

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03801

研究課題名(和文)メガロ糖研究の新展開：優れた機能を発揮する新しいメガロ糖の構築とその応用

研究課題名(英文) Further development of megalosaccharide research: synthesis and application of novel megalosaccharides displaying excellent functions

研究代表者

木村 淳夫 (KIMURA, Atsuo)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：90186312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は初めてメガロ糖を酵素生産し、難溶性化合物を可溶化する機能を見出した。しかしながら、我々のメガロ糖研究の歴史は浅く、解決すべき課題が山積する。本研究の目的は、それらの中で重要な3課題について打開を図るとともに、基礎知見を取得し、応用進展させることである。すなわち、1)メガロ糖生産を可能にした多糖合成酵素の分子機構究明、2)より高機能な新しいメガロ糖の構築、3)メガロ糖を用いたアゾ色素汚染の改善である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義として、多糖合成酵素において、多糖やメガロ糖の生産に関与する部分領域を推定し、その責任アミノ酸を同定することで、合成機構を新たに提案した。アミラーゼ耐性メガロ糖やグルコース型メガロ糖を新しく作製し、これらの糖質にも難溶性化合物の水溶化現象を見出した。本研究から難溶性食品素材の可溶化・アゾ色素の分解などのメガロ糖を活用する応用技術が考案され、社会貢献を実現できる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in production of megalosaccharides and found their valuable function to solubilize water-insoluble compounds. However, the period of our research is very short, so that we have many problems that must be solved. This project challenges a resolution of three important problems, from which we will obtain the fundamental knowledge about megalosaccharides. Furthermore, it also contributes to the development of application research on megalosaccharides. The purposes of this program are 1) analysis of molecular mechanism of polysaccharide-forming enzyme to produce megalosaccharide, 2) synthesis of new megalosaccharide with high functionality, and 3) improvement of azo-dye pollution using megalosaccharide.

研究分野：生物化学

キーワード：メガロ糖 機能解析 可溶化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

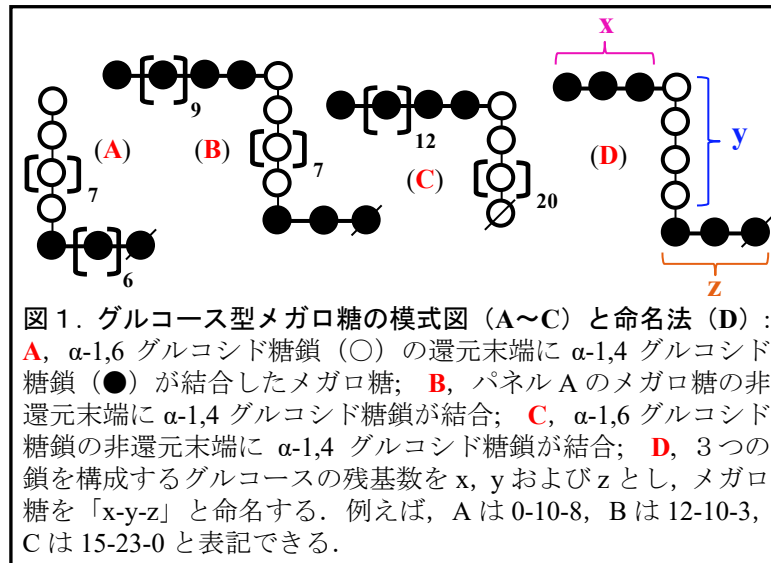
1. 研究開始当初の背景

(1) 背景

メガロ糖は、構成する単糖数が10から多糖までの糖質として約60年前に定義された。多糖の単糖数が不明であるが、一般に多糖の性質が100~200以上で出現することから、メガロ糖は10~100 (あるいは10~200) の単糖を有する糖質と捉えられる。しかしながら、生産する方法がないことから長年にわたり機能が不明のままであった。一方、我々は改変した多糖合成酵素を使用することで、ようやくメガロ糖を取得できた。その機能を調べると、水に難溶性な化合物を可溶化させた。例をあげると、食品素材フラボノイド・アゾ色素・薬剤であり、これらを水溶化できる現象である。一方、医薬品などを水溶性と膜透過性の性質から4つのクラス (BCS I~IV) にグループ化する提案が知られている。特に難水溶性・高膜透過性を示すBCS IIには生理的に重要な化合物が属し、これらの活用のため水溶性の向上が推奨される。興味深いことに前述の3化合物はBCS IIに分類され、我々は本点に着眼し更に研究を重ね「メガロ糖がBCS II化合物の水溶化を促進」を明らかにした。この発見は、BCS II化合物の利用範囲を広げ、メガロ糖の多彩かつ新規な用途開発の可能性を示唆した。実際、メガロ糖によるフラボノイドの可溶化で小腸吸収が促進される現象が見出された。

(2) 動機

以上は、グルコースから構成されたメガロ糖 (図1) から得られた成果であるが、この優れたグルコース型メガロ糖はアミラーゼなどの酵素による分解を受け、機能が低下する欠点を内含していた。この他にも解決せねばならない問題が山積しており、その理由は我々のメガロ糖研究の歴史が浅いことに起因した。このような経緯から研究開始当初に存在していた課題の打開を目指し、当該プロジェクトを開始した。

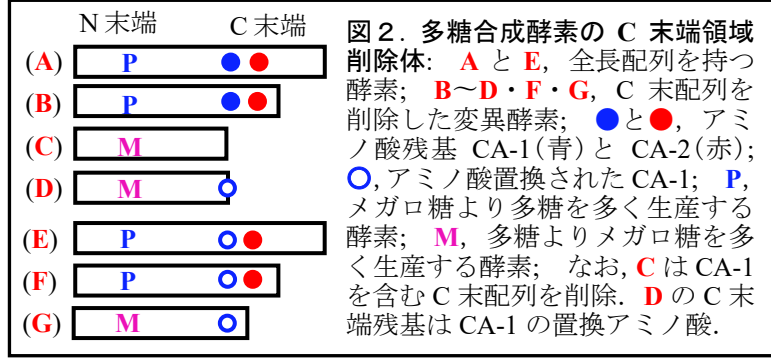


2. 研究の目的

解決すべき数多くの課題があるが、本研究では特に重要な次の3課題を取り上げた。以下に簡単な説明を行う。

(1) 多糖合成酵素の分子機構

本酵素 (図2-A) はグルコース型メガロ糖を生産するが、その合成能力は弱い (本酵素が産するメガロ糖は図1-A) が、C末端領域を削除すると飛躍的に高まる (図2-C)。従って、当該領域にメガロ糖の生産を促す構造因子 (機能を担うアミノ酸残基やその配列など) の存在が予想される。さらなる削除実験からC末端側の限られた配列内にあり、かつ1残基のアミノ酸 (CA-1 と略) が有力な構造因子の候補であることが確認された。また、CA-1以外の因子も想定された。当該課題の目的は、メガロ糖生成の分子解析であり、構造因子の推定・構造因子の機能究明・構造因子の普遍化を図ることである。



(2) 新しいメガロ糖の構築

グルコース型メガロ糖が示すBCS II可溶性には、その $\alpha$ -1,4グルコシド糖鎖 (図1-A, B, C) が効果を増強させる。1項(2)の「動機」で述べたが、本 $\alpha$ -1,4糖鎖はアミラーゼ消化を受け、食品素材と併用摂食すると消化管内で分解される。本課題の解決を意図し、アミラーゼ耐性型のメガロ糖を構築する。またグルコース型ではあるが、従来の標品を上回る水溶化能を示す新たなメガロ糖の構築と機能解析を行う。さらにメガロ糖の併用や他の可溶化材料の共存によるBCS II化合物水溶化の相乗効果を調べる。

(3) アゾ色素汚染の改善効果

難溶性アゾ色素は我が国では用いられないが、国外では広範囲に使用が継続されていた経緯がある。特に染色工場から河川や湖沼に排出されると、難水溶性のため生物分解が進まず、河底や湖底に蓄積し、深刻な環境汚染を招く。本研究では、アゾ色素が混入した土壌を対象に、メガロ糖を活用した色素分解法を確立させる。すなわち、メガロ糖を用いて土壌から色素を可溶化させ、

酵素分解を効率的に促進させる手法を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 多糖合成酵素の分子機構

本酵素やその変異体の機能は「多糖とメガロ糖の生産量比」から解析した。すなわち、反応初期の初速度ではなく、長時間の反応で形成する多糖とメガロ糖の生産量の割合から求めた。その理由は、反応の初期段階では短鎖オリゴ糖生成のみが生じ、当該オリゴ糖の蓄積後に多糖やメガロ糖が出現するからである。具体的には、一定時間の反応後にアルコール分画で多糖とメガロ糖を分離し、全糖分析（フェノール硫酸法）で測定した両者の値から、生産比を算出した。一方、初速度は短鎖オリゴ糖合成で生じる生成物を定量し求めた。構造因子の普遍化実験は、レバン合成酵素の構造因子をインベルターゼに導入させて行い、生成するオリゴ糖の種類や量的な変化をイオン交換型高速クロマトグラフィーを用いて調べた。なお、各酵素の変異体作製や多糖合成酵素の結晶化は定法に従った。

#### (2) 新しいメガロ糖の構築

アマラーゼ耐性型メガロ糖は、食用可能な多糖を化学分解や酵素分解で行い調製した。単離はアルコール分画や膜分離を用いた。新しいグルコース型メガロ糖は、2種類の転移酵素を使用し構築した。分子サイズは、質量分析・核磁気共鳴・化学法（全糖分析値を還元値で除する）で求めた。可溶性は、BCS II に属す食品素材あるいはアゾ色素を用いて推定した。すなわち過剰量が存在する水溶液に、一定量のメガロ糖を添加させ、十分に混合・遠心分離し、回収した上清に存在する BCS II 化合物の溶解量を求めて行った。なお、グルコース型メガロ糖の命名法を図 1-D に示す。

#### (3) アゾ色素汚染の改善効果

アゾ色素はメチルレッドを用い、大学キャンパスから採取した土壌と混合した。この色素試料にメガロ糖とアゾ色素分解酵素を加え、メチルレッドの分解実験を行った。効率化を目指し、反応容器を使用した。

### 4. 研究成果

#### (1) 多糖合成酵素の分子機構

全長を有する多糖合成酵素（野生型酵素；図 2-A）において CA-1 のみを置換した（図 2-E）が、多糖とメガロ糖の生産能力に変化がなく、多糖を多く生産した。これは、CA-1 以外の構造因子の存在を強く支持する結果となった。そこで C 末端領域の削除（様々な長さの C 末配列を有する変異体の構築）と CA-1 置換を組み合わせ、第 2 因子の推定実験を行った。すなわち、C 末削除体とその CA-1 置換体を構築し、多糖とメガロ糖の合成割合を比較した。まず、削除体のみの単独データでは、CA-1 以降の C 末配列削除では（その一例として図 2-B を示す）、野生型酵素と同じく多糖が 7 割～8 割でメガロ糖が 2 割～3 割の合成割合となった。これに対し、CA-1 を含む C 末域を除く（図 2-C）と、両者の比が逆転しメガロ糖合成が 7 割を占めることが確認された。次に、これらの削除体に CA-1 置換を発生させた（図 2-D, F, G）。その結果、CA-1 より C 末端側に存在するアミノ酸（CA-2 と略）までの配列を保持すると（図 2-F）、多糖の合成量がメガロ糖のそれを上回ったが、CA-2 を含む削除では両者が逆になり、メガロ糖生産が主体となる興味深いデータが得られた（図 2-G）。すなわち、CA-1 と CA-2 が多糖合成酵素の生成物特異性に影響することが示され、CA-2 が新奇な構造因子であることが判明した。当該実験を通して、多糖とメガロ糖の合成量は拮抗すること（一方の増加は他方を減少）が観察され、多糖合成の阻止がメガロ糖生産を促進させ、かつ両構造因子の関与が推測された。相同酵素との構造比較から CA-1 と CA-2 の存在位置は触媒中心より離れた遠位にあると推定できる。すなわち、触媒中心から伸長する長鎖の生成物を安定化させ、多糖合成の促進に貢献する機構が考えられた。一方、本酵素の精製度を上げ、条件を検討することで結晶化がようやく実現された。しかしながら立体構造の取得に至っていない。

ショ糖からレバンを合成する酵素に存在する構造因子を、その相同酵素であるインベルターゼ（ $\beta$ -フラクトフラノシダーゼ）に導入させる実験を行った。レバン合成酵素とインベルターゼはショ糖を基質とするが、前者は多糖レバン（ $\beta$ -1,6 フラクタン）や  $\beta$ -1,6 型のレバノオリゴ糖を合成し、後者は加水分解反応を触媒する。一方、高濃度ショ糖では、インベルターゼはイヌロオリゴ糖（ $\beta$ -1,2 型）を産する。2アミノ酸残基の置換でインベルターゼをレバノオリゴ糖の生産酵素に変異させた。当該変異酵素を親酵素とし、レバン合成酵素から構造因子を移植させることにした。まず、この親酵素の生成物を調べると、レバノオリゴ糖の 3 糖を主に生産するが、長鎖型を与えなかった。そこで、レバン合成酵素に存在する芳香族アミノ酸を置換導入させると、長鎖型の糖質が観察された。本 3 重変異酵素には多糖生成能がなく、レバン合成には更なる構造因子が必要であることが判明した。芳香族アミノ酸は触媒部位から離れた位置にあり、長鎖型生成物の伸長を促す作用機構が考えられた。これは、さらに遠位の部位にレバン合成の伸長因子の存在を示唆する。以上の解析から、多糖やメガロ糖などの長鎖糖質の合成には、伸長に関わる構造因子が触媒部位から離れて存在し、生成物の長鎖化に寄与すると考えられた。

#### (2) 新しいメガロ糖の構築

アミラーゼ耐性型メガロ糖を食品用多糖（FP と略）から調製した。その際に化学分解（酸・アルカリ処理）と酵素分解を行ったが、効率の点から後者の手法を採用した。反応時間などの酵素作用条件を適正化した後に大量調製を行った。生成物に混在する未分解のFP や過分解されたオリゴ糖を除き、目的のアミラーゼ耐性型メガロ糖を得た。さらに取得した標品の分子サイズを測定し、メガロ糖領域に分類できる鎖長を有することを実験的に証明した。当該メガロ糖は、BCS II に属す食品素材やアゾ色素を可溶化させ、その能力が高いことが見出された。一方、グルコース型メガロ糖を2種類の酵素が示す糖転移作用で構築した。すなわち、 $\alpha$ -グルコシド転移酵素をマルトオリゴ糖に反応させた。残存する基質を $\beta$ -アミラーゼ分解・酵母処理・ゲル濾過で除き、0-1-7を得た。さらに、環状デキストリン転移酵素を用いて0-1-7を18-1-7に転換し、目的のグルコース型メガロ糖を調製した。本メガロ糖18-1-7は難水溶性のフラボノイドを水溶化させ、その能力は0-1-7、6-12-4や30-12-4より高かった。また、BCS II 薬剤を可溶化させた。相乗効果は、メガロ糖の併用あるいは他の可溶化剤（環状糖）の共存で確認されたが、前者の効果は後者に比べ低い値となった。その理由は、併用した2つのメガロ糖がフラボノイド分子の同じ構造を認識するため可溶化が向上しなかったと考えられた。一方、後者では「環状糖-フラボノイド包接体」にメガロ糖が作用し、可溶化を促進したと想定された。本結果からメガロ糖併用において、認識部位が異なる組み合わせが良好な効果を与えると示唆された。グルコース型メガロ糖において疎水度測定プローブによる解析を行った。疎水度と可溶化能の間に相関が観察され、水溶化能を予想できる可能性が得られた。

### （3）アゾ色素汚染の改善効果

アゾ色素を含まない土壌にメチルレッド（アゾ色素）を混合させて作製した「モデル汚染土壌」を用いて実験を行い、メガロ糖の効果を調べた。アミラーゼ耐性型メガロ糖あるいはグルコース型メガロ糖の共存下で、アゾ色素分解酵素を作用させた。まず反応条件を検討したが、土壌微生物による影響で色素分解が不十分であり、モデル土壌の滅菌処理が必要であった。2種類のメガロ糖は、土壌からメチルレッドを可溶化させ、分解酵素の作用を高めた。同様な効果が反応容器を用いた実験でも認められた。一方、グルコース型メガロ糖において、興味深い現象が得られた。 $\alpha$ -1,4 グルコシド糖鎖の長鎖化は、メチルレッドの可溶化をを高めたが、逆に酵素分解が低下した。むしろ、可溶化が低いアミラーゼ耐性型メガロ糖がより良好な分解効果を示した。両メガロ糖に観察された「高溶解・低分解」および「低溶解・高分解」は意外な現象であり、その分子機構の理解はメガロ糖利用に重要と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Klahan Patcharapa, Okuyama Masayuki, Jinnai Kohei, Ma Min, Kikuchi Asako, Kumagai Yuya, Tagami Takayoshi, Kimura Atsuo	4. 巻 82
2. 論文標題 Engineered dextranase from <i>Streptococcus mutans</i> enhances the production of longer isomaltooligosaccharides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1480 ~ 1487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1473026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ma Min, Okuyama Masayuki, Tagami Takayoshi, Kikuchi Asako, Klahan Patcharapa, Kimura Atsuo	4. 巻 67
2. 論文標題 Novel -1,3/ -1,4-glycosidase from <i>Aspergillus niger</i> exhibits unique transglucosylation to generate high levels of nigerose and kojibiose.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 3380 ~ 3388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.8b07087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hara Hiroshi, Kume Shunsuke, Iizuka Takahisa, Fujimoto Yoshinori, Kimura Atsuo	4. 巻 82
2. 論文標題 Enzymatically synthesized megallo-type isomaltosaccharides enhance the barrier function of the tight junction in the intestinal epithelium	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 629 ~ 635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1398065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okuyama Masayuki, Serizawa Ryo, Tanuma Masanari, Kikuchi Asako, Sadahiro Juri, Tagami Takayoshi, Lang Weeranuch, Kimura Atsuo	4. 巻 296
2. 論文標題 Molecular insight into regioselectivity of transfructosylation catalyzed by GH68 levansucrase and -fructofuranosidase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 鳥村有季乃, 田上貴祥, 奥山正幸, 木村淳夫
2. 発表標題 デキストランデキストリナーゼのSer923の機能解析.
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会 (第69回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木惇生、奥山正幸、田上貴祥、木村淳夫
2. 発表標題 -Fructofuranosidaseの糖転移作用：飽和変異導入による改変.
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会 (第69回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 床波 篤, Min Ma, 奥山正幸, 田上貴祥, 木村淳夫
2. 発表標題 Aspergillus niger -glucosidase Bの機能解析.
3. 学会等名 日本応用糖質科学会北海道支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前山和輝、田上貴祥、奥山正幸、木村淳夫
2. 発表標題 -グルコシダーゼを用いた -マンノシルオリゴ糖の合成.
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 陣内恒平、吉田強軌、奥山正幸、田上貴祥、木村淳夫
2. 発表標題 Parageobacillus caldxylosilyticusの糖質加水分解酵素：機能解明と糖転移向上
3. 学会等名 日本農芸化学会北海道支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木惇生、芹沢領、奥山正幸、田上貴祥、志村華子、上野敬司、小野寺秀一、木村淳夫
2. 発表標題 改変 $\alpha$ -fructofuranosidaseによる6-ケストースの合成および精製
3. 学会等名 日本農芸化学会東北・北海道支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tagami T, Okuyama M, Mori H, Kimura A
2. 発表標題 Structural and functional investigation of starch-metabolizing enzymes
3. 学会等名 Protein Society of Thailand (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Min Ma, Masayuki Okuyama, Takayoshi Tagami, Patcharapa Klahan, Atsuo Kimura
2. 発表標題 Molecular mechanism of transglucosylation catalyzed by two $\alpha$ -glucosidase isozymes from <i>Aspergillus niger</i>
3. 学会等名 Asia Pacific Protein Association and Protein Society of Thailand (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白戸しおり, 飯塚貴久, 藤本佳則, 舟根和美, 木村淳夫, 原博
2. 発表標題 小腸上皮バリア機能に対するアンカー型イソマルトメガロ糖の保護作用
3. 学会等名 日本応用糖質科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田上貴祥, 陳明皓, 奥山正幸, 岩崎智仁, 田中良和, 姚閔, 木村淳夫
2. 発表標題 GH15 isomaltose glucohydrolaseのX線結晶構造解析: 基質認識に関わる構造因子の推定
3. 学会等名 日本応用糖質科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木優希, 熊谷祐也, 貞廣樹里, ラング ヴィーラヌッチ, 田上貴祥, 奥山正幸, 木村淳夫
2. 発表標題 デキストラン デキストリナーゼの多糖合成に関与するアミノ酸の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 床波篤, Min Ma, 奥山正幸, 田上貴祥, 木村淳夫
2. 発表標題 糸状菌 $\alpha$ -グルコシダーゼBへの部位特異的飽和変異導入が生成物特異性に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会・北海道支部
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

分子酵素学研究室 北海道大学 大学院農学研究院 応用生命科学分野  
http://lab.agr.hokudai.ac.jp/molenzlab/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	田上 貴祥  (Tagami Takayoshi)  (70709849)	北海道大学・農学研究院・助教   (10101)	
研究 分 担 者	奥山 正幸  (Okuyama Masayuki)  (00344490)	北海道大学・農学研究院・講師   (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
タイ	マハサラクーン大学			