

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05824

研究課題名(和文)糖質化性改変大腸菌を用いた新規酵素特化型スクリーニング

研究課題名(英文) Screening of novel carbohydrate phosphorylase using carbohydrate assimilation modified *Escherichia coli*

研究代表者

中井 博之 (Nakai, Hiroyuki)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00400002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホリラーゼは、無機リン酸存在下で糖質のグリコシド結合を非還元末端側から順次加水分解する酵素である。その反応は可逆的であり、オリゴ糖を効率的に合成することが出来る上、厳密な位置選択性を活かして目的とするオリゴ糖の選択的合成が可能である。しかしながら、合成可能なオリゴ糖の種類はホスホリラーゼの種類に依存する。今後合成可能なオリゴ糖のパリエーション拡大には、新たな反応特異性を示すホスホリラーゼの発見が必須である。本研究では、バイオインフォマティクス手法に加え、糖質化性を改変した大腸菌を用いた新規ホスホリラーゼの探索に特化したメタゲノミクススクリーニング手法により新規酵素の探索を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規ホスホリラーゼの探索は、新たな生体内糖代謝機構の提唱に繋がり、生物化学的意義から学術的に大変重要な研究である。さらに新規酵素群を活用したオリゴ糖高収率合成法の確立により、特性及び機能評価が未実施だった様々なオリゴ糖がライブラリー化され、且つ大量調製可能となり、様々な学術研究へのオリゴ糖供給が可能となる。また、オリゴ糖の網羅的機能性評価の実施により、これまで明らかにされてこなかったオリゴ糖の生理機能と構造の相関が解明されることで、今後特定の機能性を追求したオリゴ糖の選択・利用が可能になり、機能性オリゴ糖の食品及び医薬品素材として応用性を見出すことで、食品・医療産業界へ貢献を果たす。

研究成果の概要(英文)：Phosphorylases are exolytic enzymes catalyzing phosphorolysis of particular glycosides to produce sugar 1-phosphate with strict substrate specificity. The reaction is reversible, enabling the practical synthesis of oligosaccharides. However, there is little variation among phosphorylases and this limits their utilization for the production of oligosaccharides. Therefore, it would be beneficial to identify phosphorylases with previously unreported substrate specificities. In this study, we performed screening of novel enzymes by bioinformatics method and metagenomics method specialized for novel phosphorylase using carbohydrate assimilation modified *Escherichia coli*.

研究分野：糖質科学

キーワード：ホスホリラーゼ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

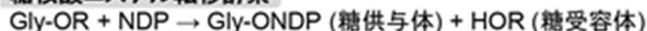
### 1. 研究開始当初の背景

糖質は生物の生命維持に必要不可欠であり、生命現象の根幹に関わる重要な機能を果たす。その糖質の生体内での合成および分解は酵素反応により行われている。糖質グリコシド結合の消長に關与する酵素は、水の作用により分解生成物を得る加水分解酵素、リン酸ジエステル結合の高エネルギー化により糖質合成を触媒する糖核酸エステル転移酵素、無機リン酸存在下での糖 1-リン酸生産を触媒する加リン酸分解酵素の 3 種類に分類される。

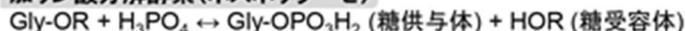
#### 加水分解酵素



#### 糖核酸エステル転移酵素



#### 加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)



#### 糖質グリコシド結合の消長に關与する酵素群

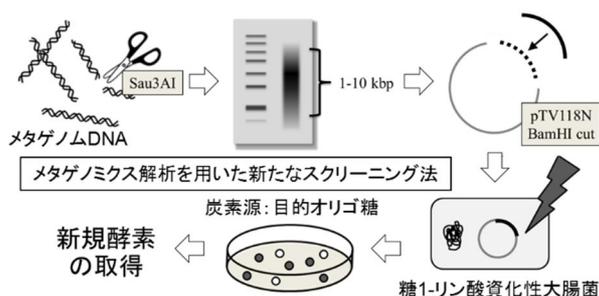
現在までに多種多様な加水分解酵素および糖核酸エステル転移酵素が見出され、その生物学的意義から詳細な機能・構造解析が進められている。一方で、加リン酸分解酵素の報告例は著しく少なく、他の糖質関連酵素に比べて知見が乏しい。近年ゲノム全塩基配列の解読を目標としたゲノムプロジェクトが様々な生物種を対象に実施されており、今後新たな機能を有する加リン酸分解酵素の発見の可能性は極めて高い。新規糖質関連酵素の発見および機能解明は、生体内での糖質代謝機構を理解する上で学術的に非常に重要であると同時に、食品産業的にも糖質関連酵素群が担う役割は大きい。特に、加水分解酵素は高分子多糖の糖化を目的として幅広く工業的に利用されている。一方で加水分解反応では生成物が複数生じることが多く、単一の糖質の大量調製法としては不向きであり、オリゴ糖をはじめとする種々の糖質の選択的な大量調製法の確立が望まれている。そこで糖核酸エステル転移酵素の糖質・複合糖鎖合成への利用が期待されるが、糖供与体として使用する糖ヌクレオチドのコストおよび本酵素群の安定性の問題から実用的な利用には至っていないのが現状である。またオリゴ糖調製の手法として有機合成法も有用であるが、保護・脱保護を含む多段階の反応段階を経る必要がある本手法は、コストおよび安全性の両面から食品用途へ応用することは困難である。

### 2. 研究の目的

上記の問題を解決するために、本研究では加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)のオリゴ糖合成反応に注目した。ホスホリラーゼは、無機リン酸存在下で糖 1-リン酸を生産(正反応)する酵素として広く認知されているが、本反応は可逆反応であり、糖供与体(糖 1-リン酸)と糖受容体を出発材料とした際、オリゴ糖合成反応(逆反応)も効率良く触媒する。そこで今回、生体内糖質代謝を理解する上で生物学的意義から学術的に重要な新規ホスホリラーゼの網羅的探索を行い、得られたホスホリラーゼ群を活用してこれまでに報告例のない新規オリゴ糖を含めた有用オリゴ糖の大量合成系を確立する。

### 3. 研究の方法

新規ホスホリラーゼの探索に特化したメタゲノミクススクリーニング手法や系統樹解析などのバイオインフォマティクス技術を駆使して新規ホスホリラーゼを網羅的・連鎖的に探索した。次に、機能未知ホスホリラーゼ遺伝子を単離し、大腸菌による各種組換え酵素の異種宿主発現系を確立した。大量調製した組換え酵素を精製し、酵素化学的諸性質(加リン酸分解能、基質特異性等)を解析した。糖供与体(糖 1-リン酸)と種々の糖受容体を出発材料として、新規ホスホリラーゼの糖受容体特異性をオリゴ糖合成反応により調査した。得られたオリゴ糖は高速液体クロマトグラフィーを用いて精製し、二次元核磁気共鳴分光法にて構造決定を行った。さらに澱粉や蔗糖など安価な天然糖質から加リン酸分解により糖 1-リン酸を生産させた後、糖受容体とのオリゴ糖合成反応により目的オリゴ糖を生産した。さらに、合成したオリゴ糖を機能性評価し、ヒトの健康保持増進に有益な生理活性を有するオリゴ糖を数多く発掘し、高機能性食品素材及び医薬品素材として応用性を見出した。



### 4. 研究成果

本研究により、複数の新規ホスホリラーゼを発見し、高機能性食品素材及び医薬品素材になり得るオリゴ糖の種類拡充に成功した。また、自然界に豊富に存在する安価な糖質資源の分解による糖 1-リン酸生産と目的とするオリゴ糖合成反応を組み合わせ、各種評価系に必要な量のオ

オリゴ糖を調製することも出来た。さらに、ヒト腸内常在菌最優勢種(GAM培地で生育可能な32菌種を使用)プロバイオティクス菌、悪玉菌を配置した使い捨てのグリセロールストックから、植菌スタンプを用いて、ライブラリー化されたオリゴ糖(0.5% w/v)を含むGAM糖分解用半流動培地が分注された96穴プレートに植菌し、OD600を指標に嫌気チャンバー内で培養した各細菌の生育度を測定することで、日和見菌や悪玉菌に資化されずにビフィズス菌など有用腸内細菌を選択的に増殖させることが可能なオリゴ糖を複数発見することが出来た。さらに、抗生物質および偽膜性腸炎原因菌であるディフィシル菌をマウスへ経口投与することで、偽膜性腸炎モデルマウスを作成し、当該オリゴ糖投与による善玉菌の選択的増殖促進効果により、偽膜性腸炎モデルマウスの体重減少を緩和できることも示した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirano R., Sakanaka M., Yoshimi K., Sugimoto N., Eguchi S., Yamauchi Y., Nara M., Maeda S., Ami Y., Gotoh A., Katayama T., Iida N., Kato T., Ohno H., Fukuya S., Yokota A., Nishimoto M., Kitaoka M., Nakai H., Kurihara S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Next-generation prebiotic promotes selective growth of bifidobacteria, suppressing Clostridioides difficile	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gut microbes	6. 最初と最後の頁 1973835
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19490976.2021.1973835.	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中井 博之
2. 発表標題 新規ホスホリラーゼの発見と合成オリゴ糖のライブラリー化
3. 学会等名 第18回日本糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村 律奈, 板橋 大輝, 喜多 春乃, 仁平 高則, 北岡 本光, 中井 博之
2. 発表標題 二糖特異的コージピオースホスホリラーゼの同定
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 新正浩暉, 春日彩香, 仁平高則, 西本完, 北岡本光, 中井博之
2. 発表標題 GH94ホスホリラーゼホモログL21SP2の機能評価
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------