

大阪発、微生物を利用した新規酸性オリゴ糖の開発 — 新規機能性食品素材ラクトビオン酸の開発 —



きりゅう・たかあき
神戸大学大学院自然科学
研究科修了，東洋水産株
式会社，大阪市立工業研
究所生物化学課，(地独)
大阪市立工業研究所生物・
生活材料研究部を経て，
現在(地独)大阪産業技
術研究所森之宮センター
生物・生活材料研究部
研究主任。農学博士。

桐生 高明

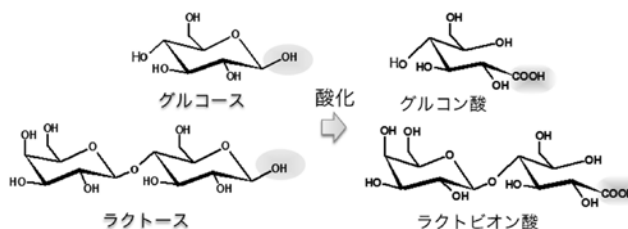
● 1. はじめに ●

大阪産業技術研究所森之宮センターは，その前身である大阪市立工業研究所時代から微生物の持つ糖質関連酵素の研究を行い，その研究成果を企業へ技術移転することで，糖質の工業的生産技術の向上に貢献してきた。古くは，カビや細菌の生産する各種澱粉加水分解酵素によるD-グルコース生産技術，さらには，糖転移酵素を利用したカップリングシュガー®(株式会社林原の登録商標)や乳糖果糖オリゴ糖の開発を企業と共同で行い，その実用化に成功している。また，近年では微生物の糖酸化酵素を用いた酸性オリゴ糖の開発に取り組み，企業と共同でラクトースの酸化物であるラクトビオン酸の実用化を行った。本稿では，ラクトビオン酸の実用化への取り組みと，弊所の持つ企業の技術開発へのサポート体制について紹介する。

● 2. ラクトビオン酸の性質と機能 ●

D-グルコースの還元末端(C1位)を酸化すると，カルボキシル基が導入され，アルドン酸である，D-グルコン酸が生成する(第1図)。D-グルコン酸やそのラクトンであるグルコノ- δ -ラクトンはpH調整剤や豆腐などの凝固剤として広く利用

されている。一方，アルドースからなるオリゴ糖を酸化すると，同様に還元末端にカルボキシル基が導入され，還元末端のアルドース残基がアルドン酸となったオリゴ糖(オリゴ糖アルドン酸)が生成する。例えば，ラクトースを酸化すると，還元末端側のD-グルコース残基が酸化され，ラクトビオン酸が生成する(第1図)。このラクトビオン酸は，腸管内でのカルシウム吸収を促進することが，以前から報告されていた¹⁾。また，エクオールは更年期障害の緩和効果を示す物質として知られ，ヒトの腸管内で，イソフラボンから腸内細菌により生成する。ラクトビオン酸の摂取は，この腸管内でのイソフラボンからエクオールへの変換を促進することが報告されている²⁾。さらに，オリゴ糖であることから整腸作用などが期待される。物理的な性質として特筆すべきは，ラクトビオン酸はカルシウムと溶解性の高い塩を形成することである。食品に利用可能な，多くのカルシウム



第1図 D-グルコースとラクトースの酸化によるD-グルコン酸とラクトビオン酸の生成(カラー図表をHPに掲載C117)



塩は水溶性が低い。最も安価なカルシウム素材である、炭酸カルシウムの溶解度は、わずか0.015%でしかなく、比較的溶解性の高いカルシウム素材として利用されている乳酸カルシウムでも、約5%にすぎない。一方、ラクトビオン酸カルシウムは60%のシロップが調製可能で、他の食品に利用可能なカルシウム素材と比べ、極めて高い水溶性を示す³⁾。

この性質により、高濃度のカルシウムを含む透明な飲料を長期保存や冷却した際に懸念されるカルシウム塩の析出を心配する必要がなくなる。また、ラクトビオン酸カルシウムは白色の粉末で、ほとんど味がしない。直接、ラクトビオン酸カルシウムの粉末をなめた場合でも、舌先にわずかな甘味を感じるだけである。そのため、添加する食品の味を損なうことがない。上記のように、ラクトビオン酸は機能性だけでなく、食品への添加に適した性質を有している。

● 3. 従来のラクトビオン酸の生産法に関する研究 ●

上記のようにラクトビオン酸は機能性食品として優れた性質を示すことから、その工業的な生産を目的に、さまざまな研究が行われてきた。現在、ほとんどのD-グルコン酸やグルコノ- δ -ラクトンの工業的な生産は、化学的手法でD-グルコースの末端を酸化して行われている。この化学的な酸化法でラクトースを酸化し、ラクトビオン酸を生産することは可能である⁴⁾。しかし、食品添加物に指定されているD-グルコン酸とは異なり、化学法で生産したラクトビオン酸を食品用途で利用するのは、現在の食品業界を取り巻く現状を考えると、現実的でない。そのため、微生物の菌体や分泌する酵素を用い、ラクトースを酸化する研究が行われてきた。以前は工業的なD-グルコン酸生産法として、盛んに利用されてきた *Aspergillus niger* 由来のグルコースオキシダーゼでの発酵法や、D-グルコースに対して高い酸化活性を示す酢酸菌の糖酸化酵素、PQQ dependent

第1表 ラクトビオン酸生産法の開発で見いだされた微生物 (カラー図表をHPに掲載 C118)

生体触媒		起源	文献
バクテリア 	細胞	<i>Burkholderia cepacia</i>	15
	細胞	<i>Enterobacter</i> sp.	16
	細胞 (Glucose dehydrogenase)	<i>Pseudomonas</i> sp.	17
	細胞	<i>Escherichia coli</i>	18
Glucose-fructose oxidoreductase		<i>Zymomonas</i> sp.	19
子囊菌 	Carbohydrate:acceptor oxidoreductase	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	20
		<i>Microdochium nivale</i>	21
	Glucooligosaccharide oxidase	<i>Acremonium strictum</i>	22

membrane bound glucose dehydrogenase (m-GDH) を利用してラクトースを酸化することは、*Aspergillus niger* や酢酸菌がすでに、食品生産に利用されていることから、適していると考えられる。しかし、これらの微生物由来の糖酸化酵素はD-グルコースに対し高い基質特異性を示し、ラクトースを酸化しないと報告されている⁵⁻⁷⁾。一方、第1表に示すように、筆者らの研究室で見いだされたものを含め、ラクトースに対し高い活性を示す子囊菌由来やバクテリア由来のさまざまな糖酸化酵素が報告されている。しかし、これらの菌体や酵素も、必ずしも食品生産に利用するには適した菌とは言えず、ラクトビオン酸の工業的な生産法の実用化はなされていなかった。

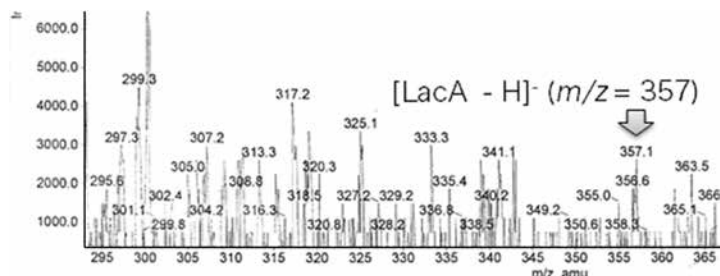
● 4. 食品用途に適したラクトビオン酸生産菌の検索 ●

筆者らの研究室では、発酵食品の発酵菌や食品生産に利用されている菌などを中心に数多くの種類の菌株のストックを保有し、食品、化粧品関連企業からのさまざまな依頼に利用している。ユニチカ株式会社生活健康事業部(現、株式会社ダイセル)との受託研究が始まり、この菌株ストックから、ラクトース酸化活性を示す菌の検索を行った。従来はラクトースに対し高い酸化活性を示すことを目安に検索を行ってきたが、この時は、食品に利用可能なことに主眼を置き、活性の強弱にこだわらずに検索を行った。その結果、高くはないものの、酢酸菌がラクトース酸化活性を示すことが分かった⁸⁾。詳細は後述するが、その後の研究で多くの酢酸菌がラクトース酸化活性を示すこ

とが明らかになり、特許を取得した⁹⁾。従来の酢酸菌の研究では酢酸菌の菌体や糖酸化酵素であるm-GDHはラクトースに対して酸化活性を示さないと報告されていたことから、この結果は意外なものであった⁷⁾。しかし、食品生産へ利用可能な菌からラクトース酸化活性が見つかったことで、研究は少しずつ実用化への道を歩み始めることとなった。

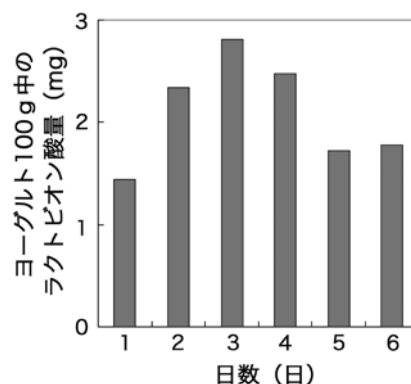
● 5. ラクトビオン酸の食経験の証明 ●

ラクトビオン酸を含む食品の報告はなく、食品用途のラクトビオン酸を実用化するためには、ラクトビオン酸を含む食品を見だし、ヒトがラクトビオン酸を長い歴史の中で食品から摂取してきたという、食経験の証明が不可欠であった。牛乳はラクトースを約5%含み、さらにその牛乳を発酵させた発酵乳製品では、その発酵の過程でラクトースの酸化が起これ、ラクトビオン酸が生成すると考え、市販のヨーグルトやチーズ、さらにはモンゴルの伝統的な乳のお酒、馬乳酒等を取り寄せ、それらの中に含まれるラクトビオン酸の検出を試みた。しかし、それらの中にラクトビオン酸を検出することはできなかった。そこで、それらのヨーグルトを種とし、研究所で自家製のヨーグルトを調製した。その時、ラクトビオン酸が生成しやすい好気的な条件での発酵や、高感度検出器を備えた質量分析計などの機器を使用し、できるだけラクトビオン酸が検出できるような条件で実



第2図 質量分析計によるカスピ海ヨーグルト中のラクトビオン酸の検出

さまざまな成分の中に埋もれるラクトビオン酸(LacA)の由来のシグナルを見逃さずに検出できた。



第3図 調製したカスピ海ヨーグルト中のラクトビオン酸量
市販のヨーグルトメーカーで牛乳を12時間発酵し、カスピ海ヨーグルトを調製した。調製したヨーグルトを4°Cで保存した。毎日100gのヨーグルトをサンプリングし、含まれるラクトビオン酸をHPAEC-PADにより定量した。

験を行った。その結果、唯一、弊所の研究員の自宅で継代されていた、自家製のカスピ海ヨーグルトにラクトビオン酸を見いだすことができた(第2図)⁸⁾。カスピ海ヨーグルトは黒海に面したジョージア共和国の伝統的なヨーグルトであり、家守幸男京大名誉教授がWHOの長寿地域の調査の際に、同国から日本に持ち帰った。その後、その本ヨーグルトから分離した発酵菌を含むヨーグルトの種菌がフジッコ株式会社から頒布されている。他のヨーグルトと異なり温度管理を厳にする必要がなく、家庭でも簡単に調製できることから、現在、多くの家庭でその種菌を元とした、自家製のカスピ海ヨーグルトが継代され、摂取されている。

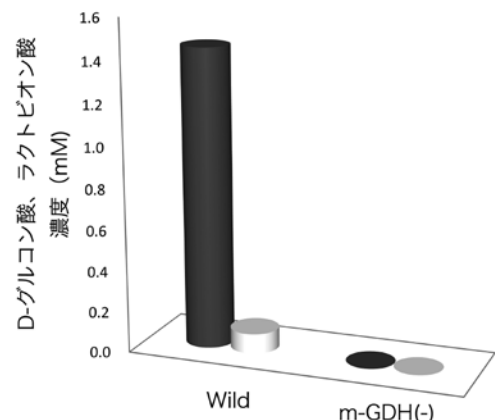
次に、ラクトビオン酸の年間摂取量を推定した。市販のヨーグルトメーカーでカスピ海ヨーグルトを調製した。牛乳600mLに100gのヨーグルトを種菌として添加し、12時間発酵、発酵後4°Cで保存した。毎日100gのヨーグルトを摂取すると考え、一日ごとに100gずつサンプリングし、その中に含まれるラクトビオン酸量を測定した。その結果、100gのヨーグルトを毎日摂取した場合、年間0.5~1.0gのラクトビオン酸が摂取できることを明らかにし、その食経験を証明した(第3図)⁸⁾。

●6. カスピ海ヨーグルト中のラクトビオン酸生産菌と酸化酵素の同定●

カスピ海ヨーグルトの発酵菌は乳酸菌である *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (クレモリス菌) だけでなく、酢酸菌である *Acetobacter orientalis* も発酵に関わることが報告されている¹⁰⁾。そこで、*L. lactis* subsp. *cremoris* KYG33 株 と *A. orientalis* KYG22 株をヨーグルトから単離し、それらの乳酸菌と酢酸菌のどちらが、ヨーグルト中にラクトビオン酸を生産するかを調べた。クレモリス菌のみで発酵させたヨーグルトとクレモリス菌及び *A. orientalis* の共発酵により調製したヨーグルト中のラクトビオン酸量を調べたところ、クレモリス菌のみで発酵した場合にはラクトビオン酸が検出されず、共発酵したヨーグルトにはラクトビオン酸が検出された。さらに、*A. orientalis* を培養、菌体を洗浄し、休止菌体^{かくはん}を調製した。この休止菌体を牛乳と混合し、振とう攪拌したところ、ラクトビオン酸の生成が確認されたことから、ラクトビオン酸は、*A. orientalis* により生産され、ヨーグルト中に蓄積することが分かった⁸⁾。さらに筆者らの研究室が所有する菌株ストックから、約 40 種の酢酸菌を選び、休止菌体を調製して、ラクトースを含む反応液で振とう攪拌した。ほとんどの酢酸菌がラクトースを酸化し、ラクトビオン酸を生成することが分かった⁹⁾。

一方、従来の研究では酢酸菌の菌体も酢酸菌の糖酸化酵素、m-GDH もラクトースを酸化しないと報告されていたため、筆者らの見いだしたラクトース酸化する酵素の正体は不明であった^{6, 7)}。*A. orientalis* KYG22 の基質特異性を調べたところ、D-グルコースに対する酸化活性を 100% とした際のラクトースに対する相対活性はわずか 0.04% であること、さらに、その他の酢酸菌でも D-グルコースに対する酸化活性と比較してラクトース酸化活性は極めて低いことが分かった。また、酢酸菌のラクトース酸化活性を調べると、至適 pH 等が pH 5.5 付近で、ジクロロフェノール

ルインドフェノールを電子受容体とすることなど、その性質が m-GDH と似ていることや、ラクトース酸化時に、D-グルコースを添加すると、ラクトース酸化活性は強く阻害される（おそらく競争阻害）ことが分かった^{9, 11)}。それらの結果から、筆者らは従来、ラクトースを酸化しないとされていた m-GDH は、微弱であるが、ラクトースを酸化すると考えた。そこで、m-GDH を過剰発現させた酢酸菌の菌株を調製した¹¹⁾。全塩基配列の解明されている酢酸菌、*Komagataeibacter medellinensis* (旧 *Gluconacetobacter xylinus*) NBRC3288 株の m-GDH 遺伝子と NBRC3288 株から抽出したプラスミドの断片を大腸菌用のベクターに組み込み、大腸菌⇄酢酸菌のシャトルベクターを構築、これを *Gluconobacter* 属の酢酸菌、2 種に組み込み m-GDH 過剰発現株を調製した。これらの過剰発現株の D-グルコース及びラクトース酸化活性を調べたところ、予想どおり、その両方の活性が上昇した。また、ゲノム上の m-GDH 遺伝子に相同的な組換えを利用し、クロラムフェニコール耐性遺伝子を組み込むことで、m-GDH をノックアウトした m-GDH 欠失株を調製した¹¹⁾。欠失株は D-グルコースに対する酸化活性だけでなくラクトース酸化活性も消失していた（第 4 図）。以上の結果から、酢酸菌のラクトース酸化



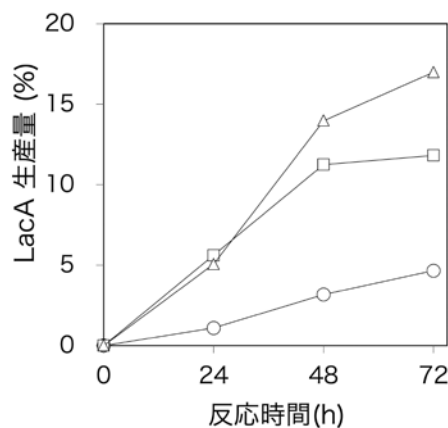
第4図 野生株及び m-GDH 遺伝子欠失株による D-グルコン酸とラクトビオン酸の生成
K. medellinensis NBRC3288 の野生株と m-GDH 欠失株(m-GDH(-)) を調製、それぞれの休止菌体を D-グルコース (■) またはラクトース (□) と反応させ、生成する D-グルコン酸とラクトビオン酸を HPAEC-PAD により定量した。

反応は m-GDH により触媒されていると結論付けた。m-GDH は膜酵素であり単離が困難であること、また、酸化の際に糖から引き抜いた電子を直接、酸素などの電子受容体に渡すことができず、細胞膜上に存在する電子伝達系を介し、最終的に酸素へと渡し、次の酸化反応を行うことから、m-GDH を菌体より分離、粗精製して、酸化反応を行うよりは、休止菌体として、生きた菌体そのものを利用し、膜上の電子伝達系を含めた酸化反応系としてラクトビオン酸生産に使用することが好ましいと考えられた。

● 7. 酢酸菌によるラクトビオン酸生産法の開発 ●

ラクトース酸化活性の高い酢酸菌の検索と選択を行った⁹⁾。その結果、*A. orientalis* や食酢の発酵に利用される *A. aceti* などの *Acetobacter* 属よりも、*Gluconobacter* 属や *Gluconacetobacter* 属の酢酸菌が、圧倒的に高いラクトース酸化活性を示すことが分かった。*Gluconobacter* 属や *Gluconacetobacter* 属の中でも最も活性の高い菌体を取得した。培養条件の検討を行い、酢酸菌の増殖や酸化活性の発現に適した条件を決定した¹²⁾。

さらに反応条件の検討を行った。ラクトース酸化反応のスピードを上げるために、基質であるラクトース濃度の上昇を試みた。筆者らの経験では、菌体反応を行う際、基質濃度を過度に上昇させると、菌体がダメージを受け反応が進まなくなることが、起こりやすい。しかし、酢酸菌は、高糖濃度の環境に耐性があるようで、基質濃度を 25℃でのラクトースの溶解限界濃度（約 30%）に上昇させても菌体がダメージを受けず、反応がスムーズに進むことが分かった（第 5 図）。また、通気攪拌の影響を調べた。筆者らは以前、子囊菌由来のラクトース酸化活性を示す酵素、Carbohydrate acceptor:oxidoreductase のラクトース酸化反応の研究を行っていた。本酵素は分子状酸素を直接、電子受容体として利用するため、反応液中への酸素の供給が滞ると反応は全く進まなくなった¹³⁾。



第 5 図 酢酸菌休止菌体を用いたラクトビオン酸の生産 *Gluconobacter frateurii* NBRC3285 の休止菌体を調製し、5% (○)、15% (□)、30% (△) ラクトースとラクトースの 1/2 モル等量の炭酸カルシウムとともに攪拌しながら反応させた。生成したラクトビオン酸を HPAEC-PAD により定量した。ラクトース濃度 30% に上昇させてもラクトースの酸化反応は進行した。

一方、酢酸菌の休止菌体は、全くの嫌気的な条件でも、ラクトース酸化速度が半分程度に低下するが、反応が進行するなど、酸素の供給条件が厳しくないことが分かった。大量の酢酸菌休止菌体を反応液に仕込んだ場合、酸化により反応液中の酸素が大量に消費され、酸素不足により、反応が停止することが懸念されたが、普通に反応液中に空気を通気するだけで、問題なく反応が進行することが分かった。その結果、基質濃度を上げるだけでなく、大量の菌体を添加して反応を行うことで、反応速度の上昇が可能であることが分かった。

また、酢酸菌がラクトースやラクトビオン酸に対して資化性を示さないことも幸いした⁹⁾。ラクトースやラクトビオン酸が分解され、酢酸菌に資化されると、収率が低下するが、それにもまして問題なのが、分解の過程で生成する D-グルコースは m-GDH の良好な基質であり、ラクトースの酸化を強く阻害する（おそらく競争阻害）ことであった。高ラクトース濃度や大量の菌体を反応に用いると、いかに微弱なラクトースやラクトビオン酸分解活性でも無視できず、D-グルコース生成による反応阻害が懸念されたが、酢酸菌がラクトースやラクトビオン酸への資化性を示さず、そういった心配が必要でないことが分かった。休



第6図 市販されているラクトビオン酸を成分として含む食品 (カラー図表をHPに掲載 C119)

止菌体によるラクトース酸化反応の条件の最適化を行った。その後、共同研究企業での工業化等の研究が行われ、酢酸菌によるラクトビオン酸生産の実用化が実現した。現在、ラクトビオン酸はラクトビオン酸含有乳糖発酵物として、株式会社ダイセルで生産と供給が行われ、市販のヨーグルト、サプリメントに配合され販売されている(第6図)。

●8. ラクトビオン酸以外のオリゴ糖の酸化●

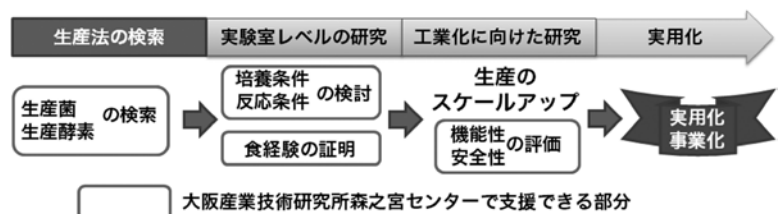
酢酸菌の糖酸化酵素を利用すれば、ラクトースだけでなく、その他のオリゴ糖を酸化することが可能である。例えば、マルトースに対する酢酸菌の酸化反応速度は、ラクトースの約2倍であることから、マルトースの酸化物であるマルトビオン酸は、ラクトビオン酸より効率的に生産できると考えられる^{8,9)}。また、現在のラクトビオン酸生産技術と設備をそのまま利用することができるのも大きな強みである。さらに、特筆すべきはイソマルトビオン酸である。イソマルトビオン酸の原料となるイソマルトースは α 1→6グルコシル結合でD-グルコースが二つ連なった二糖類である。酢酸菌の休止菌体の二糖類に対する作用性を調べると、ラクトースやマルトースと比較して、 α 1→6結合のイソマルトースや β 1→6結合のゲンチオビオースに対する活性は10～40倍と非常に高い¹⁴⁾。さらには、D-ガラク

トースとD-グルコースが α 1→6結合で連なったメリビオースに対しても同様に高い活性を示すことから、酢酸菌は α 、 β を問わず、1→6のグリコシル結合を持つ二糖類を効率よく酸化できることが分かった。また、m-GDHの欠失株や過剰発現株の研究から、 α 1→6結合を持つ二糖類を効率的に酸化する酵素は、ラクトースのそれと同様に、m-GDHであることを確認した¹⁴⁾。イソマルトースを主成分として含む、イソマルトオリゴ糖は最も安価な機能性オリゴ糖として知られ、市場で市販されている。この市販されているイソマルトオリゴ糖を原料とし、酢酸菌の休止菌体による酸化でイソマルトビオン酸を生産すれば、ラクトビオン酸より安価にオリゴ糖アルドン酸を生産できるものと期待されている。

●9. 終わりに(食品、化粧品素材開発へのソリューションの提供)●

本稿に記載したラクトビオン酸以外でも、筆者らの研究室では、多くの食品や化粧品関連企業からの依頼を受け、特許の共同出願や研究のサポートを行ってきた。その経験を元に、企業における微生物や酵素を利用した食品、化粧品素材の開発に対し、スタートアップから工業化の手前までサポートできるような体制を整えている(第7図)。

開発の初期では、目的にあった微生物や酵素の検索と選択を行う必要がある。筆者らの研究室では、発酵食品の発酵菌や食品生産に利用されている菌株のストック(第4章参照)だけでなく、産業用の酵素メーカーから各種酵素剤のサンプルを提供してもらい、検索に利用できる酵素剤のストックも用意している。これらの菌株や酵素ストッ



第7図 大阪産業技術研究所が提供する食品や微生物を用いた食品素材の開発支援のロードマップ (カラー図表をHPに掲載 C120)

クを利用すれば、目的とする反応を触媒する菌株や酵素剤の検索を手軽に行うことができる。さらに、土壌から目的の菌を取得するノウハウも持っている。目的の菌や酵素の培養や反応条件の検討では、試験管や坂口フラスコから始め、20 Lのジャーファーマンターでの条件検討を行うことで、工業生産へのスケールアップのための予備データの取得が可能となっている。

食品等への新規素材の利用に関しては、その素材の食経験の証明が必須となるが、弊所では各種カラムをはじめ、さまざまな分離精製の技術を用意しており、食品に含まれる目的の物質の分離と定量の研究が可能である。また、研究所には筆者らの属する生物系の研究部の他にも、物質の構造の同定を得意とする分析化学系の研究部も併設している。これらの研究部の技術は、目的物質の同定や定量に大いに力を発揮している。目的物質の機

能性の評価では、試験管や動物細胞等を用いた各種 *in vitro* 系の評価が可能であり、動物試験やヒト試験の予備データとして活用していただいている。

上記の様に弊所ではさまざまな研究依頼へ対応できる体制を用意している。技術相談は、訪問や電子メールを問わず無料となっている。また、大阪府・市が設置団体となっている公設試ではあるが、大阪地域に限らず日本全国の企業の依頼に対応しているので、企業の所在地にこだわることなく、お気軽にご相談していただきたい。

本研究の一部は研究成果最適展開支援プログラム A-STEP【FS】シーズ顕在化タイプ (AS251Z02196M) 及び科研費 (15K06593) の助成を受けたものである。

参 考 文 献

- 1) R. Brommage, C. Binacua, S. Antille, and A. L. Carrié: *J. Nutr.*, **123**, 2186-2194 (1993).
- 2) 木村隆: 新規機能性糖質「ラクトビオン酸」のアンチエイジング作用, *食品工業*, **54**, 3-7 (2011).
- 3) 村上洋: 機能性糖質素材の開発と食品への応用, シーエムシー出版, pp.2321-240 (2005).
- 4) 角田利孝, 佐橋佳一: ラクトビオン酸カルシウムの簡易合成法 (第1報), *日本農芸化学会誌*, **24**, 176-177 (1950).
- 5) 市川吉夫: 京都工芸繊維大学繊維学部学術報告, **4**, 271-277 (1965).
- 6) J. DeLey and J. Schell: *J. Bacteriol.*, **77**, 445-451 (1959).
- 7) M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita, and O. Adachi: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 851-861 (1981).
- 8) T. Kiryu, T. Kiso, H. Nakano, K. Ooe, T. Kimura, and H. Murakami: *J. Daily Sci.*, **92**, 25-34 (2009).
- 9) T. Kiryu, T. Kiso, H. Nakano, and H. Murakami: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 1712-1718 (2015).
- 10) T. Ishida, A. Yokota, Y. Umezawa, T. Toda, and K. Yamada: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **51**, 187-193 (2005).
- 11) 桐生高明ら: 日本農芸化学会大会要旨集, 2A34p09 (2015).
- 12) T. Kiryu, H. Nakano, T. Kiso, and H. Murakami: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 361-363 (2012).
- 13) T. Kiryu, H. Nakano, T. Kiso, and H. Murakami: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 833-841 (2008).
- 14) 桐生高明ら: 日本応用糖質科学会平成25年度大会要旨集, p.46 (2014).
- 15) H. Murakami, J. Kawano, H. Yoshizumi, H. Nakano, and S. Kitahata: *J. Appl. Glycosci.*, **49**, 469-477 (2002).
- 16) 桐生高明, 山内康平, 益山新樹, 木曾太郎, 中野博文, 村上洋: 第9回関西グライコサイエンスフォーラム要旨 (2008).
- 17) Y. Nishizuka: *J. Biol. Chem.*, **237**, 2721-2728 (1962).
- 18) M. Ameyama, M. Nonobe, E. Shinagawa, K. Matsushita, K. Takimoto, and O. Adachi: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 49-57 (1986).
- 19) M. Zachariou and R.K. Scopes: *J. Bacteriol.*, **167**, 863-869 (1986).
- 20) T. Kiryu, H. Nakano, T. Kiso, and H. Murakami: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 833-841 (2008).
- 21) F. Xu, E. J. Golightly, C. C. Fuglsang, P. Schneider, K. R. Duke, L. Lam, S. Christensen, K. M. Brown, C. T. Jørgensen, and S. H. Brown: *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1136-1142 (2001).
- 22) S. F. Lin, T. Y. Yang, T. Inukai, M. Yamasaki, and Y. C. Tsai: *Biochim. Biophys. Acta*, **1118**, 41-47 (1991).