

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580099

研究課題名（和文）加水分解酵素を糖転移酵素に変換する新技術の開発～アノマー保持型・反転型をこえて～

研究課題名（英文）Conversion of hydrolases into transglycosidases

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（和文）：多様なオリゴ糖の合成に、糖質加水分解酵素が多用されている。これを更に高効率にするために、加水分解酵素に類似する糖転移酵素を解析し、転移活性を発揮するためのアミノ酸残基を特定した。糖転移酵素のアノマー反転型加水分解酵素に類似するドメインが触媒ドメインであり、加水分解酵素同様の活性ポケットを有し、部分的な差違により転移酵素となっていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A variety of oligosaccharides can be produced by carbohydrate hydrolases. In this work, amino acid residues responsible for high transglycosylation activities were identified through the comparison of transglycosidases with hydrolases. It was clarified that one transglycosidase had a catalytic domain similar to anomer-inverting hydrolases, which possess no transglycosidase activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：酵素化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖質はエネルギー分子・生命の機能的分子であり、食品・薬品として有用性は高い。オリゴ糖は種類が多く、新規機能開拓の可能性は高い。新規機能の開拓には、まずはオリゴ糖の合成が必須であり、オリゴ糖の効率的合成系の開発が求められている

(2) オリゴ糖の合成に加水分解酵素が広く利用されている。一般に安定で多様性も高いが、本来の加水分解活性を抑制しつつ、高い糖転移能が求められる。効率的オリゴ糖合成の新

技術（グリコシターゼ技術など）が開発されているが、高エネルギー物質フッ化糖への依存が高く、実際の利用には様々な制限が生じている。

2. 研究の目的

本申請研究では、加水分解酵素を改変して高い糖転移能を付与する基盤研究として、加水分解酵素に類似した糖転移酵素を研究する。糖転移のメカニズムを解析し、糖転移に関わる構造ホットスポットを特定し、加水分解酵素の高度糖転移酵素化をめざす。

糖質加水分解酵素は、基質のアノマー型を生成物で保持または反転することにより、アノマー保持型酵素とアノマー反転型に大別される。このうち、糖転移反応を触媒する酵素は、アノマー保持酵素のみである。

本研究では、対象酵素として、アノマー保持型転移酵素および、アノマー反転型酵素に構造上似ていると推定される転移酵素を扱う。従ってこれら転移酵素の解析により、アノマー保持・反転型を超えて水解酵素が転移酵素化の可能性を見出して、天然材料からの有用オリゴ糖の効率的生産につながる。

3. 研究の方法

(1) アノマー保持型酵素：

① アノマー保持型加水分解酵素 (DG 酵素, OG 酵素) と転移酵素 (I6GT) の詳細構造を比較し、ホットスポット候補を挙げる。

3 酵素ともに立体構造情報があり、全体構造は類似する。ポケット状の基質結合部位細部の詳細比較により、ホットスポット候補をあげる。アノマー保持型酵素では、加水分解は水分子への転移反応とみなすことができるので、特に受容体結合部位周辺に注目する。

② 加水分解-転移反応の速度論的評価

両者が混合した場合の反応スキームを想定し、速度論的に反応定数による転移能評価方を確立する。

③ ホットスポット候補変異酵素の解析

変異酵素は大腸菌組換え体により生産し精製酵素を用いて評価する。

(2) アノマー反転型酵素

糖転移酵素 (DD 酵素) は 1284 アミノ酸残基からなる分子量約 15 万のタンパク質である。中央領域にアノマー反転型加水分解酵素 (GA 酵素) に配列類似性がある。

① 活性に必須な最小コア構造の限定。大腸菌での発現系を用いて、DD 酵素を末端から削り込んだタンパク質を調製して、活性に必須なコア構造を特定する。

② 推定触媒残基変異酵素の解析。DD 酵素の中央ドメインが触媒ドメインと推定されるが、これを明らかにするために推定触媒残基を決定し、その機能を生化学的に解明する。グルコアミラーゼは構造既知であり詳細に研究されており、酸触媒、塩基触媒、および基質結合に関与するアミノ酸残基に相当する DD 酵素の各アミノ酸残基を改変し、酵素活性の変化を解析し、速度論に従い評価し、改変アミノ酸の酵素反応における機能を推定する。DD 酵素の生成物はイソマルトオリゴ糖であるが、現有設備 HPAEC-PAD による精密な定量により、DD 酵素の初速度解析系はすでに確立している。触媒残基の機能解析には、基質として通常のイソマルトオリゴ糖の他に、フッ化糖も利用して、変異酵素の速度定数の変化を比較して、求核触媒基・一般酸塩基触媒基の判定を行う。

4. 研究成果

(1) アノマー保持型：

① 反応速度論に基づく加水分解・糖転移反応機構：4-ニトロフェニル α グルコシドを基質としてグルコースおよび 4-ニトロフェノールの生成速度を精密に測定し、基質濃度依存的变化を解析した。この結果は、2 段階の反応を指示した。すなわち、1 段目で酵素基質複合体からアグリコンが遊離して酵素-グルコース中間体を形成、2 段目では、水分子が入って加水分解、またはもう一分子の基質と複合体形成後糖転移生成物ができるメカニズムである。理論から考えられる通り、転移率 (水解と転移の速度の合計に対する転移速度の比率) は基質濃度に対して飽和曲線となり、転移能は定数 K_{tg} (転移率 50% を与える基質濃度)、簡易的にはある基質濃度での転移率の比較により評価できることが示された。

② I6GT の高い糖転移活性に寄与する構造因子の特定： 関連酵素 (α グルコシドに作用する加水分解酵素： α グルコシダーゼ, OG 酵素, DG 酵素) の既知構造から活性ポケット形成に関与するアミノ酸を選定し、配列比較から I6GT における該当アミノ酸残基を推定した。これらに変異を導入した変異酵素の機能解析により、I6GT の高転移活性に強く関与する構造因子ホットスポットを見いだした。

③ 関連加水分解酵素への高転移能付与： 前述の糖転移に関わる重要構造因子を加水分解酵素 (DG 酵素, グルコシダーゼ類) に導入し、変異酵素を作出した。水解・転移の各反応初速度を精密に測定し、転移率 (転移速度の対全反応速度比) により評価した。DG 酵素および各種グルコシダーゼ類の変異酵素には、転移率の向上したものが見出された。設定反応条件下で専ら転移反応のみを触媒する酵素も得られた。転移率増加に速度増加を伴う変異酵素も得られた。高濃度側で基質阻害様速度低下を示す変異酵素も得られ、これが糖転移によるものであることを速度論的に証明した。

④ α グルコシダーゼの特徴的機能 (下記 3 点) に強く関与するホットスポットの特定と改変： ミツバチ α グルコシダーゼ 3 種は次の特徴的性質を有する。(1) 基質特異性 (ショ糖・マルトオリゴ糖), (2) 糖転移率, (3) 転移生成物の結合特異性 ($\alpha 1,4$ および $\alpha 1,6$)。これらは、触媒残基周辺のわずか 2 アミノ酸残基の変異により大きく変化した。これによって、マルトース (Glc $\alpha 1-4$ Glc) からパノース (Glc $\alpha 1-6$ Glc $\alpha 1-4$ Glc), ショ糖からエルロース (Glc $\alpha 1-4$ Glc-Fru) やテアンデロース (Glc $\alpha 1-6$ Glc-Fru) を効率良く生成する変異酵素が作出された。変異酵素による触媒速度は、転移反応のために通常のみカエリ

ス・メンテン式から逸脱し、高基質濃度により活性化または活性抑制の場合があり、これらは①項でのべた加水分解-転移反応モデルにより解釈された。

(2) アノマー反転型：

① DD 酵素の活性に必要な最小コア構造：DD 酵素は、一次配列および二次構造予測により、5 ドメイン (N1-N2-A-B-C) 構成であると予測された。欠失実験により、B-C ドメインは活性には必須ではなく、N1-A ドメインが必須最小コア構造であると判明した。コア構造酵素は、野生型と比べて取扱が容易であり、大腸菌組換え体から高度精製標品を大量に調製でき、DD 酵素の解析に有用であった。

② DD 酵素の触媒ドメイン推定：A ドメインが触媒ドメインであることを明らかにした。A ドメインはアノマー反転型加水分解酵素 (GA 酵素、トレハラーゼなど) の触媒ドメインと一次構造上類似性を示し、二次構造予測とあわせて、 $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造と想定された。これに基づき GA 酵素触媒アミノ酸 2 残基に対応する酸性アミノ酸 2 残基を推定し、これに変異を導入した酵素を作成し、解析した。該当アミノ酸残基変異酵素は、全く活性を示さず、すなわちこれらアミノ酸が DD 酵素においても活性に必須であった。従って、DD 酵素の A ドメインは GA 酵素触媒ドメインと構造的に類似した触媒ドメインであると判断された。

③ DD 酵素触媒アミノ酸残基の機能：前項の推定触媒アミノ酸 2 残基が、触媒反応機構上、一般酸塩基触媒および求核触媒として機能することを生化学的に示した。すなわち、求核触媒残基を Ala, Ser に置換した酵素は、通常の基質に対して活性を失ったが、通常の基質ではない β フッ化糖を基質として転移する、グライコシンターゼ活性を示した。酸塩基触媒残基変異酵素は、通常の基質に対する活性を失うが、良い脱離基を持つ α フッ化糖には作用した。

④ DD 酵素触媒中心近傍アミノ酸改変酵素：GA 酵素の触媒中心近傍の 16 アミノ酸残基のうち、DD 酵素では保存されない 7 アミノ酸残基の変異酵素を解析した。求核触媒残基周辺の 3 残基の GA 酵素型への変換により DD 酵素活性は失われ、この領域が DD 酵素活性に必須であり、かつ GA 酵素とは大きく異なることが示された。

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 10 件)

① Tagami T, Tanaka Y, Mori H, Okuyama M, and Kimura A, *Enzymatic Synthesis of*

Acarviosyl-maltooligosaccharides Using Disproportionating Enzyme 1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 77, 312-319 (2013). 査読あり DOI: 10.1271/bbb.120732

② Ngiwsara L, Iwai G, Tagami T, Sato N, Nakai H, Okuyama M, Mori H, Kimura A. Amino Acids in Conserved Region II Are Crucial to Substrate Specificity, Reaction Velocity, and Regioselectivity in the Transglucosylation of Honeybee GH-13 α -Glucosidases. *Biosci Biotechnol Biochem.* 76, 1967-1974 (2012). 査読あり DOI: 10.1271/bbb.120473

③ Kim YM, Saburi W, Yu S, Nakai H, Maneesan J, Kang MS, Chiba S, Kim D, Okuyama M, Mori H, and Kimura A. A Novel Metabolic Pathway for Glucose Production Mediated by α -Glucosidase-catalyzed Conversion of 1,5-Anhydrofructose. *J. Biol. Chem.*, 287, 22441-22444(2012). 査読あり DOI: 10.1074/jbc.C112.360909

④ Kim YM, Kiso Y, Muraki T, Kang MS, Nakai H, Saburi W, Lang W, Kang HK, Okuyama M, Mori H, Suzuki R, Funane K, Suzuki N, Momma M, Fujimoto Z, Oguma T, Kobayashi M, Kim D, and Kimura A. Novel dextranase catalyzing cycloisomaltooligosaccharide formation and identification of catalytic amino acids and their functions using chemical rescue approach. *J. Biol. Chem.*, 287(24), 19927-19935, 2012. 査読あり DOI: 10.1074/jbc.M111.339036

⑤ Suzuki N, Kim YM, Fujimoto Z, Momma M, Okuyama M, Mori H, Funane K, and Kimura A. Structural elucidation of dextran degradation mechanism by *Streptococcus mutans* dextranase belonging to glycoside hydrolase family 66. *J. Biol. Chem.*, 287(24), 19916-19926, 2012. 査読あり DOI: 10.1074/jbc.M112.342444

⑥ Suzuki N, Kim YM, Fujimoto Z, Momma M, Kang HK, Funane K, Okuyama M, Mori H, and Kimura A. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of dextranase from *Streptococcus mutans*. *Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 67(Pt 12), 1542-1544, 2011. 査読あり DOI: 10.1107/S1744309111038425

⑦ M6tyána JA, Fazekas E, Mori H, Svensson B, Bagossi P, Kandra L, and Gyémánt G. Transglycosylation by barley α -amylase 1. *J. Mol. Catalysis B, Enzymatic*, 72, 229-237, 2011. 査読あり DOI: 10.1016/j.molcatb.2011.06.010

⑧ Kobayashi M, Hondoh H, Mori H, Saburi W, Okuyama M, and Kimura A. Calcium Ion-Dependent Increase in Thermostability of Dextran Glucosidase from *Streptococcus mutans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(8), 1557-1563, 2011. 査読あり DOI: 10.1271/bbb.110256

- ⑨ Kim YM, Shimizu R, Nakai H, **Mori H**, Okuyama M, Kang MS, Fujimoto Z, Funane K, Kim D, and Kimura A. Truncation of N- and C-terminal regions of *Streptococcus mutans* dextranase enhances catalytic activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **91**(2), 329-339, 2011. 査読あり DOI: 10.1007/s00253-011-3201-y
- ⑩ Kang HK, Kim YM, Nakai H, Kang MS, Hakamada W, Okuyama M, **Mori H**, Nishio T, and Kimura A. Suicide Substrate-based Inactivation of Endodextranase by ω -Epoxyalkyl α -D-Glucopyranosides. *J. Appl. Glycosci.*, **57**(4), 269-272, 2010. 査読あり DOI: <http://dx.doi.org/10.5458/jag.57.269>

[学会発表] (計 36 件)

- ① 貞廣 樹里, 森 春英: “デキストラン合成酵素 dextran dextrinase の触媒残基およびその機能の決定” 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 25 日, 東北大学 (仙台)
- ② Hirauchi, T., **Mori, H.**: “Conversion of Trehalose Hydrolase into Oligosaccharide Synthase by Mutation around the Catalytic Amino Acid”. Conference on Agricultural Biodiversity and Sustainability 2012 (CABS2012), 2012 年 8 月 29 日, 北海道大学 (札幌)
- ③ Aoyama, Y., **Mori, H.**: “Identification of amino acids responsible for the substrate specificity in a novel α -glucosyltransferase from *Bacillus* species”. Conference on Agricultural Biodiversity and Sustainability 2012 (CABS2012), 2012 年 8 月 29 日, 北海道大学 (札幌)
- ④ Tagami, T., **Mori, H.**: “Enzymatic synthesis of acarviosyl-maltooligosaccharides and their inhibitory effects on α -glucosidase”. 第 26 回 International Carbohydrate Symposium, 2012 年 7 月 24 日, Hotel Melia Castilla (スペイン)
- ⑤ Ngiwsara, L., **Mori, H.**: “Amino acid residues in conserved region II involved in specific function of European honeybee (*Apis mellifera*) α -glucosidase isozymes”. 第 26 回 International Carbohydrate Symposium, 2012 年 7 月 25-26 日, Hotel Melia Castilla (スペイン)
- ⑥ Sadahiro, J., **Mori, H.**: “Domain organization and catalytic amino acids of dextran dextrinase: structural similarity to inverting glucodextranase (or glucoamylase) in catalytic domain”. 第 26 回 International Carbohydrate Symposium, 2012 年 7 月 25-26 日, Hotel Melia Castilla (スペイン)
- ⑦ Song, K.M., **Mori, H.**: “Identification of a key residue for regioselectivity of α -glucosidase from *Schwanniomyces*

- occidentalis*”. 第 26 回 International Carbohydrate Symposium, 2012 年 7 月 25-26 日, Hotel Melia Castilla (スペイン)
- ⑧ Song, K.M., **Mori, H.**: “Production and characterization of recombinant α -glucosidase from *Podospora anserina* which reveals high regioselectivity for α -1,3-glucosidic linkage”. Plant and Seaweed Polysaccharides Symposium, 2012 年 7 月 18-19 日, La Cite, Nantes events center (フランス).
- ⑨ **Mori, H.**: “Enhancement of GH66 dextranase activity by truncation of N- and C-terminal variable regions, suggesting proenzyme-like activation”. 第 9 回 Carbohydrate Bioengineering Meeting, 2011 年 5 月 16-17 日, the Calouste Gulbenkian Foundation (ポルトガル)
- ⑩ 森 春英: “加水分解酵素を用いたオリゴ糖合成. 第 1 回新潟大学国際糖質科学シンポジウム「糖質科学の最前線」”. (招待講演) 2011 年 10 月 3 日, 新潟大学 (新潟)
- ⑪ 平内 亨, 森 春英: “アノマー反転型トレハラーゼ変異体により合成された新規非還元二糖の構造”. 日本応用糖質科学会 H23 大会, 2011 年 9 月 28 日, 北海道大学 (札幌)
- ⑫ 青山 泰, 森 春英: “Isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyl transferase サブサイト+1 変異酵素の機能解析”. 日本応用糖質科学会 H23 大会, 2011 年 9 月 28 日, 北海道大学 (札幌)
- ⑬ 小林 桃子, 森 春英: “Dextran glucosidase (DexB) ウォーターパス改変体の機能と構造”. 日本応用糖質科学会 H23 大会, 2011 年 9 月 28 日, 北海道大学 (札幌)
- ⑭ Lukana, N., **Mori, H.**: “Functional implication of amino acid residues in conserved region II of European honeybee α -glucosidase on substrate specificity, transglucosylation and substrate inhibition.” 日本応用糖質科学会 H23 大会, 2011 年 9 月 28 日, 北海道大学 (札幌)
- ⑮ **Mori, H.**: “Dextran glucosidase and isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyl transferase: mechanism of substrate recognition and transglucosylation.” 4th symposium on alpha-amylase family. 2010 年 9 月 28 日. Smolenice Castle(スロバキア) 招待講演
- ⑯ 砂守このみ, 森 春英: “加水分解反応の抑制により縮合反応の生成物を蓄積させるグルコアミラーゼ変異体” 日本農芸化学会東北・北海道支部合同講演会. 2010 年 9 月 28 日. 東北大農学部 (仙台)
- ⑰ 西村崇志, 森 春英: “isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyl transferase のサブサイト+1 変異酵素の機能解析” 日本応用糖

質科学会. 2010年9月15日. グランシップ
(静岡)

⑱ Ngwisa, L., Mori, H.: "Effects on reactivity of honeybee α -glucosidase III mutants by site-direct mutagenesis of residues adjacent to highly conserved region II and IV". The 25th International Carbohydrate Symposium. 2010年8月2日. 幕張メッセ (千葉)

⑲ Mori, H.: "Glycosynthase Reaction Catalyzed by Trehalase Mutant Enzymes" The 25th International Carbohydrate Symposium. 2010年8月2日. 幕張メッセ (千葉)

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

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: