

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19580102  
 研究課題名（和文）加水分解酵素の逆反応促進技術の開発と新規オリゴ糖合成への応用  
 研究課題名（英文）Promotion of reverse reaction of carbohydrase and its application for oligosaccharide synthesis.  
 研究代表者  
 森 春英(MORI HARUHIDE)  
 北海道大学・大学院農学研究院・准教授  
 研究者番号：80241363

研究成果の概要：トレハラーゼはトレハロースを加水分解する。本研究では、トレハラーゼ改変酵素と特殊化合物（フッ化グルコース）を用いて、加水分解の逆反応によりトレハロースを高効率で合成させることに成功した。変異酵素として、塩基触媒変異体、および塩基触媒および加水分解の基質の水分子に影響を与えるアミノ酸残基変異体を用いた。何れも反応速度は野生型に比べ低下したが、特に、後者の合成効率が高く、60%程度の収率を示した。

交付額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,900,000 | 870,000   | 3,770,000 |
| 2008年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：酵素利用学，オリゴ糖，加水分解酵素，逆反応

## 1. 研究開始当初の背景

オリゴ糖や配糖体は、膨大な種類を有し、新規機能開拓の可能性を秘めている。新規機能性糖質の発見には、まずはオリゴ糖の効率的反応系の開発が絶対的に重要である。このオリゴ糖合成に、加水分解酵素を応用する技術が開発されてきた。これまでは特に、基質と同じアノマー型生成物を生じる「アノマー保持型」酵素を用い、その糖転移反応を利用してきた。とりわけフッ化糖と触媒残基変異酵素（加水分解活性を示さない）の組み合わせによる「グリコシターゼ技術」では、転移生成オリゴ糖が加水分解されずに蓄積し、効率の高い合成に成功している。本申請研究で

は、「アノマー反転型」加水分解酵素をオリゴ糖合成に利用する技術の開発を目指した。アノマー反転型酵素の加水分解反応機構はより単純であり、逆反応であるオリゴ糖合成反応を促進するアミノ酸置換の戦略を立てやすい。また、オリゴ糖合成に利用できる酵素種をさらに増やし、一層多様なオリゴ糖合成に結びつくと考えられた。

## 2. 研究の目的

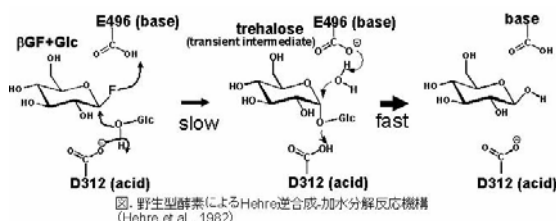
アノマー反転型加水分解酵素の逆反応を利用したオリゴ糖合成技術として、以下の2つの技術の開発を目的とした。尚、アノマー反転型酵素として、糖質加水分解酵素の Cazy

分類における GH37 群に属するトレハラゼ(結合トレハロースを分解してグルコースを生成)を材料として用いた。

(1) フッ化糖と一般塩基触媒変異酵素による反応系の確立: トレハラゼは結合を分解してグルコースを生成する酵素である。従って、逆反応ではグルコースを基質とするが、これに変えてフッ化グルコースを用いると効率的に逆反応を触媒する。塩基触媒(逆反応では酸触媒)に変異を導入して加水分解能を失わせたものを用いる。これらの組み合わせにより、合成反応は触媒されるが、生成オリゴ糖は加水分解されずに蓄積されると予想された。

### (2) 触媒基の pKa の調整

加水分解における酸触媒および塩基触媒は、逆反応ではそれぞれ塩基触媒および酸触媒として作用すると考えられる。従って、2つの触媒基の pKa が逆転しているほど、逆反応速度は上がり、他方分解速度は下がり、合成酵素として適した性質を有することになる。触媒残基の周辺残基を改変により、触媒基の pKa 改変を目指す。



### 3. 研究の方法

(1) 「Hehre 逆合成-加水分解反応」の再検証の実施: Hehre らは、トレハラゼ野生型を用いて、フッ化グルコースとグルコースからトレハロースが合成され、それが速やかに加水分解されてグルコースを生じることを示した。同じ反応が大腸菌トレハラゼでも起こることを、まず確認した。

(2) GH37 トレハラゼの触媒アミノ酸残基候補変異酵素. 研究開始当初、GH37 群酵素では、立体構造が得られたものは存在しなかった。従って、アミノ酸残基の同定を以下のように行った。カルボキシ基が反応に直接関与する (Lee ら, 2001: 申請者らの以前の研究) することから、GH37 群酵素の全アミノ酸配列から、二次構造を考慮した多重配列整列上で保存された酸性残基 (6 残基) を候補とした。各アミノ酸をアミドとした一重変異酵素を作成し、付加タグによる特異的精製を行い、大腸菌 native 酵素の混入を排除した。

(3) 触媒残基候補変異酵素の機能解析. 活性の著しく低下した 3 変異酵素について、詳細に解析を行い、一般酸触媒、一般塩基触媒、周辺の重要なアミノ酸残基のいずれに相当するかを解析した。すなわち、トレハラゼ活性の pH 依存性、フッ化グルコースとトレハロースそれぞれの加水分解における速度定数 ( $k_{cat}/K_m$ ) の比率、およびグルコース存在下でのフッ化グルコースからの逆反応速度ならびにトレハロースの収率を求めた。

(4) 周辺アミノ酸残基改変による触媒基 pKa の変化と逆反応への影響.

Gibson ら (2007) により得られた大腸菌トレハラゼの立体構造に基づき、触媒残基に影響を与える可能性のあるアミノ酸残基を予測し、変異酵素を作成した。これらの変異酵素の反応速度の pH 依存性、逆反応速度、およびトレハロース合成収率を求めた。

### 4. 研究成果

(1) 大腸菌トレハラゼの酸触媒の同定 (Asp312).

GH37 群酵素に保存される酸性アミノ酸は 6 残基 (大腸菌トレハラゼの Glu155, Asp160, Glu237, Asp312, Asp448, Glu496 に相当) であり、これらをアミドとした変異酵素 6 種をそれぞれ作出した。ミツパチトレハラゼでは、変異酵素の発現量が著しく低く、以後すべての実験は、大腸菌トレハラゼを用いて実施した。精製酵素の比活性は、D160N, D312N, E496Q で特に低く、それぞれ野生型の  $5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $6 \times 10^{-5}$  倍であった。速度の低下は主に  $k_{cat}$  の低下に伴うものであった。野生型および全変異酵素において、フッ化グルコースは良い脱離基を有しながらも加水分解速度 ( $k_{cat}/K_m$ ) は、トレハロース加水分解速度よりも低かった (0.001-0.05 倍)。しかしながら、D312N 変異酵素のみ、フッ化グルコースを 6 倍程度より速く分解した。すなわち、D312N 変異導入による反応速度低下が、フッ化グルコースに対し小さく、トレハロースに対して大きい。これより、Asp312 が酸触媒であると判断された。pKa<sub>2</sub> の増加を伴った最適 pH の 1.6 単位の増加、GH15 グルコアミラーゼ酸触媒残基との ( / )<sub>6</sub> パレル上での位置関係の一致、ならびに解析されたトレハラゼ立体構造も、Asp312 が酸触媒であることを示した。

(2) 塩基触媒同定 (Glu496) と逆反応.

E496Q 変異酵素のトレハロース加水分解速度 ( $k_{cat}/K_m$ ) の pH 依存性では、pKa<sub>2</sub> は野生型とほぼ一致したが、pKa<sub>1</sub> は 4.8 から 6.1 と大きく増加した。これは、E496Q 変異酵素では、より高い pH (水酸化イオン濃度が 10 倍以

上)が反応には必要とされることを意味し, Glu496 が塩基触媒であることを示唆する. GH15 グルコアミラーゼ塩基触媒残基との ( / )<sub>6</sub> パレル上での位置関係の一致, ならびにトレハラーゼ立体構造からも, Glu496 が塩基触媒であることを示した. 下記の フッ化グルコース(とグルコース)からの逆反応も, Glu496 が塩基触媒であることを支持する.

### (3)逆反応によるトレハロース合成

フッ化グルコースとグルコースからの逆反応(トレハロース合成反応)の反応速度と合成トレハロースの収率を測定した. 反応速度は, 37 °C, 25 mM グルコース存在下での各濃度 フッ化グルコースからのフッ化物イオン遊離の初速度により評価し, トレハロースの収率は 94mM フッ化グルコース, 42mM グルコースから 20 分で生成されるトレハロースを HPLC により定量して求めた. まず, 野生型酵素では, グルコース非存在下では F 遊離速度は著しく低い, 25mM グルコース存在下では  $k_{cat}=28.5 \text{ s}^{-1}$  であった. しかし, トレハロースはごく低濃度しか検出されず, 「Hehre 逆合成-加水分解反応」が再検証された. E496Q は F 遊離速度は著しく低い ( $k_{cat}=0.02\text{s}^{-1}$ ) が, トレハロースの蓄積 (5.9mM, 収率 8.6%)が確認された.

### (4)周辺アミノ酸残基改変酵素(D160NおよびY512F)

Asp160 は, 基質 6 位水酸基を介して基質の水, さらに塩基触媒 Glu496 と水素結合ネットワークを形成し, GH37 で保存された残基である. Tyr512 水酸基は Glu496 と水素結合を形成する. これら残基に注目し, 変異酵素 D160N および Y512F を調製・精製し, 精密に解析した.

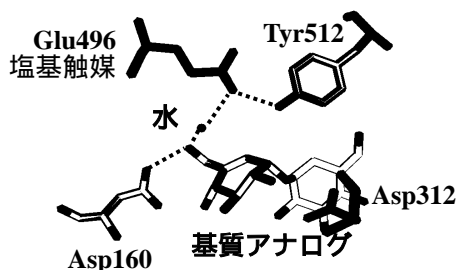


図. 大腸菌トレハラーゼ活性中心近傍 (Gibson ら, 2007)

D160N 変異酵素のトレハロース加水分解の pH 依存性は大きく変化し, 至適 pH が 3 単位増加した. すなわち, 酸触媒, 塩基触媒とも  $pK_a$  が増加し, 特に塩基触媒が逆反応に適した解離状態になったと予想された. いずれの変異酵素も活性を大きく失い, トレハロ-

ースに対する  $k_{cat}$  は野生型の  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  倍であった. これに対して逆反応の速度( $k_{cat}$ )は低下しつつも  $10^{-2}$  倍程度にとどまった. すなわち,  $k_{cat}$  の比率で, 逆反応が野生型より 70-1900 倍高くなった. トレハロース合成反応では Tyr および Asp 変異酵素はそれぞれ 68%, 59%と高効率でトレハロースを合成した.

### (5) 結論:

アノマー反転型酵素 GH37 トレハラーゼ改変酵素と フッ化グルコースを用いた逆反応によりトレハロースを合成した. 野生型酵素は, グルコース存在下で フッ化糖を速やかにトレハロースを経由してグルコースへと変換し, トレハロース蓄積はわずかであった. 塩基触媒変異酵素は, 反応速度は著しく低いながらトレハロースの蓄積が認められた(実験条件下で収率 8.6%). 触媒残基周辺に位置する Asp160 および Tyr512 変異酵素 D160N および Y512F は, トレハロース合成反応をそれぞれ収率 59%および 68%と高い効率で触媒した. フッ化グルコースの安定性を考慮すると, これらは著しく高い合成効率である. Asp160 および Tyr512 が, 加水分解の基質となる水および塩基触媒に影響を与えた結果と考えられた.

### 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)

Kitamura M, Okuyama M, (7名省略, 4番目) Structural and Functional Analysis of a Glycoside Hydrolase Family 97 Enzyme from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Biol. Chem.*, **283**(52): 6328-6337, 2008. 査読有り

Saburi W, Hondoh H, (4名省略, 4番目) Structure-function relationship of substrate length specificity of dextran glucosidase from *Streptococcus mutans* *Biologia*, **63**(6), 1000-1005, 2008. 査読有り

Hondoh H, Saburi W, Mori H, (4名省略) Substrate recognition mechanism of  $\alpha$ -1,6-glucosidic linkage hydrolyzing enzyme, dextran glucosidase from *Streptococcus mutans*. *J Mol Biol.*, **378**(4):911-920, 2008. 査読有り

Kang MS, Okuyama M, (6名省略, 6番目) Aglycone specificity of *Escherichia coli*  $\alpha$ -xylosidase investigated by transxylosylation. *FEBS J.*, **274**(23):6074-6084, 2007. 査読有り

Nakai H, Tanizawa S, (13名省略, 12番目) Function-unknown glycoside hydrolase family 31 proteins, mRNAs of which were expressed in rice ripening and germinating stages, are

$\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -xylosidase. *J Biochem.*, **142**(4): 491-500, 2007. 査読有り

Saburi W, Hondoh H, (6名省略, 5番目)  
Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Streptococcus mutans* dextran glucosidase., *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, **63**(Pt 9): 774-776, 2007. 査読有り

Lee, J.-H., Saito, S., Mori, H., (6名省略)  
Molecular Cloning of cDNA for Trehalase from the European Honeybee, *Apis mellifera* L., and Its Heterologous Expression in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**(9), 2256-2265, 2007. 査読有り

Nishimoto M, Mori H. (10名省略)  
Molecular Cloning of cDNAs and Genes for Three  $\alpha$ -Glucosidases from European Honeybees, *Apis mellifera* L., and Heterologous Production of Recombinant Enzymes in *Pichia pastoris*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**(7): 1703-1716, 2007. 査読有り

〔学会発表〕(計32件)

牧 孝多朗, 加水分解反応の抑制によりトレハロースを縮合蓄積させるトレハラーゼ変異酵素, 日本農芸化学会大会, 2009年3月28日, 福岡(マリンメッセ)

西村 崇志, Isomaltooligosaccharide 6-glucosyltransferase(16GT)のイソマルトオリゴ糖への作用と転移に関する構造因子, 日本農芸化学会大会, 2009年3月28日, 福岡(マリンメッセ)

森 春英, 大腸菌 trehalase の触媒アミノ酸残基の決定と glycosynthase 反応, 日本応用糖質科学会大会, 2008年9月18日, 沖縄(琉球大)

貞廣 樹里, デキストリンデキストラナーゼ遺伝子の異種宿主発現および組換え酵素の解析, 2008年9月18日, 沖縄(琉球大)

鐘ヶ江倫世, 新規酵素 isomaltooligosaccharide 6-glucosyltransferase (16GT)の機能解析, 日本農芸化学会北海道支部学術合同講演会, 2008年8月8日, 札幌(北大)

Mori H. Identification of essential catalytic residues in an Escherichia coli trehalase and an inverting glycosynthase reaction catalyzed by the catalytic base mutated enzyme, XXIV International Carbohydrate Symposium, 2008年7月28日, ノルウェー/オスロ(オスロ大学)

Okuyama M, Functional and structural analysis

of glycoside hydrolase family 97 enzyme from *Bacteroides thetaiotaomicron*, XXIV International Carbohydrate Symposium 2008年7月27-28日, ノルウェー/オスロ(オスロ大学)

鐘ヶ江 倫世, 新しく見出されたイソマルトオリゴ糖不均化酵素の遺伝子クローニングと異種宿主発現, 日本農芸化学会大会, 2008年3月28日, 名古屋(名城大)

Hondoh H, Substrate recognition mechanism of dextran glucosidase from *Streptococcus mutans* (DexB), Carbohydrate Bioengineering Meeting 7, 2007年4月22-25日, ドイツ/ブラウンシュヴァイ

〔図書〕(計1件)

Okuyama M, Mori H., Hondoh H, Nakai H, Saburi W, Kang MS, Kim YM, Nishimoto M, Wongchawalit J, Yamamoto T, Son M, Lee JH, Mar SS, Fukuda K, Chiba S, Kimura A; Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK; Molecular mechanism of  $\alpha$ -glucosidase In *Carbohydrate-active enzymes: structure, function, and applications* (Ed. Park K-H.) 2008, pp.64-76.

## 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・准教授  
研究者番号: 80241363

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし