解性trehalose類縁体化合物の実用化に向けた検討の一環として行われたものである。本研究期間においては4-trehalosamineの産業的大量生産が期待される結果が得られたため、これを中心に利用法の検討を行うこととした。

4-Trehalosamineについては本研究での検討により、現段階で実験室レベルの設備と1か月ほどの作業により、500g以上生産することが可能となった。今後は変異原物質を用いた生産菌育種や新たな培地、培養条件の検討により、更なる増産にも期待することができる。また、trehaloseや各種アミノグリコシド化合物の生合成機構を考慮すると、4-trehalosamineは数種類程度の酵素により生合成されてい

るものと考えられる。現在その酵素については未同定であるが、将来的にはその応用により、でんぷんからのtrehaloseの生産と同様、安価な材料物質を数種の酵素で処理することで大量生産することができる可能性があり期待される。

4-Trehalosamineにはcollagen type Iの乾燥からの保護作用はほとんど見られなかったが、でんぷんの老化抑制作用に関してはtrehaloseや他の糖類に比べて有意に強く見られ、また、CIPやADHといった酵素や、大腸菌や酵母などの微生物の乾燥からの保護作用も他の糖より強いのか、あるいは同程度に確認された。哺乳類の細胞や組織に対する保護効果に関しては、まだ予備実験段階であるが、マウス皮膚の再生や創傷治癒作用についても、少なくともtrehaloseと同程度の効果が認められている。本研究において4-trehalosamineは強いpH緩衝能を示し、微生物に資化されず、trehalaseに分解されない、といったtrehaloseには無い特長がいくつか確認された。Trehaloseは保湿保護物質として優れた特性を有し、現在多くの製品に使用されているが、その一方で、一般的に流通している類縁体化合物が存在しないため、製品開発段階において性能を比較し、より良いものを選択すると

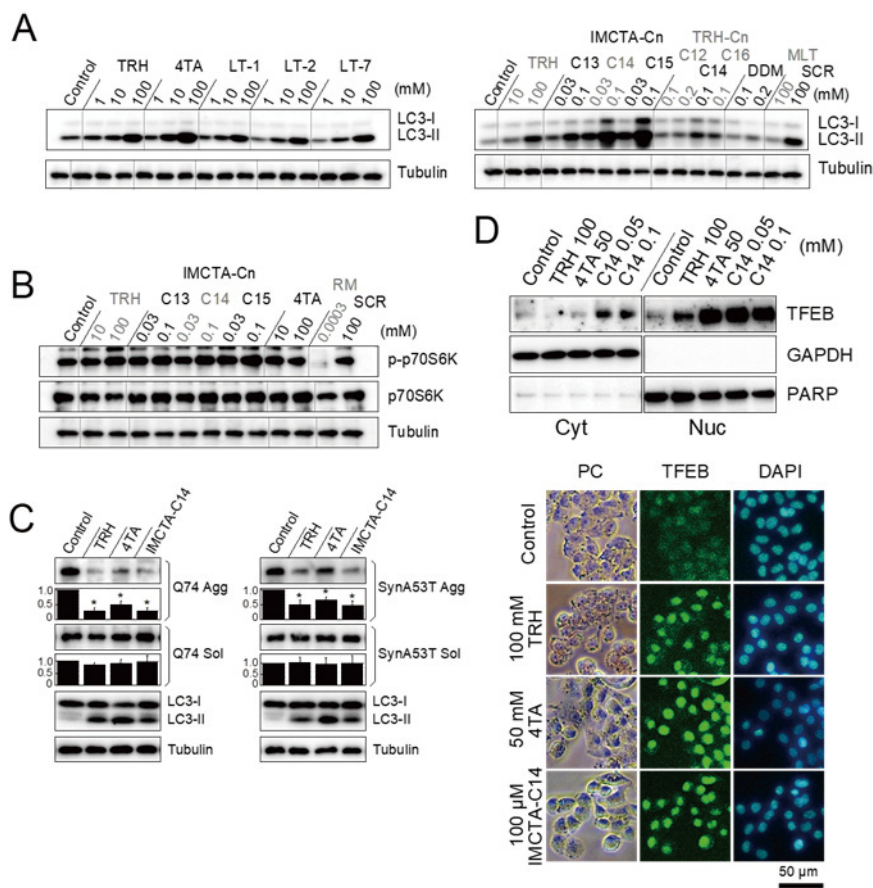


図10 4-Trehalosamine および IMCTA-Cn によるオートファジー誘導能の評価

- A. Trehalose 類縁体処理細胞内でのオートファジーマーカータンパク質 LC3-II の発現上昇について調べた。LT-1、-2、-7 は、別のトレハロース類縁体。TRH-Cn は trehalose の 6 位に脂肪酸が結合したエステル。
- B. mTOR の基質である p70S6K のリン酸化状態を調べ、4-trehalosamine と IMCTA-Cn によるオートファジー誘導が mTOR 依存性のものであるかどうか調べた。RM は mTOR 阻害剤 rapamycin。
- C. Trehalose 類で処理した際の、凝集性ペプチド Q74 と SynA53T の細胞内での存在量を調べた。低浸透圧液を使用し、凝集物画分(Agg) と可溶物画分(Sol) に分けて評価を行った。
- D. Trehalose 類で処理した際のオートファジー関連転写因子 TFEB の発現量と核移行についてウェスタンブロットと免疫染色により調べた。

いうことができない。化粧品、スキンケア製品開発において、4-trehalosamine には、まずは trehalose との比較対象として使用されることから期待したい。

Trehalose 類縁体化合物の一般的な流通が進まない理由の一つとして、誘導体化合物の安価な大量生産が困難である点が挙げられる。分子内に 8 個含まれる水酸基のうち、特定のものを修飾、構造変換することは産業レベルでは困難である。4-Trehalosamine に関しては、4 位に限定されるものの、水酸基とは反応性の異なるアミノ基を利用することで容易に多数の誘導体化合物を合成することが可能である。本研究では、当初、構造生物学分野での膜タンパク質研究への利用を考えて、4-trehalosamine 誘導体である IMCTA-Cn 化合物を合成した。IMCTA-C13 を中心とした脂肪鎖が長めのものについてはタンパク質可溶化作用が強く認められる一方で、変性作用は示さないマイルドな界面活性剤であることが確認された。化粧品分野では乳化剤としての利用が期待される。また、強いオートファジー誘導能が確認されたことから、実用化には更なる慎重な検討が必要であるが、皮膚組織の新陳代謝を促進するような効果が得られることも期待される。

5. 総括

1990 年代半ばに日本の製糖企業株式会社林原によって、でんぶんの酵素処理による安価な大量生産法が開発された

trehalose は、その後 25 年ほどで年間 4-5 万トン生産されるようになり、現在では食品以外にも多くの製品に添加、使用されるようになった。我々が日々消費する様々な製品の原材料欄を見ると、単一の糖または糖アルコールとして最も頻繁に含有が確認できるものの一つが trehalose である。それ以前も酵母から抽出された少量のものが一部の化粧品や研究試薬などに使用されていたようではあるが、生産、利用規模は革命的变化を見せてきた。林原による trehalose のこれまでの生産、販売展開の軌跡は、「人類が利用可能な新たな糖」が一つ発見されるということが産業史上いかに重大な意義をもつのかを示す特筆すべき事例であるものと言える。

4-Trehalosamine は産業的な大量生産が可能であるものと考えられ、trehalose より優れた幾つかの性質を示すため、正に「人類が利用可能な新たな糖」の一つとなり得るものと期待される。近い将来我々の生活に深く浸透していくものになる可能性がある。

また 4-trehalosamine は合成原料としての有用性にも期待が集まる。本研究で開発された IMCTA-Cn 化合物の一部は乳化剤や洗剤としての利用以外に、trehalose タイプの強力なオートファジー誘導剤として神経変性疾患や肝疾患の治療薬あるいはリード化合物としての開発、利用も期待される。また、現在はまだ着手していないが、4-trehalosamine を規則的に結合させた、保湿、保護効果を有した樹脂、繊維、接着剤

などの高分子物質の開発にも今後興味をもたれる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、多大なご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

本研究は、有村帆波美氏、吉田温子氏、永吉美穂氏、松波さくら氏、柳澤諒氏、五十嵐雅之博士、大庭俊一氏、澤竜一博士、久保田由美子氏、大石智一博士、原川晃子氏、清水孝雄博士をはじめ、微生物化学研究所の多くの方々のご協力により進めてまいりました。厚く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Wada S et al. Stability and bioavailability of lentztrehaloses A, B, and C as replacements for trehalose. *J. Agric. Food Chem.* 64, 7121-7126. (2016)
- 2) Wada S et al. Novel autophagy inducers lentztrehaloses A, B and C. *J. Antibiot.* 68, 521-529. (2015)
- 3) Wada S et al. Structure and biological properties of lentztrehalose: a novel trehalose analog. *J. Antibiot.* 67, 319-322. (2014)
- 4) Wada S et al. Rediscovery of 4-trehalosamine as a biologically stable, mass-producible, and chemically modifiable trehalose analog. *Adv Biol (Weinh)*. <https://doi.org/10.1002/adbi.202101309> (2022)

