

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05387

研究課題名(和文) 加リン酸分解酵素が関与する酸化的多糖分解経路の解明

研究課題名(英文) Studies on the oxidative metabolic pathway for polysaccharides involving glycoside phosphorylases.

研究代表者

仁平 高則 (NIHIRA, Takanori)

新潟大学・農学部・特任助教

研究者番号：80615469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：新たな多糖の酸化代謝経路を発見・解明するために、酸化分解の中間産物である酸性オリゴ糖を加リン酸分解するホスホリラーゼを網羅的に探索し、酵素学的、速度論的解析を進めた。いくつかの新規ホスホリラーゼを発見できたものの、酸性オリゴ糖に作用する新たなホスホリラーゼの発見には至らなかった。今回の探索で唯一酸性オリゴ糖に作用した酵素の基質特異性を調べた結果、既知セロピオン酸ホスホリラーゼとは若干アクセプター基質特異性が異なるセロピオン酸ホスホリラーゼであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の酵素探索においては、酸化代謝経路の中間産物である酸性オリゴ糖を加リン酸分解するホスホリラーゼを発見するに至らなかったが、いくつかの中性糖に作用する新規ホスホリラーゼを発見することはできた。当該酵素が関与するATP消費抑制型の糖質代謝経路が新たに発見された点から、学術的に意義がある。またホスホリラーゼはオリゴ糖合成の触媒としても有望であり、新規酵素が発見されたことにより新たに合成可能なオリゴ糖の種類が拡大した点も学術的に意義がある。

研究成果の概要(英文)： In order to discover and elucidate new oxidative metabolic pathways of various polysaccharides, phosphorylase that phosphorolyzes oligo-aldobionic acids, which are intermediates of oxidative degradation, has been comprehensively searched. Furthermore, the enzymatic and kinetic properties of the discovered phosphorylases were determined. Although some novel phosphorylases have been discovered, no new phosphorylases that act on oligo-aldobionic acids have been discovered. As a result of investigating the substrate specificity of the only enzyme that acted on the oligo-aldobionic acid in this search, it was a cellobionic acid phosphorylase that has a slightly different acceptor substrate specificity compared to the known one.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ホスホリラーゼ 糖

### 1. 研究開始当初の背景

生物は、光合成により自ら糖質を合成可能な植物などを除き、他生物の貯蔵糖質や生体分子に含まれる糖質を分解・摂取し生体エネルギーATPを獲得することで生命を維持している。そのため、糖質をいかに効率よく分解し他者に先んじて生体内に取込むかが、過酷な生存競争に打ち勝つために重要となる。糖質、特に高分子多糖の分解には、その構造の多様性、複雑性、分子鎖間の水素結合などが要因となり、多種多様な酵素の関与が必要とされる。従来、難分解性多糖の酵素分解は、加水分解酵素の反応を中心に考えられていたが、近年難分解性多糖の分解が酸素存在下で著しく促進されるという実験結果をもとに、酸化還元酵素の関与・重要性が目ざされ始めた。この反応に大きな役割を担う酵素として、天然多糖セルロース、澱粉、キチンにそれぞれ作用する溶解性多糖モノオキシゲナーゼと呼ばれる酸化還元酵素が見出され、特にセルロースに作用する酵素について精力的な研究が進行している。

セルロースは、グルコースが  $\beta$ -1,4-グルコシド結合した直鎖状の分子鎖同士が分子間水素結合により密にパッキングされた強靱な構造を有し、その分解は容易ではない。酸化的分解反応が関与するセルロース代謝経路では、加水分解酵素の作用により遊離したセロビオースをセロビオン酸酸化還元酵素が酸化し、その際に生じる電子を溶解性多糖モノオキシゲナーゼに供給することでセルロースがより効率的に分解される(図1)。セロビオースの酸化により生じるセロビオン酸は、加水分解酵素により分解されると考えられていたが、低反応性、生成物阻害が起こることからごく最近まで疑問視されていた。申請者は2013年に糸状菌および植物病原菌からセロビオン酸を加リン酸分解する新規酵素セロビオン酸ホスホリラーゼを見出し、酸化的分解反応と解糖系およびペントースリン酸経路をつなぐミッシングリンクの解消に成功した。この発見により、澱粉やキチンにおける酸化的分解反応が関与する代謝経路においても、ホスホリラーゼが関与する可能性が無視できなくなった。

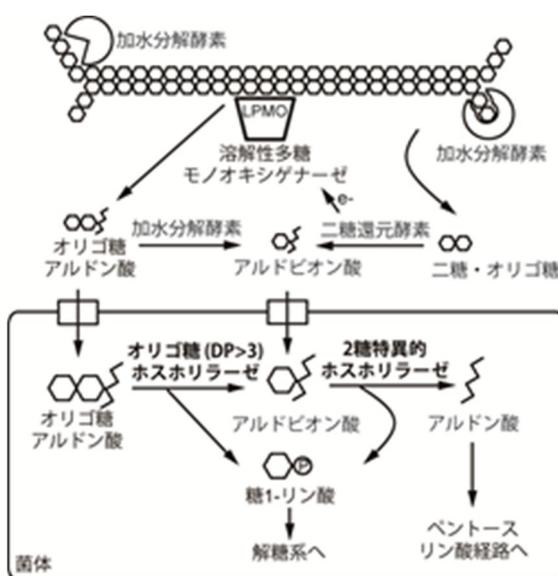


図1. 酸化的多糖分解の概略

### 2. 研究の目的

本申請研究では、現在全貌が明らかとなっていない澱粉およびキチンの酸化的分解反応が関与する新規代謝経路を解明するために、セルロースの酸化的分解において確認されている酸性オリゴ糖を加リン酸分解するホスホリラーゼの探索し、その酵素学的、速度論的および構造学的特性を精査する。具体的には、澱粉の酸化的分解によって得られるマルトビオン酸およびマルトオリゴ糖アルドン酸、キチンの酸化的分解によって得られる  $N,N'$ -ジアセチルキトビオン酸および  $N$ -アセチルキトオリゴ糖アルドン酸に対し特異的に作用するホスホリラーゼの発見、性質決定を目指す。本研究によって酸性オリゴ糖に対し特異的に作用するホスホリラーゼが発見されれば、酸化的分解反応と既知代謝経路とのミッシングリンクの一つを解消することが可能となる。また、加水分解酵素、酸化還元酵素および加リン酸分解酵素による効率的な多糖分解・代謝経路が明らかとなることで、これまで利用困難であった難分解性高分子バイオマスの利用、例えば高付加価値物質への変換やバイオ燃料・樹脂生産などバイオリファイナリー技術の進展につながることを期待できる。澱粉およびキチンの酸化的分解反応が関与する新規代謝経路の解明を目指し、分子系統解析および遺伝子クラスターなどの遺伝子情報、溶解性多糖モノオキシゲナーゼ遺伝子やセロビオン酸ホスホリラーゼ遺伝子を持つ微生物などから作製したゲノムライブラリー、環境中のヘテロなゲノム DNA から得たメタゲノムライブラリーをそれぞれ利用したホスホリラーゼの探索を展開し、遺伝子クローニング、タンパク質発現および酵素学的、速度論的、構造学的特性を精査する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 機能未知ホスホリラーゼホモログ遺伝子のクローニング

各種微生物由来のホスホリラーゼホモログ遺伝子を PCR にて伸長し、大腸菌発現ベクター pET-24a および pET-28a に組み込むことにより発現プラスミドを構築した。当該プラスミドを用いて大腸菌 BL21(DE3) および Rosetta2(DE3) を形質転換し、His-Tag 融合組み換え酵素を生産し、ニッケルアフィニティーカラムにて精製した。各種糖 1-リン酸および糖受容体基質に作用させることによって生じた生成糖およびリン酸を、TLC およびリン酸比色定量にて確認し基質特異性を決定した。

(2) ゲノム・メタゲノムライブラリーの作製およびホモログ遺伝子のスクリーニング  
ホスホリラーゼ遺伝子を多く持つ微生物のゲノム DNA および土壌などの環境中から回収したヘテロなゲノム DNA を制限酵素を用いて適当な大きさに断片化し、プラスミドベクターに組み込み大腸菌を形質転換することでクローン化し、ゲノムライブラリーおよびメタゲノムライブラリーを作製した。糖 1-リン酸を資化し、かつ単糖の資化性を制限した変異型大腸菌を用いて、ホスホリラーゼホモログ遺伝子のスクリーニングを行なった。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規ホスホリラーゼの探索

アミノ酸配列の相同性により分類される糖質加水分解酵素ファミリー (GH) のうち、 $\alpha$ -グルコシドおよび *N*-アセチル- $\beta$ -グルコサミニドに作用するホスホリラーゼが属すると推測される GH65 および 94 のホスホリラーゼホモログ遺伝子について分子系統解析を行なった。既知酵素遺伝子と遠い関係にある機能未知のホモログ遺伝子に注目し、網羅的にクローニングを行ない、大腸菌による組み換え酵素の異種宿主発現および基質特異性の調査を行なった。その結果、 $\alpha$ -グルコシドに作用する新規ホスホリラーゼを 1 種、 $\beta$ -グルコシドに作用する新規ホスホリラーゼを 3 種、*N*-アセチル- $\beta$ -グルコサミニドに作用する新規ホスホリラーゼを 1 種それぞれ見出し、また数種の既知ホスホリラーゼも併せて単離できた。このうち新規酵素については、いずれも酸性オリゴ糖に対して反応性を示さなかった。既知酵素については、1 種のみ酸性オリゴ糖に作用する酵素があり、基質特異性を調査した結果、既知酵素とは基質特異性の異なるセロピオン酸ホスホリラーゼであると考えられた。

また、ホスホリラーゼ遺伝子を多く持つ微生物のゲノム DNA を DNA ポリメラーゼにて増幅したものと環境試料から抽出したメタゲノムを、それぞれ制限酵素処理により断片化しクローン化し、前者では  $10^5$  種類、後者では  $10^7$  種類のクローンを含むライブラリーを作製できた。これらライブラリーを用いてホスホリラーゼ遺伝子のスクリーニングを行なった結果、いずれも酸性オリゴ糖に作用する新規酵素の単離には成功せず、既知酵素の単離に留まった。

##### (2) 酸性オリゴ糖に作用したホスホリラーゼの性質決定

今回の探索で唯一酸性オリゴ糖に作用した *Paenibacillus borealis* 由来のホスホリラーゼホモログ (PBOR\_13355) の物理化学的・酵素学的性質および基質特異性を調べた。その結果当該酵素は、逆反応においてグルコン酸を受容体とした際に最も高い活性を示し、生成物はセロピオン酸であったため、セロピオン酸ホスホリラーゼであると判断された。逆反応における至適 pH は 7.0 で、pH 6.0 から 10.0 の範囲で 80 %以上の活性を保持した。また 40 °C 以下において 90 %以上の残存活性を示した。

これまで我々が発見した 3 種のセロピオン酸ホスホリラーゼ (*Saccharophagus degradans* 由来 Sde\_0906 (引用 1), *Xanthomonas campestris* 由来 XCC4077 (引用 2), *Neurospora crassa* 由来 NCU09425.1 (引用 2)) と当該酵素が示す受容体基質特異性を比較したところ、既知 3 種につ

表 1. 4 種のセロピオン酸ホスホリラーゼが示す受容体基質特異性

| 受容体基質          | 相対活性 (%) |     |     |      |
|----------------|----------|-----|-----|------|
|                | Sde      | XCC | NCU | PBOR |
| グルコン酸          | 100      | 100 | 100 | 100  |
| マンノノ-1,4-ラクトン  | ND       | 7.2 | ND  | ND   |
| グルクロン酸         | 0.84     | 4.6 | 4.0 | 98   |
| マンヌロノ-6,3-ラクトン | 2.5      | 18  | 2.5 | 0.44 |

ND: 0.1 %以下, Sde: Sde0906, XCC: XCC4077, NCU: NCU09425.1, PBOR: PBOR\_13355

いてはグルクロン酸を受容体とするもののその活性はグルコン酸を受容体とした際の1から5%程度であったのに対し、今回見出したPBOR\_13355は98%とほぼ同程度の活性を有していた(表1)。またマンヌロノ-6,3-ラクトンに対しSde\_0906およびNCU09425.1はグルコン酸を受容体とした際の2.5%, XCC4077では18%程度活性を有していたが、PBOR\_13355はわずか0.4%程度に過ぎなかった(表1)。Sde\_0906の結晶構造解析の結果を参考に(引用1)、これら4種のセロピオン酸ホスホリラーゼのアミノ酸配列を比較すると、Sde\_0906のQ190とQ347に相当する

|      |                      |                 |          |        |      |
|------|----------------------|-----------------|----------|--------|------|
|      |                      |                 | Q347     |        |      |
|      |                      |                 | R349     |        |      |
|      | Q190                 | R341            | N350     | W470   | D472 |
|      | (+1)                 | (Pi)            | (-1)     | (-1)   | (A)  |
| Sde  | PYQKV                | VNRLTTDFQTRNYIQ |          | GDWC   | DPM  |
| Xcc  | PYQKV                | VNRLTTDFQTRNYLQ |          | GDWN   | DPM  |
| NCU  | PYQKA                | VNRLTTDFQTRNYLQ |          | GDWC   | DPM  |
| PBOR | PYHVT                | TNRMSYCPVRNQLQ  |          | GDWN   | DPI  |
|      |                      |                 |          |        | T694 |
|      | R609K613             | E619            | Y624     | N672   | G695 |
|      | (+1)(+1)             | (±1)            | (+1, Pi) | (+1)   | (Pi) |
| Sde  | VGRVTQKFPGSAENGSVYNH |                 | IPNYY    | FNTGTV |      |
| Xcc  | VGRVTQKNPGAANGAVYNH  |                 | LPNYY    | FNTGTV |      |
| NCU  | VGRVTQKAIGSAENAAVYNH |                 | IPNYY    | FNTGTV |      |
| PBOR | WGRISIKLAGTTENGSVYCH |                 | VPNYY    | VSTGTV |      |

図2. マルチプルアライメント

アミノ酸残基がPBOR\_13355ではそれぞれヒスチジンとプロリンに置換されていることが確認された(図2)。このうちQ190はサブサイト+1において基質との結合に関与しているアミノ酸残基であると考えられており、これがヒスチジンに置換されていることによりグルクロン酸に対する反応性が異なっていると推察される。実際、Sde\_0906においてQ190をアラニンに置換した変異型酵素では、野生型酵素に比べグルコン酸に対する活性が1/30程度になるのに対し、グルクロン酸に対する活性は1/10程度と置換による影響が低いことが判明している。このことから、このアミノ酸残基の違いが受容体特異性の差異につながっているものと推察される。

#### 引用文献

1. Y.W. Nam T. Nihira et al, J.Biol.Chem., 290, 18281-18292 (2015).
2. T. Nihira et al, FEBS Lett., 587 3382-3386 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|