

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05826

研究課題名（和文）GH30 -1,6-グルコシダーゼの構造機能解析と有用糖質合成への応用

研究課題名（英文）GH30 beta-1,6-glucosidase: Structure-function study and application for valuable carbohydrate synthesis.

研究代表者

磯野 直人 (ISONO, Naoto)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：70378321

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）：細菌Halobacillus halophilus由来 -1,6-グルコシダーゼの縮合反応を利用して、高濃度の基質から -1,6-グルコシド結合を含む様々な希少オリゴ糖を合成する方法を開発した。また、本酵素の触媒残基変異体「グライコシンターゼ」を用いて、-1,6-グルコシド結合を含む糖質を効率的に合成する方法を開発した。さらに、細菌Caldicellulosiruptor bescii由来 -1,6-グルコシダーゼの立体構造を明らかにし、酵素の構造と機能の関連の一部を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では基質特異性が厳密な酵素を用いて、特定のグリコシド結合を有する糖質の選択的な合成方法を開発した。本研究の成果は食品・医薬品・化粧品の成分の製造や、糖質および関連酵素の機能解析に役立つものである。また、GH30 -1,6-グルコシダーゼの立体構造を初めて明らかにした。立体構造から得られる知見は、生化学・酵素科学・糖質科学の発展に寄与するものであり、酵素の人工的改変などに役立つ情報を含む。

研究成果の概要（英文）：We developed a method for the synthesis of various rare oligosaccharides containing -1,6-glucosidic linkages from high concentrations of substrates via a condensation reaction of -1,6-glucosidase from the bacterium Halobacillus halophilus. In addition, we developed an efficient method for the synthesis of carbohydrates containing -1,6-glucosidic linkages using catalytic residue mutants "glycosynthases." Furthermore, the three-dimensional structure of -1,6-glucosidase from the bacterium Caldicellulosiruptor bescii was determined, and the structure-function relationship of the enzyme was partially elucidated.

研究分野：糖質科学

キーワード：GH30 -1,6-グルコシダーゼ -1,6-グルコシダーゼ グライコシンターゼ ゲンチオピオース 結晶構造 縮合反応

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖質加水分解酵素ファミリー30 (GH30) には  $\beta$ -D-グリコシド結合を分解するアノマー保持型酵素が属している。GH30 はサブファミリー1~10 に分類されており、このうち細菌由来の GH30 サブファミリー1 (GH30\_1) 酵素の機能についてはほとんど調べられていない。研究代表者は本研究開始前に、好塩性細菌 *Halobacillus halophilus* 由来の GH30\_1 酵素 (HhGH30A) がアノマー保持型の  $\beta$ -1,6-グルコシダーゼ活性を有することを発見した。 $\beta$ -1,6-グルコシダーゼに関する報告は非常に少なく、立体構造や酵素の構造と機能の関係は明らかにされていなかった。また、 $\beta$ -1,6-グルコシド結合を有する天然の糖質にはユニークな機能や重要な機能を有するものが多いため、 $\beta$ -1,6-グルコシド結合含有糖質を人工的に合成する技術は、食品・医薬品・化粧品成分の製造に役立つ可能性があった。

### 2. 研究の目的

GH30  $\beta$ -1,6-グルコシダーゼの立体構造や構造機能相関を明らかにすることを目的とした。また、本酵素の縮合反応やグライコシンターゼ反応を利用して、 $\beta$ -1,6-グルコシド結合を含む様々な糖質の合成を行い、有用糖質の創出などに役立つ成果を得ることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Halobacillus halophilus* 由来 GH30 酵素 (HhGH30A) の調製

HhGH30A をコードする遺伝子をベクター pCold 2 に連結し、大腸菌 BL21(DE3) を形質転換した。培養した大腸菌を超音波破碎し、ニッケルカラムを用いて酵素を精製した。関連して、自動誘導培地 (AI 培地) を使用したコールドショック発現系においては、IPTG を添加することなく可溶性酵素を発現可能であることを明らかにした。

#### (2) 縮合反応によるオリゴ糖の合成

グルコースと、グルコース以外の糖類 (マンノース、フルクトース、スクロース) を高濃度に含む反応液に HhGH30A を加えて、縮合反応を行った。HPLC (Sugar-D) で分取した後、NMR と ESI-MS で構造を決定した。また、HhGH30A と活性化 Sepharose 4B を共有結合によりカップリングした固定化酵素を作製した。固定化酵素カラム → グルコース溶液容器 (初濃度: 4 M) → ポンプ → 固定化酵素カラムの順に連結した循環装置を作製し、恒温器 (50 °C) の中で縮合反応を行い、ゲンチオビオースの合成を行った。

#### (3) HhGH30A 変異型酵素の作成

Recombination PCR 法により、HhGH30A の求核触媒残基であるグルタミン酸をグリシン、アラニン、セリンに置換した変異型酵素 E296G、E296A、E296S を生産するためのプラスミドを作成した。野生型酵素と同様に変異型酵素を調製した。

#### (4) HhGH30A 変異型酵素を用いたオリゴ糖・多糖・配糖体の合成

HhGH30A の変異型酵素 (主に E296G) を用いて、 $\alpha$ -グルコシルフルオリド ( $\alpha$ -GlcF) をドナー基質、種々の糖質 (単糖、オリゴ糖、多糖、配糖体) をアクセプター基質とした反応を行った。HPLC (Sugar-D)、サイズ排除クロマトグラフィー、エタノール沈澱などで生成物を精製し、NMR、ESI-MS、メチル化分析などで構造を解析した。また、ラミナリビオース、 $\alpha$ -GlcF、 $\alpha$ -グルコース 1-リン酸 ( $\alpha$ -Glc1P) を基質として、E296G と *Ochromonas danica* 由来  $\beta$ -1,3-グルカンホスホリラーゼ (OdBGP) の反応を同時に行い、上記と同様に生成物の精製と構造解析を実施した。

#### (5) *Caldicellulosiruptor bescii* 由来 GH30 酵素 (CbGH30\_1) の調製

CbGH30\_1 をコードする遺伝子をベクター pET-23a に連結し、大腸菌 BL21(DE3) を形質転換した。培養した大腸菌を超音波破碎し、ニッケルカラムと陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて酵素を精製した。

#### (6) 酵素の結晶化と立体構造解析

ハンギングドロップ蒸気拡散法により、各種沈殿剤を用いて酵素単独またはリガンドとの複合体の結晶化を行った。X 線回折装置を用いて各結晶からの回折強度データを測定した後、構造既知の GH30 タンパク質をモデルとした分子置換法により位相決定を行い、酵素の立体構造を決定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 縮合反応による $\beta$ -1,6-グルコシド結合含有オリゴ糖の合成

縮合反応の最適 pH は 6.0、最適反応温度は 60 °C であった。3.1 M マンノースと 0.5 M グルコースを

基質として、HhGH30A の反応を 3 日間行ったところ、ヘテロ二糖である  $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)-D-マンノピラノースが得られた。同様に 3.1 M フルクトースと 0.5 M グルコースを基質とした反応を行ったところ、ヘテロ二糖である  $\beta$ -D-グルコピラノシル- $\beta$ -D-フルクトフラノース(ゲンチオビオース)が得られた。また、1.8 M スクロースと 1.8 M グルコースを基質として、HhGH30A の反応を 2 日間行ったところ、 $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-フルクトフラノシド(ゲンチアノース)と  $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-フルクトフラノシドの 2 種類のヘテロ三糖が得られた。このように、HhGH30A を用いた縮合反応では  $\beta$ -1,6-グルコシド結合を含む希少なオリゴ糖を選択的に合成できることが明らかとなった。

HhGH30A を固定化したカラムを用いた縮合反応では 20 時間の反応で 4 M のグルコースから 0.3 M のゲンチオビオースが得られた。また、固定化酵素は 20 回以上の繰り返し利用においても非常に安定した活性を示した。このように、HhGH30A を利用したゲンチオビオースの効率的な製造装置を作製することに成功した。

### (2) グライコシターゼ反応による $\beta$ -1,6-グルコシド結合含有糖質の合成

求核触媒残基に変異を導入した HhGH30A 変異型酵素は各種基質に対する加水分解活性を失った。 $\alpha$ -GlcF をドナー基質、グルコースをアクセプター基質とした反応を行ったところ、ゲンチオビオースが選択的に合成された。このように、変異型酵素はグライコシターゼとして機能することが確認された。3 種類の変異型酵素のうち、E296G が最も高い転移活性を、E296S が最も低い転移活性を示した。E296G を様々なアクセプター二糖や三糖に作用させたところ、いずれも  $\beta$ -1,6-グルコシド結合を含むオリゴ糖が合成された。ラミナリビオースを基質とした場合は、アクセプターの非還元末端側と還元末端側のどちらのグルコース残基にも  $\beta$ -1,6-グルコシド結合でグルコースを転移できたが、特に非還元末端側を好むことが明らかとなった。また、コンブ由来のラミナリン( $\beta$ -1,3-グルカン主鎖とする多糖で、部分的に  $\beta$ -1,6-グルコシド結合の分岐構造が存在)をアクセプターとした反応を行ったところ、 $\beta$ -1,6-グルコシド結合による分岐が大幅に増加した生成物が得られた。さらに、ラミナリビオース、 $\alpha$ -GlcF、 $\alpha$ -Glc1P を基質として、E296G と OdBGP( $\beta$ -1,3-グルカン伸長酵素)の反応を同時に行ったところ  $\beta$ -1,6-グルコシド結合による分岐を有する  $\beta$ -1,3-グルカン( $\beta$ -1,3-1,6-グルカン、数平均重合度 35、重量平均重合度 56)が得られた。また、*p*-ニトロフェニル  $\beta$ -グルコシドをアクセプターとした反応では、 $\beta$ -1,6-グルコシターゼの簡便な活性測定に有用な *p*-ニトロフェニル- $\beta$ -ゲンチオビオシドが得られた。このように、HhGH30A のグライコシターゼは  $\beta$ -1,6-グルコシド結合を含む様々な糖質の合成や加工に役立つことが示された。

### (3) $\beta$ -1,6-グルコシターゼの立体構造

HhGH30A について、様々な条件による結晶化を試みたが、微小な結晶しか得られず、X 線構造解析には至らなかった。そこで、HhGH30A とアミノ酸配列類似度が約 50% であり、基質特異性が良く似ている CbGH30\_1 の結晶化を行った。その結果、分解能約 2 Å で酵素の構造を決定することができ、CbGH30\_1 は他の GH30 酵素と同様に TIM バレル構造を持つことが明らかとなった(図 1)。酵素-グルコース複合体では、グルコースがサブサイト-1 の位置に結合していると予想された。得られた立体構造に基づき、いくつかの変異型酵素を作成した。CbGH30\_1 は  $\beta$ -グルコシターゼ活性に加えて、若干の  $\beta$ -キシロシターゼ活性を有する。CbGH30\_1 のサブサイト-1 の構成に関与するシステイン残基を、より大きな側鎖構造を有するフェニルアラニン残基に置換した C350F では、酵素の基質特異性に変化が生じ、*p*-ニトロフェニル  $\beta$ -キシロシドの分解能力が維持されていたのに対して、ゲンチオビオースと *p*-ニトロフェニル  $\beta$ -グルコシドの分解能力が失われていた。したがって、C350 はグルコース残基の C-6 位と相互作用するアミノ酸残基であると推測された。本研究で作成した他の変異型酵素では  $\beta$ -1,6-グルコシド結合を特異的に分解する性質には変化が認められなかった。

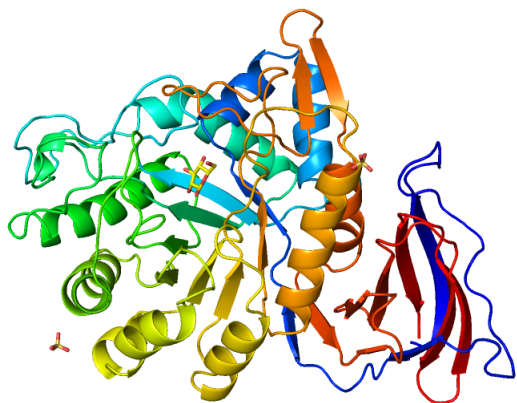


図 1:CbGH30\_1/グルコース複合体の構造

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 Yukino Tsujimoto, Naoto Isono	4. 巻 35
2. 論文標題 Protein expression autoinduction in a cold-shock expression system in Escherichia coli	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Biomolecular Techniques	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7171/3fc1f5fe.76009c9a	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10件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 磯野直人
2. 発表標題 糖の機能変換：ありふれた糖から有用な糖をつくる
3. 学会等名 健康科学食品研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川口拓途, 安田愛梨, 磯野直人
2. 発表標題 グライコシンターゼを利用した -1,6-グルコシド結合含有糖質の合成
3. 学会等名 日本応用糖質科学会中部支部
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中井夏穂, 水谷花菜, 石川涼一, 柳原和典, 中川佳紀, 高木宏基, 三宅英雄, 磯野直人
2. 発表標題 Caldicellulosiruptor bescii由来 -1,6-グルコシダーゼの構造と機能の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部・関西支部
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中井夏穂, 小川恵莉, 石川涼一, 柳原和典, 中川佳紀, 高木宏基, 三宅英雄, 磯野直人
2. 発表標題 Caldicellulosiruptor bescii由来GH30酵素の構造と機能の解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中井夏穂, 小川恵莉, 石川涼一, 柳原和典, 高木宏基, 磯野直人
2. 発表標題 Caldicellulosiruptor bescii由来 GH30酵素の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中井夏穂, 小川恵莉, 石川涼一, 柳原和典, 高木宏基, 磯野直人
2. 発表標題 好熱菌由来 -グルコシダーゼ/キシロシダーゼの機能解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会中部支部
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田愛梨, 三宅英雄, 勝崎裕隆, 梅川碧里, 磯野直人
2. 発表標題 Halobacillus halophilus由来GH30_1酵素のグライコシターゼ化
3. 学会等名 日本応用糖質科学会中部支部
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田愛梨, 三宅英雄, 勝崎裕隆, 梅川碧里, 磯野直人
2. 発表標題 GH30 -1,6-グルコシダーゼのグライコシターゼ化
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯野直人
2. 発表標題 ゲノム情報を活用した有用糖質の合成
3. 学会等名 三重大学と地元企業との連携セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田愛梨, 寺田真衣, 伊東芽以, 勝崎裕隆, 三宅英雄, 梅川碧里, 磯野直人
2. 発表標題 Halobacillus halophilus由来GH30_1酵素の機能解析と変異体作製
3. 学会等名 日本応用糖質科学会中部支部
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
研究 分担者	三宅 英雄  (MIYAKE Hideo)  (50362364)	三重大学・生物資源学研究所・准教授   (14101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	勝崎 裕隆  (KATSUZAKI Hirotaka)  (10262990)	三重大学・生物資源学研究科・准教授    (14101)	
研究分担者	梅川 碧里  (UMEKAWA Midori)  (60633097)	三重大学・生物資源学研究科・准教授    (14101)	

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