

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450100

研究課題名(和文)エキソ型 α -アミラーゼの基質認識と糖転移反応の分子基盤研究課題名(英文) Molecular basis for the recognition of the substrate and for the transglycosylation reaction of an exo-type α -amylase.

研究代表者

炭谷 順一 (SUMITANI, Jun-ichi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：10264813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：配糖体化は化合物の構造を修飾するための重要な方法のひとつであり、様々な化合物の溶解性、安定性、吸収性および味質などが改変されることが知られている。本研究ではグルコースが3つ結合したマルトトリオースを特異的に配糖化する α -アミラーゼの構造情報を基に配糖化反応の分子メカニズムに迫るとともに配糖化反応を効率的に行う変異酵素の獲得を試みた。その結果、マルトトリオース特異的切断に關与するアミノ酸を同定するとともに、糖転移活性が著しく増加した変異酵素の獲得に成功した。

研究成果の概要(英文)：Glycosidation is one of the important modification methods for useful compounds, and is known as a modifier of the solubility, stability, absorbability, and taste quality. In this study, we aimed to approach the molecular mechanism for transglycosylation reaction and to obtain the mutant enzymes having effective activity for transglycosylation, based on the structural information of a maltotriose-forming α -amylase. As a result, we succeed the identification of the amino acids involving maltotriose-specific cleavage and the acquisition of the mutant enzymes with extreme high transglycosylation activity.

研究分野：応用微生物学

キーワード：glycosides maltotriose amylase transglycosylation

1. 研究開始当初の背景

天然には様々な生理活性を持つ化合物が数多く知られているが、その化合物が強いにおいや刺激を持つこと、水溶性や安定性に乏しいことによって、その利用が限定されている。食品や化粧品、医薬品への有効利用を考える上で、そのような望ましくない物性を改変することは重要である。配糖体化は化合物の構造を修飾するための重要な方法のひとつであり、様々な化合物の溶解性、安定性、吸収性および味質などが改変されることが知られている。従来、配糖体化反応を触媒する酵素として糖ヌクレオチドを基質とするグリコシル転移酵素、及び糖転移活性が高い加水分解酵素が用いられてきたが、何れもアグリコン(糖受容体)に単糖を転移する酵素であった。例外として、CGTaseがマルトオリゴ糖を転移することは知られているが、得られる配糖体は単糖配糖体とオリゴ糖配糖体の混合物であり、これまで特定重合度のオリゴ糖を転移する配糖体化酵素は知られていない。

我々は特定重合度のマルトオリゴ糖生産を目的として、デンプンからエキソ型に特定重合度のマルトオリゴ糖を生成するアミラーゼを生産する放線菌の探索を行った。その際、エンド型酵素の影響を排除するため、放線菌由来の α -アミラーゼ特異的阻害タンパク質T-76(Sumitani J, et al, *J Biosci Bioeng*, **90**, 74-80, 2000)の存在下でアミラーゼ活性を測定することによって、エキソ型アミラーゼを特異的に検出しスクリーニングした。その結果、T-76存在下のみ検出可能な、デンプンからマルトトリオース(G3)を特異的に生成する酵素(G3Amy)を生産する放線菌 *Kitasatospora* sp. MK-1785株を単離した。本菌株の培養上清からG3Amyを精製し諸特性を調べた結果、G3Amyは糖転移活性が極めて高く、加水分解と転移反応が同時進行することがわかった(図1)。糖転移反応のアグリコン特異性を調べた結果、糖類だけでなく水酸基を有する広範囲の化合物にG3を転移することがわかった(表1)。さらに精製酵素

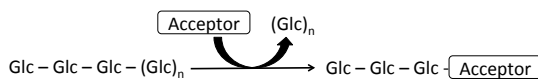


図1 G3Amyのマルトトリオース転移反応

表1 G3Amyの糖転移反応における糖受容体特異性

Acceptor	+	Acceptor	+
Methanol	+	Hydroquinone	+
Ethanol	+	Kojic acid	+
1-Butanol	+	Caffeic acid	+
2-Butanol	+	Protocatechuic acid	+
1-Heptanol	+	<i>p</i> -Nitrophenol	+
1-Octanol	+	Ferulic acid	+
Benzyl alcohol	+	Vanillin	+
Glycerol	+	(+)Catechin	+
Xylitol	+	Resveratrol	+
Mannitol	+	Ascorbic acid	+

の一次配列情報からG3Amy遺伝子を取得した結果、G3AmyはN末端側にGH13に属する触媒ドメイン(CD)、C末端側にCBM20に分類される2つのデンプン結合ドメイン(SBD)から構成され、CDは放線菌由来 α -アミラーゼと50%程度のidentityを示すことがわかったが、これらのアミラーゼは何れもゲノム配列から存在が予想されたもので、生化学的に解析されたものはなかった。また、大腸菌を宿主として本遺伝子を発現させた組換えG3Amyが精製したG3Amyと同等の特性を有していることを確認した。

さらに、G3Amyの結晶化に成功し、preliminaryな結果ではあるがX線結晶解析によって解像度2.4 ÅにてG3Amy-CDの立体構造を決定した。

2. 研究の目的

本研究は、G3Amyの高いG3生成特異性と高い糖転移活性と寛容な糖受容体選択性を発揮する分子基盤を明らかにすることで、目的のアグリコンに高い糖転移能を示すG3配糖体合成酵素を創製し、実用性を旨としたG3配糖体の酵素合成を行うことを目標として以下の目的を設定した。

- (1) G3Amyの酵素化学的諸性質の検討とサブサイト親和力の測定
- (2) G3AmyにおけるタンデムCBM20の存在意義の解明
- (3) G3Amy基質複合体のX線結晶構造解析
- (4) G3AmyのG3生成特異性に関わる分子基盤の解明とG2、G4およびG5生成酵素への変換
- (5) G3Amyの糖転移活性に関わる分子基盤の解明と糖転移活性が増大した変異酵素の取得
- (6) G3Amyの糖受容選択性に関わる分子基盤の解明と糖受容体選択性の変換
- (7) 特異な生理活性を有する配糖体合成酵素の創製と目的配糖体の高効率合成

3. 研究の方法

- (1) G3Amyの詳細な酵素化学的性質の解明

G3Amyは反応初期からG3のみを生成することが、薄層クロマトグラフィを用いた反応産物解析で示されている。そこでアミロース分解における生成還元糖量とアミロース重合度の指標となるヨウ素デンプン反応による呈色量を比較することで、G3Amyが非還元末端を認識してエキソ型にG3単位で切断しているのか、その際single attackなのかmulti attack (processive)なのか、それともアミロース鎖に対して、まずランダムに1回目の切断を行った後、還元末端側に向かってG3単位で連続的に加水分解を行うendo-processive酵素であるのか、切断様式について明らかにする。また、様々な重合度のマルトオリゴ糖に対するkinetic parametersを測定することでG3Amyのサブサイト親和性に関する定量的な情報を得る。

(2) G3Amy における CBM 欠失酵素の作製と基質並びに生成物特異性の解析

G3Amy は C 末端側に CBM20 が 2 コピー存在する (図 2) が、通常、CBM20 に分類される SBD は CD に対して 1 コピーしか存在しない。G3Amy のようにタンデムに存在するのは、放線菌に分類される微生物のゲノム情報から配列情報だけ示されている僅か 10 例だけである (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF00686#tabview=tab1>) が、何れも一次配列上、G3Amy と類似したアミラーゼである。このタンデム CBM20 が G3Amy の特性、特に G3Amy の processivity に対する影響を明らかにするため、CBM を有する野性型酵素と CBM 欠失変異酵素の基質特異性と反応産物の経時変化を追跡することで G3Amy における CBM の役割と基質認識について明らかにする。

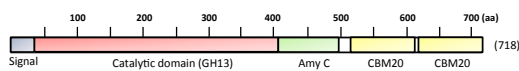


図2 G3Amy のドメイン構造

(3) G3Amy 単独及び基質複合体の高解像度 X 線結晶解析

既に構築した G3Amy の大腸菌を宿主とした発現系を用いて、X 線結晶解析を行うためのサンプルを調製する。これまでの実験結果から、G3Amy 結晶化の条件の目処は立っており、滞りなく解析データを取得できると考えている。結晶化に成功し、回折データが得られれば、G3Amy の精密な立体構造を構築する。また基質アナログ acarbose を用いた基質複合体の回折データも取得し、サブサイトを構成するアミノ酸群を同定することで、G3 特異的な切断や糖転移反応、糖受容体選択性に関与すると推定される候補アミノ酸を選抜する。もし、解像度の高い回折データが得られない場合は、取得済みの低解像度データと、他のアミラーゼの基質複合体のデータを用いた docking simulation によって G3Amy 特有の性質に関与すると推定される候補アミノ酸の選抜を行う。

(4) X 線小角散乱による G3Amy 全体構造の同定とタンデム CBM20 の機能

タンデム CBM20 の機能に関する知見を得るために、立体構造上の CD とタンデム CBM20 との位置関係やドメイン間の相互作用を明らかにするため、NMR による X 線小角散乱によって G3Amy の全体構造を同定する。得られた結果と(2)の結果からタンデム CBM20 の機能について考察する。

(5) G3Amy の G3 特異性に関与するアミノ酸の同定と特定のオリゴ糖生成酵素の創製

これまで得られている低解像度の X 線結晶解析の結果とブタ膵臓由来アミラーゼの acarbose 複合体の X 線結晶解析との docking simulation の結果から、G3Amy の N134 と Q192 が G3 特異的な切断に関与していることが推定された。両者のアラニン置換二重変異酵素を

作製し、G3 の特異的な生成に関与するアミノ酸について変異を導入し、変異酵素の性質を調べることで生化学的に G3Amy の G3 特異的な生成の全貌について明らかにする。得られた結果を基に、G3 特異的な生成能をさらに高めた変異酵素や、G2, G4, G5 を特異的に生成する変異酵素などの設計を行い、生化学的評価も行う。

(6) G3Amy の糖転移に関わるアミノ酸の同定と糖転移活性が増大した変異酵素の取得

糖転移活性が高いことで知られている *Bacillus stearothermophilus* 由来 CGTase との docking simulation の結果から、糖転移活性に関与していると考えられる触媒残基付近のサブサイトを構成するアミノ酸を推定し、それらのうちのいくつかに変異を導入したところ、L191R 変異酵素が野生型酵素よりも高い糖転移活性を示すことがわかった。この結果と(3)で得られた詳細な基質複合体の立体構造情報から、糖転移活性に関与すると考えられるアミノ酸を選抜し、変異酵素の生化学的解析によってそれらアミノ酸の同定を行う。得られた結果を基に、さらに転移活性が高くなった変異酵素の獲得を目指す。

(7) 特異な生理活性を有する配糖体合成酵素の創製

G3 配糖体とすることで有用な化合物に対する配糖体化酵素の fine tuning を行う。手始めに G3 配糖体が強いアミラーゼ阻害活性を示す G3-Gly 合成のための最適化を行う。

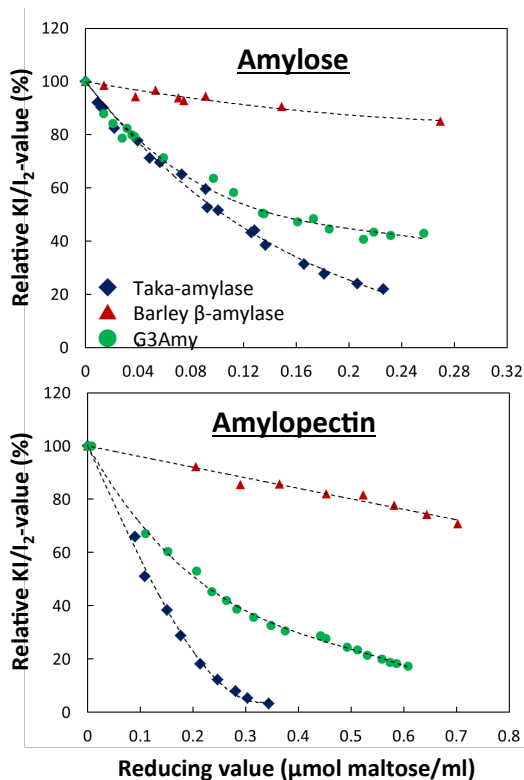


図3 各種アミラーゼの還元糖生成量とヨウ素澱粉反応の関係

4. 研究成果

(1) G3Amy の詳細な酵素化学的性質の解明

α -アミラーゼである G3Amy が通常の α -アミラーゼと同様にエンド型に作用して最終産物として G3 を生成するのか、それともエキソ型の特性を有して末端から G3 単位で切断するのかを明らかにするために、基質を直鎖状のアミロースおよび分岐状のアミロペクチンとしたときの、G3Amy の生成還元糖に対する平均鎖長を反映するヨウ素澱粉反応値の関係を調べた。その結果、図 3 に示すように、基準となるエキソ型の β -アミラーゼとエンド型の Taka-アミラーゼに対して、G3Amy はその中間的な位置にプロットされた。非還元末端の数が少ないアミロースでは、G3Amy は Taka-アミラーゼに近いプロットを示したが、非還元末端の数が多いたミロペクチンでは、G3Amy は β -アミラーゼ側にシフトした。したがって、G3Amy は非還元末端を認識するものの、その数が少ないときはエンド型に作用するものと推察された。表 2 は G3Amy の基質特異性について示したものであるが、非還元末端が存在しない γ -サイクロデキストリンにおいて、G3Amy は良好な反応性を示

表2 G3Amy の基質特異性

	Specific activity	Relative activity
	(U/mg)	(%)
Soluble starch	48.0	100
Amylose EX-I	43.1	89.6
Amylose EX-III	39.4	82.0
Amylopectin	46.5	96.7
Oyster glycogen	38.1	79.4
α -Cyclodextrin	0.09	0.19
β -Cyclodextrin	0.17	0.34
γ -Cyclodextrin	14.4	30.0
Pullulan	ND	0

し G3Amy がエンド型に作用可能な酵素であることが明らかとなった。

G3Amy の kinetic 解析を行った結果 (表 3), G3Amy は G3 にはほとんど作用を示さず、G5 以上の鎖長の基質に対して良好に反応することが示された。

表3 G3Amy の各種基質に対する kinetic parameters

Substrates	K_m (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)
Maltotriose ^a	40.1 \pm 11.1	0.265 \pm 0.007	6.62
Maltotetraose ^a	23.8 \pm 7.1	14.7 \pm 0.8	617
Maltopentaose ^a	37.9 \pm 6.3	58.1 \pm 3.7	1540
Amylose EX-I ^b	33.9 \pm 0.3	53.8 \pm 3.7	1580

(2) G3Amy における CBM 欠失酵素の作製と基質並びに生成物特異性の解析

図 4 に構築した CBM 欠失酵素の構造を示す。これらを精製し、可溶性デンプンに対する

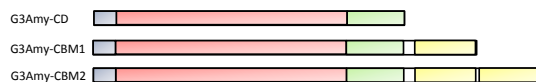


図4 G3Amy CBM 欠失変異酵素の構造

表4 G3Amy CBM 欠失変異酵素の kinetic parameters

	CD	CBM1	CBM2
K_m ($\times 10^{-2}$ mg/ml)	9.41	6.21	1.11
k_{cat} ($\times 10^4$ μ mol/min)	6.45	5.37	3.21
k_{cat}/K_m ($\times 10^6$)	0.685	0.865	2.89

kinetic 解析を行った。その結果、表 4 に示すように CBM の数に依存して基質に対する親和性が増加した。しかし、 k_{cat} は CBM の数に依存して減少し、CBM が反応の邪魔をしているような結果が得られた。しかし、反応効率 k_{cat}/K_m は CBM に依存して高くなった。次にこれらの CBM 欠失酵素の還元糖生成力と生成平均鎖長の関係を調べたところ (図 5), CBM の数に依存してエキソ型活性に近づく傾向が見られた。これは CBM によって酵素が基質に留められる結果、processive に働いている可能性が示された。

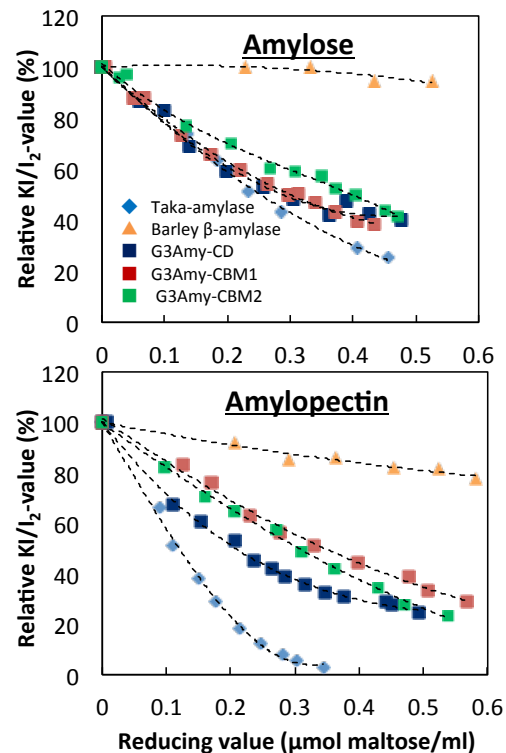


図5 CBM 欠失変異酵素の還元糖生成量と産物重合度の関係

(3) G3Amy 単独及び基質複合体の高解像度 X線結晶解析

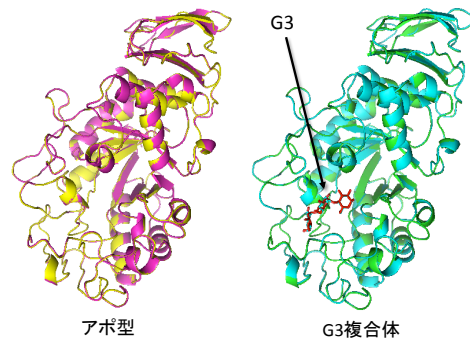


図6 G3Amy apo 型と G3 複合体の立体構造

G3Amy 触媒ドメインをコードする遺伝子を用い、大腸菌を宿主としてペリプラズム画分に分泌発現させた。発現産物を精製後 Sitting Drop 法により得られた結晶を用いて回折強度データを収集し、アポ型で 1.3 Å, G3 複合体で 1.7 Å の解像度で立体構造を決定した (図 6, 7)。

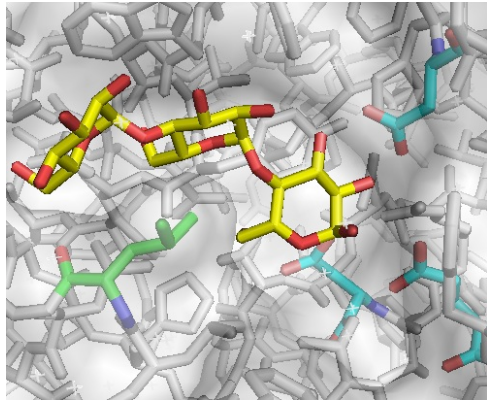


図7 G3 複合体触媒部位の構造

(4) X線小角散乱による G3Amy 全体構造の同定とタンデム CBM20 の機能
2つの CBM20 を有する G3Amy が溶液中にどのような全体構造を取っているのか調べるために X線小角散乱測定を行った。得られたデータ (図 8) から分子半径 (R_g) と分子量 (MM_{exp}) が求められるが、分子量は計算値 (MM_{calc}) と同等の値であり、解析が良好に行われていることが示された。全体構造は図 8 のように GH15 に分類されるグルコアミラーゼと非常に似通っているという非常に興味深い結果が得られた。

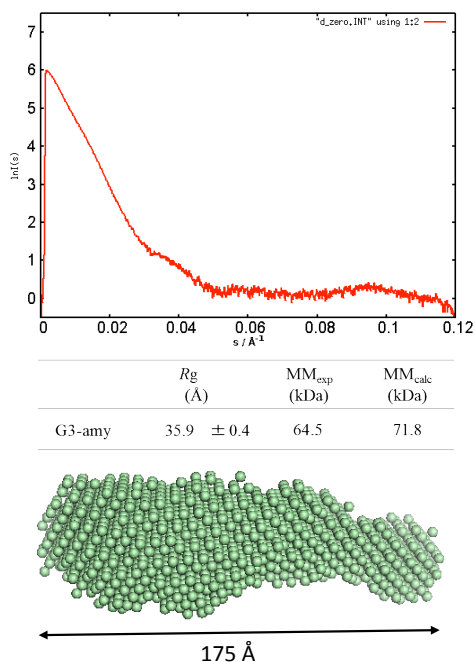


図8 X線小角散乱から算出された分子径

(5) G3Amy の G3 特異性に関与するアミノ酸の同定と特定のオリゴ糖生成酵素の創製

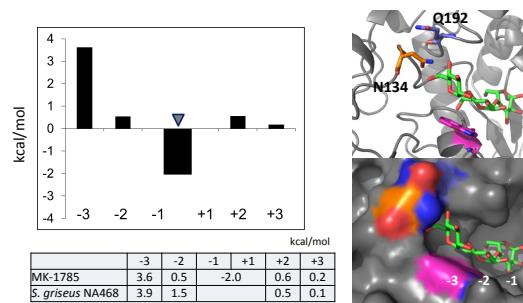


図9 G3Amy のサブサイト親和力

(2) で得られた kinetic 解析の結果を基に、G3Amy のサブサイト親和力を求めた結果、サブサイト-3 の親和力が極めて高いことがわかり、この親和力の高さが G3 生成能に大きく寄与していることが示された (図 9)。そこで、立体構造解析の結果からこの親和力に寄与していると考えられる N134 と Q192 について、アラニン置換体を作製し、変異酵素の分解産物を TLC で解析した (図 10)。その結果、

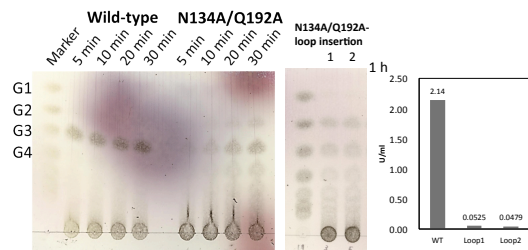


図10 G3Amy の G3 特異性に関与するアミノ酸の同定

野生型では反応初期から G3 以外の反応産物が見られないのに対して、N134A/Q192A 二重変異酵素は反応初期からマルトオリゴ糖の生産が見られる通常の α -アミラーゼの反応性を示し、G3 特異性を消失することが明らかとなった。さらに、G3 生成アミラーゼから G2 生成アミラーゼに変換することを目的として、G2 生成アミラーゼ (PDB: 1QHP) との比較から、サブサイト-3 にループを形成されて塞ぐようなアミノ酸の挿入を試みたが、アミラーゼ活性自体激減し、反応産物も G2 以外の生成物が検出され、G2 生成アミラーゼへの変換には至らなかった。

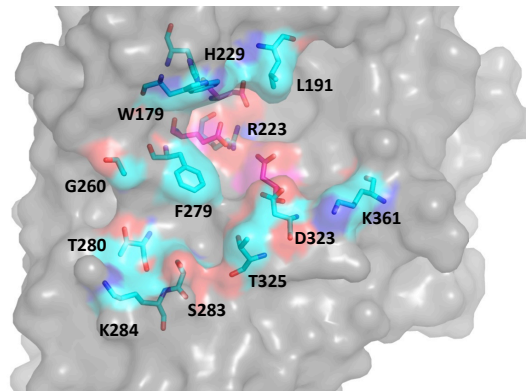


図11 変異導入の標的とした触媒部位近傍のアミノ酸

(6) G3Amy の糖転移に関わるアミノ酸の同定と糖転移活性が増大した変異酵素の取得

G3Amyの+側サブサイトに存在する合計16アミノ酸(図11)に対して合計172種類の変異酵素を作製した。グルコース存在下でデンプンを基質として反応させることで、糖転移産物であるG4と加水分解産物であるG3の生成比を野生型酵素と比較した。その結果、(糖転移活性/加水分解活性)比が上昇した変異酵素がいくつか得られた(図12)。

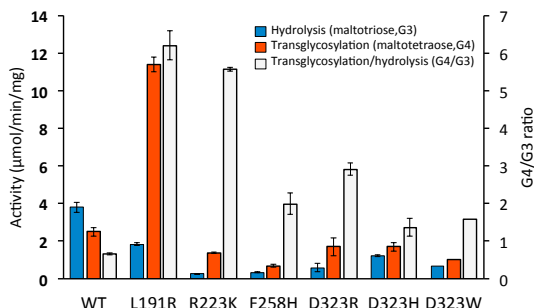


図12 糖転移活性が上昇した変異酵素の一例

(7) 特異な生理活性を有する配糖体合成酵素の創製

作製した変異酵素の一部を用いて、グリセロールに対して配糖化活性を評価した。その結果、まだ全ての変異酵素についてアッセイできていないながら、野生型酵素で約30%の収率でG3グリセロールを合成できることがわかった(図13)。

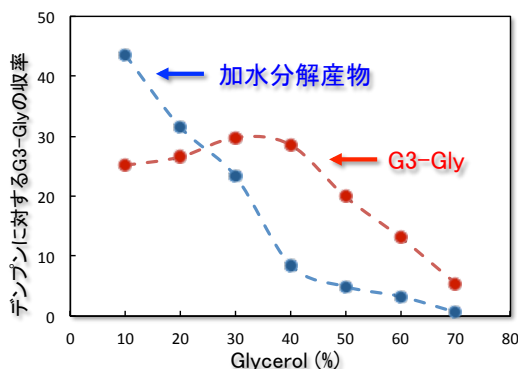


図13 G3-Gly合成におけるグリセロール濃度の影響

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 1件)

Kamon M, Sumitani J, Tani S, Kawaguchi T, Characterization and gene cloning of a maltotriose-forming exo- α -amylase from *Kitasatospora* sp. MK-1785. *Applied Microbiology and Biotechnology* (査読有), **99**(11), 4743-4753, 2015, doi:10.1007/s00253-015-6396-5

[学会発表] (計 7件)

- ① 掃部正浩, 松岡智里, 西村重徳, 谷修治, 炭谷順一, 多田俊治, 川口剛司, マルトトリオース生成アミラーゼを用いたマルトトリオシル配糖体の合成, 日本農芸化

学会関西支部例会第485回講演会, 2014年7月12日, 堺

- ② 掃部正浩, 西村重徳, 谷修治, 炭谷順一, 多田俊治, 川口剛司, 部位特異的変異によるマルトトリオース生成アミラーゼの転移活性の向上, 2014年度日本生物工学会大会, 2014年9月9日, 札幌
- ③ 掃部正浩, 西村重徳, 谷修治, 炭谷順一, 多田俊治, 川口剛司, マルトトリオース生成アミラーゼを用いたアスコルビン酸マルトトリオシドの合成, 第3回応用糖質フレッシュシンポジウム, 2014年9月23日, 新潟
- ④ 掃部正浩, 西村重徳, 谷修治, 炭谷順一, 多田俊治, 川口剛司, マルトトリオース生成アミラーゼを用いたアスコルビン酸マルトトリオシドの合成, 応用糖質科学会平成26年度大会, 2014年9月24日, 新潟
- ⑤ 松岡智里, 掃部正浩, 西村重徳, 谷修治, 炭谷順一, 多田俊治, 川口剛司, マルトトリオース生成アミラーゼを用いたマルトトリオシル配糖体の合成, 日本農芸化学会2015年度大会, 2015年3月29日, 岡山
- ⑥ 残華智子, 西村重徳, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司, *Kitasatospora* sp. MK-1785由来マルトトリオース生成アミラーゼL191R変異酵素のX線結晶解析, 2016年度日本生物工学会大会, 2016年9月28日, 富山
- ⑦ 残華智子, 川口剛司, 炭谷順一, 谷修治, マルトトリオース生成アミラーゼの糖転移活性を用いたp-ニトロフェノール配糖体の合成, 日本農芸化学会2017年度大会, 2017年3月18日, 京都

[その他]

ホームページ等

<http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/am/>

<http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/biol-macromol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

炭谷 順一 (SUMITANI JUN-ICHI)

大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号: 10264813

(2) 研究分担者

西村 重徳 (NISHIMURA SHIGENORI)

大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科・助教

研究者番号: 90244665