

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32613

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07729

研究課題名(和文)古細菌トレハラーゼの機能解明と新規オリゴ糖合成への応用展開

研究課題名(英文)Functional analysis of archaeal trehalases and attempt of their properties for novel oligosaccharides production

研究代表者

坂口 政吉 (Sakaguchi, Masayoshi)

工学院大学・先進工学部・准教授

研究者番号：80281351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、古細菌が保持するトレハロース分解酵素の機能とその応用展開を目的とした。その結果、すでに報告していたユーリ古細菌の酵素に加えて、クレン古細菌であるスルフォロバス菌から二種の組換え酵素を発現させて、酵素化学的性質を明らかにした。また、推定活性部位中のアミノ酸を変換し、既報酵素の触媒反応に関わるアミノ酸を同定し、N末端ドメインの機能と立体構造解析へ向けて結晶化条件に関する基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トレハロースは、種々の生理活性を有し、近年非常に注目されている非還元性二糖である。本研究では、クレン古細菌では初めて、トレハロースを分解する能力を持つ二種の酵素を同定した。二種の酵素は異なる性質を有し、片方の酵素は分解活性が低く、トレハロースに対する親和性が高かった。ユーリ古細菌酵素の活性部位に関する成果と共に、これらの成果は、古細菌のトレハロース利用そして糖代謝について新しい知見を提供し、今後の細胞生物学の一助となる。残念ながら、立体構造の解明と新奇二糖の合成までには至らなかったが、今後の糖質分解酵素の多様性や応用に対して開拓できる道筋を示せると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was to elucidate the structure-function relationship of glucoside hydrolase (GH) family enzymes and their applications. Among GH15 enzymes, in addition to known trehalose-hydrolyzing enzymes from euryarchaea *Thermoplasma* sp., two trehalases from crenarchaeon *Sulfolobus* could be expressed as soluble active forms and their properties were characterized. In *Thermoplasma* enzyme, I identified some amino acid residues involving with its catalytic reaction in conserved regions forming its putative active site using protein engineering method, analyzed functions of its putative N-terminal domain, and constructed the basic condition of its crystallization for structural analysis.

研究分野：酵素化学

キーワード：トレハラーゼ 古細菌 GH15糖質分解酵素 トレハロース

1. 研究開始当初の背景

トレハロースは、グルコースが α -1,1グルコシド結合した非還元性二糖であり、エネルギー源としてのみならず、保水性、ストレス耐性などの生理活性を有し、近年では認知症関連タンパク質を排除するオートファジー誘導剤として非常に注目されている。トレハラーゼは、このトレハロースを加水分解する酵素である。生物は、真正細菌・古細菌・真核生物というドメインに分類され、トレハラーゼはほとんどの生物で見出されるが、古細菌では見つかっていなかった。本研究対象の古細菌トレハラーゼは、古細菌で初めて同定されたトレハラーゼである。

糖質関連酵素・タンパク質データベース (Cazy) では、特に研究が進んでいる真正細菌である大腸菌や真核生物である酵母の酵素は、糖質分解酵素ファミリー37 (GH37)や GH65ファミリーに分類される。一方、本研究対象の古細菌トレハラーゼは GH15ファミリーに分類される。3つのファミリーのトレハラーゼを比較すると、タンパク質の立体構造は類似しているが、一次構造上の類似性がかなり低い。同様に GH15ファミリーに分類される既報の結核菌の酵素と一次構造は似ているが、酵素活性の至適pHが7.1であることや多量体である点など、特徴がかなり異なり、この差異に関する知見はまだ得られていない。GH15ファミリー酵素の多くは、主として α -1,4グルコシド結合を加水分解する酵素であるグルコアミラーゼであり、古細菌トレハラーゼも、見つけた当初はグルコアミラーゼと考えられた。しかし、 α -1,1グルコシド結合に作用する酵素であるものの、トレハロースに対するミカエリス定数が高く、トレハロースが本来の基質なのか不明でもある。さらに、類似性がある推定アミノ酸配列が、分類学上異なる古細菌の染色体DNA上にも二種もしくは複数存在することを突き止めており、GH15ファミリー酵素の多様性と、それらの基質認識に関わるアミノ酸、アミノ酸領域は大変興味深い。ほとんどが不明のままである。一方で、古細菌内でトレハロースが蓄積することは報告されていた。古細菌トレハラーゼの報告で、新たに分解経路が追加されたものの、見つかった酵素の性質を考慮するとその代謝経路は不明な点が多い。そこで、縮合反応によりトレハロースやトレハロース類似体を合成することで、これら酵素の本来の基質探索および応用へ向けて展開できないかと考えた。

2. 研究の目的

他のファミリーのトレハラーゼと比較し、基質に対する親和性が異なることから、GH15型酵素特有の基質認識部位を形成していると予想し、本酵素の機能解明と新たな応用展開を計るため、「GH15古細菌トレハラーゼの機能解明」と「GH15古細菌トレハラーゼを用いた新規オリゴ糖合成への応用展開」を目的とした。

「GH15古細菌トレハラーゼの機能解明」では、新規古細菌酵素の取得と解析を試みた。既報の古細菌とは別の好酸性好熱性古細菌から、既報酵素と高い一次構造類似性をもつ推定酵素を新たに取得し、それらの酵素化学的特性を調べ、既報の古細菌酵素と比較した。組換え酵素の基質認識残基の同定を試みた。既報酵素と新規古細菌酵素と一次構造比較を行い、触媒残基付近や推定保存領域内で基質認識に関与するアミノ酸を推定し、これらのアミノ酸置換により、その活性への影響を検証し、触媒反応に関わるアミノ酸を調べた。またGH15古細菌トレハラーゼの結晶化を試みた。

「GH15古細菌トレハラーゼを用いた新規オリゴ糖合成への応用展開」では、縮合反応による非還元性オリゴ糖の合成を試みた。：基質との親和性が低い古細菌トレハラーゼを用いて、グルコースを開始糖として縮合反応を行った。また、触媒残基を変換した酵素を用い、フッ化グルコースとグルコースを用いた合成を行った。

残念ながら古細菌酵素の立体構造解析や酵素を利用したオリゴ糖合成については研究半ばであるが、クレン古細菌から二種の新規古細菌酵素の取得と酵素化学的性質、そして古細菌酵素の基質認識残基に関する成果を報告する。

3. 研究の方法

遺伝子工学：

発現ベクターおよび変異酵素の構築は、遺伝子工学実験書を基にした方法に従って実施した。クローニングおよび変異導入など、PCR法によって増幅した遺伝子の塩基配列は、ユーロフィンジェノミクスに委託して解析した。

組換えタンパク質の発現と精製：

構築した発現ベクターを保持する大腸菌は、LB培地を用いた一晩の前培養、そして2×YT培地を用いた本培養で増殖させた。集めた菌体は超音波処理を施し、上清と沈殿に分けた。上清を粗酵素液として、必要に応じて熱処理し、クロマトグラフィーに供した。クロマトグラフィーは、

Ni セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーを主体とし、必要に応じて、疎水クロマトグラフィー (HiTrap Butyl) を組み合わせて行った。

酵素活性の測定：

基質をトレハロースとして、酵素による加水分解反応によって生産されたグルコースを、F-キット(ロシュ社)を用いて追跡した。オリゴ糖合成反応産物の追跡は、酵素とフッ化グルコースとグルコースを混合し、一定時間反応させた後、薄層クロマトグラフィー (TLC) によって実施した。

酵素の結晶化：

精製した酵素を、10 mg/mL 以上となるように濃縮カラムを用いて濃縮し、結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法で行った。使用した溶液は、ハンプトン社の試薬を用い、顕微鏡によって結晶を観察した。得られた結晶は、高エネルギー加速器研究機構シンクロトロン放射光施設にて、X線回折のデータ収集をしていただいた。

4. 研究成果

(1) クレン古細菌から二種の新規古細菌酵素の取得と酵素化学的性質

好酸性ユーリ古細菌 (*Thermoplasma* 属) の酵素と比較的配列相同性が高く、分類学上異なる古細菌である好酸性クレン古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* からの糖質分解酵素ファミリー 15 (GH15) に属する 2 つの古細菌トレハラーゼ様遺伝子 *Saci1250* と *Saci1816* をクローニングし、大腸菌を宿主として発現させた。当初、*Thermoplasma* 属酵素の発現量と比較して、可溶性画分のタンパク質量が微量で、活性を示すタンパク質の取得に難航した。融合タンパク質発現系も試行したが、改善しなかった。結果、発現誘導物質を添加しない発現系で取得量向上に成功した。得られた遺伝子産物はトレハロースに特異的な加水分解活性を示し、*Saci1816* および *Saci1250* 遺伝子産物は、それぞれ SA1816 および SA1250 と名付けた (論文上、それぞれ SaTreH1 と SaTreH2)。これらの新しく同定された酵素は、高温で狭い範囲の酸性 pH 値内で分解活性を示し、この点においてはユーリ古細菌 *Thermoplasma* 属由来のトレハラーゼ (TVN1315) の挙動と同様であった。SA1250 と SA1816 の推定一次構造の同一性は 44% (相同性 64%) であるが、両者の比活性には差異が見られた。トレハロースに対する速度論パラメータを算出すると、SA1816 は高い K_M および k_{cat} 値を示したが、SA1250 はより低い K_M および k_{cat} 値を有していた。TVN1315 とのアミノ酸配列比較により、SA1816 の 2 つの触媒残基がグルタミン酸であると推定し、SA1816 保存領域 3 中のグルタミン酸変換酵素 (E374Q) および保存領域 5 のグルタミン酸変換酵素 (E524Q) を作製した。結果、トレハロース加水分解活性は著しく低下し、SA1816 の 2 つのグルタミン酸残基がトレハラーゼ触媒作用に関与することが示された。

トレハラーゼは二糖を認識する酵素であるため、グルコースが結合する部分 (サブサイト) は 2 つである。2 つのグルコースの認識には触媒残基周辺のアミノ酸が関わると推定し、TVN1315 の保存領域 3 中のグルタミン酸残基の右隣のアミノ酸の変換実験を行ったところ、変換酵素のトレハロース分解能に大きな影響は見られなかった。しかし、SA1816 の E524 の両隣に位置するアミノ酸はグリシンとヒスチジンであり、TVN1315 のアミノ酸と異なる (それぞれセリンとグルタミン酸)。TVN1315 配列を模倣した G523S および H525E は、トレハラーゼ活性および熱安定性の減少をもたらし、*Thermoplasma* 属と *Sulfolobus* 属酵素の活性部位構造に違いがあることを示唆した。

これらの結果は、クレン古細菌とユーリ古細菌酵素の活性部位構造は似ているものの、分子的特徴が異なり、さらに、クレン古細菌酵素の SA1816 と SA1250 でも異なる活性部位構造を採用していることを示唆した。

(2) 古細菌酵素の基質認識残基

GH15 ファミリー酵素の代表格であるグルコアミラーゼの立体構造は解析済である。真核生物型の多くは、N 末端側に触媒ドメイン、そして C 末端側にデンブリン結合ドメインを持つが、原核生物型の酵素は、N 末端側に機能未知ドメイン、そして C 末端側に触媒ドメインを持つ。古細菌酵素は、原核生物型の構造をしていると推定される。また、グルコアミラーゼの触媒ドメイン中の活性部位は、ヘリックス間の 5 本のループを中心に形成されており、古細菌酵素も類似の活性部位構造をもつと推定している (これらループ部分は、保存領域 1~5 と提唱されている)。

古細菌トレハラーゼと細菌グルコアミラーゼの活性部位を形成していると考えられる 5 つの保存領域のアラインメント解析を行った。細菌グルコアミラーゼでサブサイト 1 を形成し、基質認識に関与しているアミノ酸が多く存在することを考慮し、保存領域 1 の GH15 型トレハラーゼによく保存されているアミノ酸を一つずつアラニン変換し、調べた。その結果、ほとんどの変換体が活性を失った。中には熱転移温度が大きく減少した変換体も観察され、この変換体は構造が崩れていることが示唆された。アラニン置換で活性を失ったことから、保存領域 1 内で類

似アミノ酸への変換を試みたところ、活性が野生型の半分程度まで上昇した変換酵素が観察された。これらの熱転移温度は野生型とほぼ同じ値を示すことから、それぞれのアミノ酸側鎖が触媒反応に関わっていること、そして類似アミノ酸であっても補完できないことが示唆された。また、類似アミノ酸変換でも活性を示さない変換酵素は、反応に重要であるか、構造が崩れているかという結果であった。つまり、前者は、触媒反応に決定的な役割を持っており（細菌グルコアミラーゼのサブサイト1に相当）、後者は構造形成、または安定性に重要であることを示唆した。保存領域 2-5 においても、アラニン置換で活性が著しく減少し、今後は類似アミノ酸変換体を調べる予定である。

クレン古細菌 *Sulfolobus* 菌から取得した二種の酵素は特異的にトレハロースを分解する活性を示したが、トレハロースに対する親和性と触媒定数に違いがあった。SA1816 (SaTreH1)は触媒定数が高く、親和性が低い。SA1250 (SaTreH2) は触媒定数が低く、親和性が高い。両者の同一性は44%程度であり、推定上、活性部位を形成する領域（保存領域）ではよく似ている。しかし、古細菌トレハラーゼでの推定保存領域内には、SA1250 特有のアミノ酸が見られる。これがSA1250 の比活性の低下の要因と考え、対応する SA1816 のアミノ酸を SA1250 特有のアミノ酸に変換したところ、活性が減少するアミノ酸を特定できた。同様に、このアミノ酸を *Thermoplasma* 酵素 (TVN1315) に導入すると、同じように活性が減少する結果も得た。しかしながら、SA1250 特有のアミノ酸を、数カ所 SA1816 のアミノ酸に変換した調査を行ったが、活性向上および親和性の減少は得られず、他の要因が性質に変化をもたらすことが示唆された。一方で、SA1816 と SA1250 間の共通点を見出すべく、SA1816 で調べた触媒反応に関わるグルタミン酸とヒスチジンを、改めて SA1250 変換酵素で調査したところ、SA1816 の結果同様、活性が減少する結果を得た。これらの結果は、*Sulfolobus* 菌酵素のこれらのアミノ酸は同様の役割を担っていることを示唆した。

(3) その他の成果

N 末端ドメインの N 末端ドメインの機能：前述のように、GH15 ファミリー古細菌酵素は N 末端ドメインと C 末端触媒ドメインを持つと推定される。*Thermoplasma* 酵素 (TVN1315) の N 末端ドメインの N 末端 10 残基を欠損すると不溶性タンパク質となり、5 残基欠損では活性をもつ可溶性酵素として得られる。また、N 末端ドメインを単独発現した場合でも、10 残基欠損すると不溶性タンパク質となった。このアミノ酸領域のうち、可溶化タンパク質へのフォールディングに寄与するアミノ酸を同定した。

酵素を利用したオリゴ糖合成：当初、有機溶媒中での古細菌酵素を利用した縮合反応を試みたが、取得量が微量であるため、加水分解酵素の合成酵素化によるオリゴ糖合成を試みた。触媒残基を変換した酵素を用い、フッ化グルコースとグルコースによる合成反応を実施したが、再現良くトレハロースを検出出来なかった。変異導入、反応条件や検出法など、さらなる条件の検討が必要である。

古細菌酵素の結晶化：*Thermoplasma* 酵素 (TVN1315) の結晶化を試みた。条件検討の結果、酸性条件下で 100 μm 程度の光沢のある結晶が得られたが、解像度が 3 程度と、解析するまで至らなかった。N 末端ドメイン単独での結晶化や *Sulfolobus* 菌酵素の結晶化を含めた種々の条件検討が必要である。

他の糖質分解酵素の機能解析：非病原性リステリア菌由来キチナーゼの各ドメインの役割と機能未知領域が酵素活性向上に寄与していることを突き止め、機能未知領域機能の中心となるアミノ酸を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakaguchi Masayoshi	4. 巻 104
2. 論文標題 Diverse and common features of trehalases and their contributions to microbial trehalose metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1837 ~ 1847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-019-10339-7	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 Honda Shotaro, Kimura Masahiro, Wakita Satoshi, Oka Yuji, Kawakita Masao, Oyama Fumitaka, Sakaguchi Masayoshi	4. 巻 103
2. 論文標題 The <i>Listeria innocua</i> chitinase LinChi78 has a unique region that is necessary for hydrolytic activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1777 ~ 1787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-018-9573-5	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 Yuasa Mitsuhiro, Okamura Takeshi, Kimura Masahiro, Honda Shotaro, Shin Yongchol, Kawakita Masao, Oyama Fumitaka, Sakaguchi Masayoshi	4. 巻 102
2. 論文標題 Two trehalose-hydrolyzing enzymes from <i>Crenarchaeon Sulfolobus acidocaldarius</i> exhibit distinct activities and affinities toward trehalose	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 4445 ~ 4455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-018-8915-7	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂口政吉、湯浅充洋、多田凌吾、南澤秋弥、甲田有梨奈、川喜田正夫
2. 発表標題 GH15古細菌トレハラーゼの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会[福岡]
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂口政吉, 本田翔太郎, 木村将大, 脇田悟誌, 岡侑司, 川喜田正夫
2. 発表標題 リステリアキチナーゼの機能未知領域の機能
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度(H31年度)大会[東京]
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂口政吉, 久米杏奈, 湯浅充洋, 本田翔太郎, 小山文隆, 川喜田正夫
2. 発表標題 古細菌トレハラーゼのN末端領域の機能
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会 [名古屋]
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 湯浅充洋, 岡村武司, 本田翔太郎, 川喜田正夫, 小山文隆, 坂口政吉
2. 発表標題 新規古細菌トレハラーゼの大腸菌組換えタンパク質の発現及び性質解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会 平成29年度大会(第66回)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂口政吉, 久米杏奈, 湯浅充洋, 本田翔太郎, 小山文隆, 川喜田正夫
2. 発表標題 古細菌トレハラーゼのN末端領域の役割
3. 学会等名 日本応用糖質科学会 平成29年度大会(第66回)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

クレン古細菌Sulfolobus 由来の二種のトレハロース分解酵素は、異なる比活性や親和性を示す
<https://www.kogakuin.ac.jp/research/seeds/fbb28u0000007b9t-att/fbb28u0000007bdh.pdf>
古細菌GH15トレハラーゼは狭い酸性領域で働く
<https://www.kogakuin.ac.jp/research/seeds/fbb28u0000007b9t-att/fbb28u0000007beq.pdf>

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
研究協力者	殿塚 隆史 (Tonozuka Takashi)		