

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04484

研究課題名(和文)オリゴ糖・多糖・配糖体の酵素合成の分子基盤的研究

研究課題名(英文)Enzymatic synthesis of oligosaccharides, polysaccharides, and glycosides

研究代表者

森 春英 (Mori, Haruhide)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：80241363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖質は、構成単糖と結合様式と重合度によって顕著な多様性を持つ分子群である。有用化合物が多数存在すると予想されるが、機能性の解析には潤沢な化合物が必要であり、効率的な大量合成系確立が必須である。本研究では、天然に豊富に存在する糖質からの転換として、合成酵素と転移酵素を利用した高度な糖質合成系確立を実施した。合成酵素利用では、ショ糖を出発物質として合成酵素の基質(UDP-Glcなどの糖ヌクレオチド)を供給するワンポット反応により二糖の合成系を確立した。新規転移酵素はマルトオリゴ糖に作用し、グルコース単位での転移反応を触媒する酵素群を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Carbohydrate includes a wide variety of molecules because of the diversity of constituent monosaccharides, linkages, and degrees of polymerization. They are highly expected to contain functional compounds useful for human life. Therefore, various synthetic methods are required for synthesis of various saccharides. In this study, enzymatic conversion from highly abundant carbohydrates in nature was established with two types of enzymes: glycoside synthase and glycosyl transferase. In the method with synthase, sugar nucleotides, substrates for glycoside synthases, were provided from sucrose, and disaccharides were efficiently produced through the one-pot reactions. A new group of glycosyl transferases were found. The enzymes in it acted on maltooligosaccharides and catalyzed glucosyl transfer reactions.

研究分野：生物化学

キーワード：糖質合成 酵素利用 糖ヌクレオチド 糖転移酵素

1. 研究開始当初の背景

糖質は顕著に多様性を有する化合物の一群である。単糖自体の多様性（ジアステレオマーならびにそれぞれが取り得る環状構造）に加えて単糖ユニット間を結ぶグリコシド結合の多様性によって相乗的に理論的化合物の種類が増大する。重合度も含めれば、糖質の種類は無限にあると言える。それぞれの構造の違いはわずかであっても、異なる化合物は異なる性質を示す。味覚、消化性、あるいは安定性（エネルギー）の違いに加えて、生物に対して特殊な生理作用を示す機能性を有する物もある。単純なグルコースのみからなる 1-6 結合のグルコオリゴ糖（イソマルトオリゴ糖）や 1-3 グルカンであっても、それぞれ腸内細菌叢の改善効果、抗腫瘍・高血圧抑制効果があるとされる等、機能性食品や医薬品として有用なものも多い。配糖体も含めて新規機能物質開拓の宝庫であると言える。ただし新規「機能」を見出すためには、まずは「物質としての糖質」が必要である。天然あるいは農産物加工品として澱粉やショ糖などは豊富で安価に容易に入手できる糖質である。これらを材料とした効率的変換技術の確立が望まれる。

糖質の合成法として、複雑な糖質の精密合成には現在でも有機化学的手法が欠かせない。しかし保護基の選択的導入等の煩雑さを伴い、微量合成にしか適さない。これに対し、酵素法では、酵素の反応特異性が高いため、適切な酵素の選択によって、特異的生成物の合成が可能となる。一般にオリゴ糖合成に用いる酵素は以下のように大別できる。(a)糖ヌクレオチドを糖供与体とする合成酵素、(b)糖転移酵素、(c)加水分解酵素、(d)加リン酸分解酵素。天然のオリゴ糖・多糖合成（糖の高重合度化）の多くは(a)による。しかし基質（糖供与体）として糖ヌクレオチドが必要であり、大量合成には不適とされてきた。(b)はショ糖等からのデキストラン（1-6 結合 Glc 多糖）合成酵素等あげられるが、酵素の種類が限定的であり、限られたオリゴ糖・多糖合成にしか使えない。(c)は、高濃度糖質存在下で生じる(b)様の転移活性を利用する。酵素の種類が豊富、かつ一般的に安定で使いやすいため、工業的オリゴ糖生産にも汎用される。ただし糖転移の特異性が緩く、副生成物を生じ、数段にわたる精密合成には向かない。加えて、本来の加水分解活性を抑制するために反応のコントロールが欠かせない。水解活性を抑制した変異酵素を使用するグリコシターゼも開発されたが、特殊基質が必要で有り、糖質を大量に安価に生産する目的には適さない。(d)は特異性が高く合成に適すると近年実用的オリゴ糖合成への応用が進むが、酵素種類がきわめて限られている。

2. 研究の目的

本研究は、(d)加水分解酵素を利用したオリゴ糖合成に加え、元来天然でオリゴ糖・多糖合成を担う(a)合成酵素や(b)転移酵素を糖質

合成ツールとして積極的に活用するためのシーズ技術確立を目的とした。これらを利用する上で、(d)では転移生成物の制御と収率向上、(a)では基質が高コスト、(b)では酵素種類が少ないことが問題として上げられていた。すなわち、(a)合成酵素は UDP-Glc 等の糖ヌクレオチドの糖を受容体分子に順次転移する反応によって配糖体やオリゴ糖・多糖を生成するが、UDP-Glc は天然に豊富に得られる基質ではない。細胞内では一般に UTP と Glc1P から UDP-Glc ピロホスホリラーゼにより合成されるが、UTP も UDP-Glc 自体も合成材料としては高額であり、大量合成に使えるようなものではない。本研究では、これを解決する方法として、ショ糖合成酵素 (Sucrose synthase, SuSy) を用いた。SuSy は、UDP-Glc と D-Fru からのショ糖 (Glc-Fru) 合成を触媒する。逆反応では UDP-Glc を生成する。平衡は $K_{eq}=0.15$ 程度でショ糖合成側に片寄るが、植物では UDP-Glc 生成酵素としても機能する。これに合成酵素 (GT) を組み合わせると、ワンポットでショ糖と受容体分子から目的生成物を合成できると考えられ、これを本研究では実証することを目的とした。(b)転移酵素については、酵素の種類を増加させる必要から、新規転移酵素グループの探索を行うこととした。すなわち DD 酵素を中心に取り上げ、近縁タンパク質についての解析を進めることとした。DD 酵素は澱粉由来マルトオリゴ糖 (グルコースユニットが 1-4 結合したオリゴ糖) を出発材料として、転移反応により 1-4 結合を 1-6 結合につなげ直す反応を進めて結果 1-6 結合のイソマルトオリゴ糖や同結合からなる多糖デキストランを生成する。デキストランは一般的にはショ糖を供与体とする転移酵素により合成されるが、これに比べ、安価な澱粉分解物を利用できる点、対原料収率が高い点 (ショ糖利用では Fru 分が全く利用されない) で物質生産上の利点がある。本酵素は、転移酵素ながらアノマー反転型加水分解酵素群 GH15 に分類される触媒ドメインを有す。アノマー反転型酵素は反応機構上糖転移反応を触媒せず、極めてレアな酵素と言える。近年の配列情報の爆発的増加に伴い、分子系統樹上で DD 酵素と近接するクラスターが出現した。この一群の GH15 群タンパク質の解析を行い、新規活性探索と GH15 群酵素も含めた DD 関連酵素の構造機能相関を進めこととした。

3. 研究の方法

スクロースシンターゼ SuSy としては植物由来の酵素を大腸菌組換え酵素として生産し精製して使用した。各種変異酵素は常法に従い作成し、野生型同様に精製した。DD 酵素および関連酵素はデータベースの配列情報を用い、菌株から PCR または DNA 全合成により遺伝子を得、適宜高発現ベクターに組み込み、タンパク質生産に適した培養条件を検討の後、Susy 同様に酵素タンパク質を調製した。

糖ヌクレオチドを利用する転移酵素(以下GT)としてトレハロースリン酸シンターゼを用いた。これはUDP-GlcとGlc6Pからトレハロース6リン酸(Tre6P, Glc 1-1 Glc6P)を合成する酵素である。Tre6Pは合成酵素とは別途ホスホリラーゼを利用した合成も行った。ここではTre6Pホスホリラーゼを使用した。加水分解酵素としては、土壌からの単離菌由来の高糖転移活性 α -グルコシダーゼの天然酵素および組換え酵素を用いて解析した。

4. 研究成果

植物 SuSy はスクロース合成の逆反応, すなわちスクロースの加NDP分解において, 一般にはUDPに対して高い基質特異性を示す。これについて確認した。組換えスクロースシンターゼ SuSy の 50 mM スクロース存在下での 1 mM NDP に対する特異性は, 高いものから降順に UDP, TDP, ADP, CDP, GDP となった。UDP に対する速度は一般的 Susy の既報値と同程度に高く, これに対し CDP および GDP に対する速度は顕著に低かった。NDP 結合への関与が予想されるアミノ酸の置換により, この特異性のドラスティックな改変が可能であった。変異酵素はUDPに対する速度の大きな低下と, ADP に対する速度の大きな増加を示し, これにより kcat/Km ベースでADPに対して4倍近く高い特異性を示した。本成果は, スクロースを出発材料としてUDP-Glcの供給に加えて, 本変異酵素使用によりADP-Glcも効率的に提供することを可能とするものである。次に, SuSy と GT の組み合わせによる Tre6P の酵素合成についてである。酵素として Susy と Tre6P 合成酵素, 糖質材料としてスクロースと Glc6P, これに低濃度の UDP を加えたものを反応液とした。やや長時間の反応時間を要しながらもほぼ材料とした Glc6P 当量の Tre6P が合成された。Tre6P 生成濃度は本反応液の UDP 初濃度の 50 倍に達した。これは SuSy によるスクロースの加UDP分解に利用される UDP が, GT 反応による Tre6P の生成に伴って遊離してリサイクルされていることを示す。既報の Susy-GT 系での糖質合成いずれと比べて, 生成物 Tre6P の生成量・合成収率ともに高く, 優れた合成事例を示すことができた。NDP 特異性改変酵素作出と併せて, 本手法の糖質合成への応用を拓くものである。なおここで合成ターゲットとした Tre6P は, 一般的なトレハロース合成系における生成中間体であるが, 近年植物において生長やストレス耐性の調節, ならびに炭素フラックスの制御等に関わる生理活性調節シグナル物質として注目が集まる化合物である。本研究では, この Tre6P を上記 SuSy-GT 系での合成に加えて, 加リン酸分解酵素による合成も行った。既報の *Lactococcus lactis* 由来の Tre6P 加リン酸分解酵素を利用し, 加リン酸分解の逆反応, すなわち Glc1P と Glc6P を基質として Tre6P の合成を行った。加えて, 本

加リン酸分解酵素の基質特異性解析から, Man6P にも低活性ながら作用することが見いだされた。Glc6P に代えて Man6P を用いた結果, 長時間の反応により新規糖リン酸 Glc 1-1 Man6P が比較的高い収率で合成できる事が示された。

転移酵素に関し, アノマー保持型 α -グルコシド加水分解酵素群である GH15 に唯一含まれる転移酵素(DD 酵素)に注目し, その類縁配列を有するタンパク質群の酵素について解析を行った。酵素 TS15A 大腸菌組換え酵素は, GH15 群のほとんどを占める加水分解酵素グルコアミラーゼやグルコデキストラナーゼなどと異なり, 主として転移反応を示した。すなわち DD 酵素周辺の一環が転移酵素であると強く示唆される。TS15A はマルトオリゴ糖基質に対しては主として α -(1-4)-グルコシル転移を, イソマルトオリゴ糖基質には主として α -(1-6)-グルコシル転移を触媒する。すなわち, DD 酵素様の反応を基本とするが, 多糖デキストランの生成は確認されない。二糖マルトースおよび単糖グルコースに対しては, α -(1-4)に加え α -(1-6)-グルコシル転移も触媒し, それぞれパノース, イソマルトースおよびそれらに更に α -(1-6)グルコシル転移したと予想されるオリゴ糖を生成した。マルトオリゴ糖, イソマルトオリゴ糖どちらに対しても3糖以上を良い基質とし, かつマルトオリゴ糖をイソマルトオリゴ糖よりも良い基質とした。マルトオリゴ糖を基質とした長時間の反応生成物変化を解析すると, 順に(1)マルトオリゴ糖の鎖長分布の不均化により各種マルトオリゴ糖の生成, (2)マルトースへの 1-6 転移によるパノースと更にパノースへの 1-6 転移産物と予想されるものの蓄積, (3)グルコースへの 1-6 転移により純粋な α -(1-6)結合以外を含まない)イソマルトオリゴ糖の蓄積, が観察された。

本酵素はわずかに加水分解活性も示す。可溶性デンプンからは, 重合度の漸減を伴わずにグルコースの生成が確認され, 加水分解活性を有することが明示された。本反応は継続させると次第に生成したグルコースへの 1-6 転移が進み, 結果として可溶性デンプンから純粋なイソマルトオリゴ糖が生成される。澱粉からは, グルコースに限らず, 各種グルコ二糖, スクロース, メチル α -グルコシド, pNP α -グルコシド, および pNP β -グルコシドを糖受容体とした反応が進行し, 本酵素の糖転移能の高さ, 各種化合物のグリコシレーションへの応用展開の可能性を示すことが出来たと考える。

本研究では, 加水分解酵素による糖転移反応についても検討を進めた。特に土壌細菌 *Bacillus* 属 AHU2216 の α -グルコシダーゼについて機能解析および構造解析を行い, 酵素の特徴を明らかにするとともに構造機能相

関解析を行った。本酵素は GH13 に属す α -グルコシダーゼであり、グルコースを構成糖として 1-4 結合により重合したマルトオリゴ糖を基質とした。一般には三糖に対して高い基質特異性が示されるところ、本酵素は二糖マルトースを最も良い基質とした (kcat/Km ベース)。 K_{TG} (転移反応と全反応の速度比すなわち転移率が 50% となるときの基質濃度。この基質濃度において、糖転移速度と加水分解速度が同じになる。値が低いほど糖転移率が高い) は基質 PNP-Glc に対しては 2.5 mM, マルトースに対しては 22 mM であり、一般の GH13 グルコシダーゼと比べて、糖転移する酵素と評価された。糖転移反応により新たに生成する結合も 1-4 結合であり、すなわちマルトオリゴ糖の単糖単位での転移反応により鎖長を不均化する酵素であった。一般酸塩基触媒基変異酵素 (顕著に低活性) とマルトオリゴ糖複合体の構造を決定した。1-4 結合基質への特異性に関わる一連の構造因子、二糖特異性に関わる、三糖との結合に不利な構造因子について明らかにした。興味深い点としては、二糖に対する特異性の高い酵素ながらも三糖、四糖との複合体構造が得られたことである。これらの複合体ではマルトオリゴ糖基質はエネルギー的に不利なコンフォメーションをとっており、結合はできるが速度は低下する原因であると考えた。本酵素の高い転移能に関係するとも考えられ、GH13 群の加水分解酵素の高転移能化に展開しうる成果であると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Auiewiryanukul W, Saburi W, Kato K, Yao M, Mori H: Function and structure of GH13_31 α -glucosidase with high α -(1-4)-glucosidic linkage specificity and transglucosylation activity. FEBS Lett. 2018 印刷中。査読有り

2. Ma Min, Okuyama Masayuki, Sato Megumi, Tagami Takayoshi, Klahan Patcharapa, Kumagai Yuya, Mori Haruhide, Kimura Atsuo: Effects of mutation of Asn694 in *Aspergillus niger* α -glucosidase on hydrolysis and Transglucosylation. Applied Microbiology and Biotechnology 101, 6399-6408, 2017. 査読有り
Doi: 10.1007/s00253-017-8402-6

3. Taguchi Yodai, Saburi Wataru, Imai Ryojo, Mori Haruhide: Evaluation of acceptor selectivity of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* trehalose 6-phosphate phosphorylase in the reverse

phosphorolysis and synthesis of a new sugar phosphate. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 81, 1512-1519, 2017. 査読有り

Doi: 10.1080/09168451.2017.1329620

4. Okuyama M, Saburi W, Mori H, Kimura A: α -Glucosidases and α -1,4-glucan lyases: structures, functions, and physiological actions. Cell Mol Life Sci 73, 2727-2751, 2016. 査読有り

Doi: 10.1007/s00018-016-2247-5

5. Ye, Y., Saburi W, Odaka, R., Kato, K., Sakurai, N., Komoda, K., Nishimoto, M., Kitaoka, M., Mori H, and Yao, M.: Structural insights into the difference in substrate recognition of two mannoside phosphorylases from two GH130 subfamilies. FEBS Lett, 590, 828-837, 2016. 査読有り

doi: 10.1002/1873-3468.12105.

6. Masuda Y, Okuyama M, Iizuka T, Nakai H, Saburi W, Fukukawa T, Maneesan J, Tagami T, Naraoka T, Mori H, Kimura A.: Purification and characterization of a chloride ion-dependent α -glucosidase from the midgut gland of Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*). Biosci Biotechnol Biochem., 80, 479-85, 2016. 査読有り
doi: 10.1080/09168451.2015.1116926.

7. Sadahiro J, Mori H, Saburi W, Okuyama M, Kimura A: Biochemical and biophysical research communications extracellular and cell-associated forms of *Gluconobacter oxydans* dextran dextrinase change their localization depending on the cell growth. Biochem Biophys Res Commun, 456, 500-505, 2015. 査読有り
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.

8. Shen, X., Saburi W, Gai, Z., Kato, K., Ojima-Kato, T., Yu, J., Komoda, K., Kido, Y., Matsui, H., Mori H, and Yao, M., Structural analysis of α -glucosidase HaG provides new insights into substrate specificity and catalytic mechanism, Acta Crystallogr. Sect. D, 71, 1382-1391, 2015. DOI: 10.1107/S139900471500721X 査読有り

[学会発表] (計 14 件)

1. 竹田夏美, 三島英莉, 佐分利亘, 貞廣樹里, 木村淳夫, 森春英: TsGH15A の各種基質に対する糖転移反応の解析。日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年 3 月 16 日, 名城大学 (愛知県・名古屋市)

2. 三島 英莉, 竹田夏美, 佐分利亘, 貞廣樹里, 木村淳夫, 森春英: GH15 ドメイン保有酵素が示す糖転移反応の解析. 日本応用糖質科学会平成 29 年度大会, 2017 年 9 月 6 日, 日本大学湘南キャンパス(神奈川県・藤沢市)

3. Waraporn Auiewiriyankul, Wataru Saburi, Koji Kato, Min Yao, and Haruhide Mori: Function and structure of α -glucosidase BspAG13A from a soil bacterium, *Bacillus* sp. SW22. 日本応用糖質科学会平成 29 年度大会, 2017 年 9 月 6 日, 日本大学湘南キャンパス(神奈川県・藤沢市)

4. Auiewiriyankul, W., Saburi, W., and Mori, H.: Characterization of α -(1 \rightarrow 4)-linkage-specific GH13_31 α -glucosidase from *Bacillus* sp. SW22 (BspAG13A) with high transglucosylation activity. 6th Symposium on the Alpha-Amylase Family, 2016 年 9 月 12 日および同 14 日, スモレニツ(スロバキア)

5. Chen, Y., Saburi, W., and Mori, H.: Efficient production of glycosides of natural compounds through transglucosylation of *Aspergillus niger* α -glucosidase in the presence of organic solvents. International Conference on Agricultural Biodiversity and Sustainability 2016, 2016 年 8 月 22 日~2016 年 8 月 24 日, 北海道大学農学部(北海道・札幌市)

6. 田口陽大, 佐分利亘, 今井亮三, 森春英: マルトースを出発物質とするトレハロース 6-リン酸の酵素合成法の確立. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 30 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

7. 貞廣樹里, 森春英, 佐分利亘, 奥山正幸, 木村淳夫: *Gluconobacter oxydans* 由来の菌体外酵素 dextran dextrinase は自らの生成物デキストランによって細胞表層から遊離する. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 30 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

8. Yuya Kumagai, Weeranuch Lang, Juri Sadahiro, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, and Atsuo Kimura: Enzymatic synthesis of functional linear isomalto-megalosaccharide by *Gluconobacter oxydans* dextran dextrinase. 11th Carbohydrate Bioengineering Meeting, 2015 年 5 月 10 日~2015 年 5 月 13 日, Espoo (Finland).

9. 川田恭平, 藤本瑞, 鐘ヶ江倫世, 西村崇志, 奥山正幸, 森春英, 木村淳夫: Isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyl-

transferase の構造と触媒部位の機能性アミノ酸残基の同定, 日本応用糖質科学会平成 27 年度大会, 2015 年 9 月 16 日~2015 年 9 月 18 日, 奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 春英 (MORI, Haruhide)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 80241363

(2) 研究分担者

佐分利 亘 (SABURI, Wataru)
北海道大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号: 00598089