

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450114

研究課題名(和文) 酵素による新しい糖質活性化法とこれを用いた配糖体合成システムの開発

研究課題名(英文) Development of glycosides synthesis system using a novel enzymatic activation of carbohydrates with enzymes

研究代表者

奥山 正幸 (Okuyama, Masayuki)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：00344490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は糖質加水分解酵素が触媒する糖転移反応における糖供与体を酵素反応により合成することである。β-フルクトフラノシダーゼやレバンスクララーゼを用い、スクロースのフラクトシル基を、キシロース、ガラクトース、マンノース、イソマルトオリゴ糖、マルトオリゴ糖、グルクロン酸に転移させることに成功した。これらは各種糖質加水分解酵素の糖供与体となり得るものである。また、各種糖質加水分解酵素を分子解析することにより、これらの糖転移反応の特異性ならびに特異性の改変を行った。また得られたフルクトシル糖を基質として、スクロースシンターゼを用い糖ヌクレオチドの合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to make donor substrates for transglycosylation, which glycosidases catalyze. Using β-fructofranosidase and levansucrase, I succeeded in transferring a fructosyl group of sucrose to each saccharide, such as xylose, galactose, mannose, isomaltooligosaccharides, maltooligosaccharides, and glucuronic acid. The reaction product can be a donor substrate of the transglycosylation by glycosidases. Furthermore, I investigated the transglycosylation properties of several glycosidases and modified their specificity through molecular analyses. In addition, nucleotide sugar was successfully synthesized by the reaction of sucrose synthase with fructosyl saccharide as substrate.

研究分野：応用生物化学

キーワード：糖転移反応 フラクトシル化 スクロース

1. 研究開始当初の背景

オリゴ糖は食味を改善する、プレバイオティクス効果を有するなど、様々な機能を有し、我々の生活になくてはならない糖質のひとつである。酵素的なオリゴ糖合成では、糖ヌクレオチドを基質とする糖転移酵素、糖1リン酸を基質とする糖質加リン酸分解酵素、また本来は糖質を加水分解する糖質加水分解酵素が用いられる。糖転移酵素、糖質加リン酸分解酵素は、合成収率が高いことが特徴であるが、基質が高価、酵素が不安定、また特異性が高すぎるものが弱点である。一方、糖質加水分解酵素の基質は安価であり、また酵素自体が安定であることが魅力である。そのため、産業的なオリゴ糖合成では、もっぱら糖質加水分解酵素が用いられる。しかし、元来加水分解酵素であるため、生成したオリゴ糖もその作用により加水分解されてしまうため、生成物の収率を維持することが困難である場合がある。高収率で生成物を得たい場合、反応性の高い基質がしばしば用いられる。おもにフッ化糖が用いられるが、副産物としてフッ化物イオンを生じるため、産業的には不向きである。

2. 研究の目的

(1) 各種糖質のフラクトシル化 – 各種糖質をβ-フルクトフラノシダーゼ、レバンスクララーゼなどの糖質関連酵素を用いてフラクトシル化し、糖転移反応の糖供与体基質を合成することである。フラクトシル化糖は、その結合エネルギーが高いことから反応性が基質として働くと予想される。そのためにβ-フルクトフラノシダーゼおよびレバンスクララーゼの特異性機構を解明する。

(2) グリコシダーゼを用いた糖転移反応 – 得られたフラクトシル化糖を糖供与体として用い、各種グリコシダーゼの糖転移反応を利用して、オリゴ糖や配糖体を酵素合成する系を開発する。効率よく糖転移産物を得るために、各種グリコシダーゼの特異性を精査する。

(3) フラクトシル化糖からの糖ヌクレオチドの合成 – スクロースシンターゼはスクロースを基質として、糖転移酵素の基質となる糖ヌクレオチド (UDP-グルコース) を合成する。フラクトシル化糖 (スクロースアナログ) を基質として糖ヌクレオチドを合成する。

3. 研究の方法

(1) 組換え酵素の調製 細菌由来のタンパク質の組換え酵素の生産では大腸菌を宿主に行った。糸状菌由来の組換え酵素の場合には、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を宿主に用いた。

(2) 糖質の分析 糖質の分析には薄層クロマトグラフィーならびに high performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) によるイオン交換クロマトグラ

フィー、ならびに HPLC (HILIC カラム) を用いた。また糖質の分離にはゲルろ過カラムクロマトグラフィー、HPLC、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いた。

(3) 変異導入 PrimeSTAR max DNA polymerase (タカラバイオ社製) を用いた PCR をベースとした方法により点変異を導入した。飽和変異導入には、Quikchange 法を用いた。

(4) ランダム変異ライブラリーからのスクリーニング フルクトース代謝による pH の変化からクローンをスクリーニングする際には、マスタープレートからコロニーを濾紙に転写し、濾紙にプロモフェノールブルーを滴下することでコロニーの pH 変化を調べた。実際に、糖転移産物を解析する場合には、組換え大腸菌を 96 穴プレートで培養、組換え酵素を誘導した。培養後の菌体を非イオン性界面活性剤、リゾチームで溶菌し、得られた抽出物と基質と混合することで酵素反応を行った。反応の評価を薄層クロマトグラフィーにより行った。

(5) X 線結晶構造解析 結晶化の初期スクリーニングには、ハンプトンリサーチ社製のスクリーニングキットを用いた。得られた条件からの最適化は独自の試薬を用いた。高エネルギー加速器研究機構 (つくば) もしくは Spring 8 において得た。

4. 研究成果

(1) レバンスクララーゼによるフラクトシル化糖の合成。グラム陽性菌由来のレバンスクララーゼ遺伝子を PCR により増幅し、クローニングした。大腸菌での組換え酵素生産系を作製した。スクロースならびに各種糖質をこの組換えレバンスクララーゼと混合し、薄層クロマトグラフィー、HPAEC-PAD を用いたイオン交換クロマトグラフィーによる解析を行った。用いた各種糖質のうち、マンノースが基質とならなかったほかは、用いた糖質全てについて、フラクトシル化に成功した。図1は、

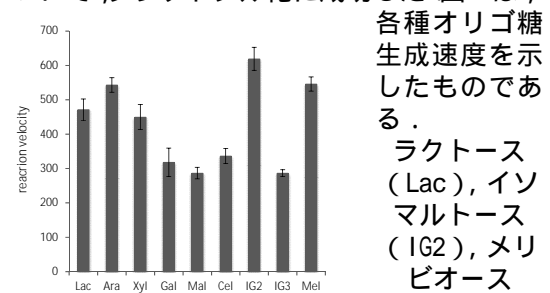


図1 各種オリゴ糖のフラクトシル化 (Mel) など二糖類に対するフラクトシル化速度が大きく、単糖類では、アラビノース (Ara)、キシロース (Xyl) など五炭糖でフラクトシル化速度が大きいことがわかった。

(2) 新規酵素の取得とその反応特異性の解析、フラクトシルマンノースの合成。前述のグラム陽性菌レバンスクララーゼではフラクトシルマンノースを生産できなかった。そ

ここで、新たにグラム陰性菌より3種のレバンスクララーゼ、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ、酵母から1種の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子をクローニングし、組換え酵素を取得した。これらについてスクロースを糖供与体、マンノースを糖供与体として、反応したところ、細菌由来の $\beta$ -フラクトフラノシダーゼで有意にフラクトシルマンノースを合成することが明らかとなった。この特異性を構造に特徴づけることを試みた。アミノ酸配列比較、点変異酵素の作製により、活性部位ポケットのふたつのアミノ酸残基が反応特異性に関わっていることが明らかとなった。これらを三次元構造的に理解するため、タンパク質のX線結晶構造解析を試みた。得られた結晶からは構造解析に十分なデータが得られず、立体構造解析には至らなかった。また、グラム陰性菌 $\beta$ -フラクトフラノシダーゼは酸性糖を糖受容体とできることがわかった。

(3) フラクトシル化糖の精製法の確立。これまで報告のあるフラクトシル糖の精製は、主に逆相高速液体クロマトグラフィーを用いたものである。しかし、本研究室の設備では処理量に限りがあるため、オープンカラムでのフラクトシル化糖の単離精製を試みた。移動相の検討し、クロロホルム/メタノール/酢酸の混合溶媒を用いることで精製が可能であることがわかった。

(4) グリコシダーゼの糖転移反応の解析。得られたフルクトシル化糖を用いて糖転移反応を行うため、以下のグリコシダーゼの糖転移反応を評価した。

*Bacteroides thetaiotaomicron*がコードする $\beta$ -ガラクトシダーゼの糖転移反応特異性を評価した。本酵素がどのような糖を受容体として用いることができるのかを評価した。

表1.  $\beta$ -ガラクトシダーゼの特異性評価

| 受容体                          | 収率 (%) | 結合  |
|------------------------------|--------|---|
| グルコース                        | 75     | $\alpha(1\rightarrow1)\beta$                        |
| キシロース                        | 90     | $\alpha(1\rightarrow4)$                             |
| セロビオース                       | 75     | $\alpha(1\rightarrow1)\beta, \alpha(1\rightarrow6)$ |
| ラクトース                        | 85     | $\alpha(1\rightarrow1)\beta$                        |
| マルトース                        | 75     | $\alpha(1\rightarrow1)\beta$                        |
| p-ニトロフェニル<br>$\alpha$ -グルコシド | 95     | $\alpha(1\rightarrow6)$                             |
| p-ニトロフェニル<br>$\beta$ -グルコシド  | 89     | $\alpha(1\rightarrow6)$                             |
| p-ニトロフェニル<br>$\alpha$ -マンノシド | 92     | $\alpha(1\rightarrow6)$                             |
| p-ニトロフェニル<br>$\beta$ -マンノシド  | 73     | $\alpha(1\rightarrow6)$                             |

表1にはどのような糖質が受容体となり、どの程度の収率でオリゴ糖を合成できるのかを示した。これらの結果から糖質加水分解酵素の基質特異性を評価することも可能となった。p-ニトロフェニル $\beta$ -もしくは $\alpha$ -マンノシドを基質とすることができたことから、当該 $\beta$ -ガラクトシダーゼは、ガラクト

マンナンのガラクトシドや酵母細胞壁マンナンのガラクトシドに作用できるであろうことが示唆された。また本酵素がガラクトースを受容体としないこともわかった。またX線結晶構造解析により、基質結合の様子を観察した。

糸状菌 $\beta$ -グルコシダーゼの糖転移反応特異性に関わる因子を同定した。部位特異的に変異導入することで、受容体分子結合部位に存在する芳香族アミノ酸残基を数種のアミノ酸残基に置換した。これらの基質特異性を評価することで、結合位置の異なるイソマルトオリゴ糖を異なる収率で得ることが可能となった。

糸状菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼBはほとんど糖転移反応を有さないことを明らかにした。これらは受容体結合部位で十分な結合エネルギーを得ることができないためであることが示唆された。この酵素は新たにグルコシド結合を合成できないため、受容体濃度が上昇すると、基質阻害を生じることが明らかとなった。

(5) フルクトシル化糖を基質とするグリコシダーゼのスクリーニング法の開発。フルクトシル化糖を資化することができない大腸菌を、ランダム変異を施したグリコシダーゼ遺伝子で形質転換し、フルクトシル化糖を炭素源に培養した。フルクトシル化糖を分解できる変異を有したグリコシダーゼ遺伝子で形質転換された大腸菌では、フルクトースが遊離し、その代謝産物によってpHが低下する。pHが低下した大腸菌株を酸塩基指示薬であるプロモフェノールブルーの呈色反応でスクリーニングする系を開発した。

(6) スクロースシンターゼによる糖ヌクレオチドの合成。スクロースシンターゼはスクロースとUDPからUDP-グルコースを生産することができる。この特異性を利用し、フルクトシルマンノース、フルクトシルキシロース、フルクトシルガラクトースの各種スクロースアナログから、糖ヌクレオチドを合成することを試みた。野生型スクロースシンターゼはフルクトシルキシロースを基質としないことがわかった。点変異をもつ変異酵素を作製し、これを基質とする酵素の取得を目指したが、有意にフルクトシルキシロースを基質とする変異酵素を得ることができなかった。一方、フルクトシルマンノースからはUDP-マンノースを合成することに成功した。またマンノシル転移酵素はUDP糖ではなくGDP糖を基質とすることが多いため、スクロースシンターゼに変異導入し、GDPを基質とする変異酵素の取得を試みた。しかし野生型酵素と比べて組換え酵素生産量が低く、活性を評価するに至らなかった。また放線菌由来のグルコシル、ガラクトシル転移酵素ロドマリナス属由来のマンノシル転移酵素を取得した。スクロースシンターゼとのカップリング反応は、その反応性を高め、有意に糖ヌクレオチドを合成することが今後の課題であ

ると言える。

## 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17件)

Okuyama M, Matsunaga K, Watanabe KI, Yamashita K, Tagami T, Kikuchi A, Ma M, Klahan P, Mori H, Yao M, Kimura A, Efficient synthesis of  $\alpha$ -galactosyl oligosaccharides using a mutant *Bacteroides thetaiotaomicron* retaining  $\alpha$ -galactosidase (BtGH97b)., *FEBS J.*, 2017, 284 (5), 766-783. 査読有, doi: 10.1111/febs.14018.

Okuyama M, Miyamoto M, Matsuo I, Iwamoto S, Serizawa R, Tanuma M, Ma M, Klahan P, Kumagai Y, Tagami T, Kimura A, Substrate recognition of the catalytic  $\alpha$ -subunit of glucosidase II from *Schizosaccharomyces pombe*. , *Biosci Biotechnol Biochem.*, 2017. 査読有

doi: 10.1080/09168451.2017.1320520

Hsu YH, Tagami T, Matsunaga K, Okuyama M, Suzuki T, Noda N, Suzuki M, Shimura H, Functional characterization of UDP-rhamnose-dependent rhamnosyltransferase involved in anthocyanin modification, a key enzyme determining blue coloration in *Lobelia erinus*. , *Plant J.*, 2017, 89 (2), 325-337. 査読有, doi: 10.1111/tbj.13387.

Masuda Y, Okuyama M, Iizuka T, Nakai H, Saburi W, Fukukawa T, Maneesan J, Tagami T, Naraoka T, Mori H, Kimura A, Purification and characterization of a chloride ion-dependent  $\alpha$ -glucosidase from the midgut gland of Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*). , *Biosci Biotechnol Biochem.*, 2016, 80 (3), 479-485. 査読有, doi: 10.1080/09168451.2015.1116926

Liao J, Okuyama M, Ishihara K, Yamori Y, Iki S, Tagami T, Mori H, Chiba S, Kimura A, Kinetic properties and substrate inhibition of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. , *Biosci Biotechnol Biochem.*, 2016, 80 (9), 1747-1752. 査読有, doi: 10.1080/09168451.2015.1136884

Okuyama M, Saburi W, Mori H, Kimura A,  $\alpha$ -Glucosidases and  $\alpha$ -1,4-glucan lyases: structures, functions, and physiological actions (Review)., *Cell Mol Life Sci.*, 2016, 73 (14), 2727-2751. 査読有, doi: 10.1007/s00018-016-2247-5

Suthangkornkula R, Sriworanuna P, Nakai H, Okuyama M, Svasti J, Kimura A, Senapind S, Arthan D, A *Solanum torvum* GH3  $\beta$ -glucosidase expressed in *Pichia pastoris* catalyzes the hydrolysis of furostanol glycoside., *Phytochemistry*, 2016, 127, 4-11. 査読有, doi:10.1016/j.phytochem.2016.03.015

Tagami T, Miyano E, Sadahiro J, Okuyama M, Iwasaki T, Kimura A, Two novel glycoside hydrolases responsible for the catabolism of cyclobis-(1-6)- $\beta$ -nigerosyl., *J. Biol. Chem.*, 2016, 291, 16438-16447. 査読有, doi:10.1074/jbc.M116.727305

Kumagai Y, Uraji M, Wan K, Okuyama M, Kimura A, Hatanaka T, Molecular insights into the mechanism of thermal stability of actinomycete mannanase., *FEBS Lett.*, 2016, 590 (17), 2862-2869. 査読有, doi:10.1002/1873-3468.12322

Kumagai Y, Yamashita K, Tagami T, Uraji M, Wan K, Okuyama M, Yao M, Kimura A, Hatanaka T, The loop structure of Actinomycete glycoside hydrolase family 5 mannanases governs substrate recognition., *FEBS J.*, 2015, 282 (20), 4001-4014. 査読有, doi: 10.1111/febs.13401

Saburi W, Rachi-Otsuka H, Hondoh H, Okuyama M, Mori H, Kimura A, Structural elements responsible for the glucosidic linkage-selectivity of a glycoside hydrolase family 13 exo-glucosidase., *FEBS Lett.*, 2015, 589 (7), 865-869. 査読有, doi: 10.1016/j.febslet.2015.02.023

## 奥山 正幸

糖質関連酵素の最近の進歩(4) 糖質加水分解酵素ファミリー内の機能の保存性と多様性, *化学と生物*, 2015, 53 (2), 120-126. 査読有, <http://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.53.120>

Kobayashi M, Saburi W, Nakatsuka D, Hondoh H, Kato K, Okuyama M, Mori H, Kimura A, Yao M, Structural insights into the catalytic reaction that is involved in the reorientation of Trp238 at the substrate-binding site in GH13 dextran glucosidase, *FEBS Lett.*, 2015, 589 (4), 484-489. 査読有, doi: 10.1016/j.febslet.2015.01.005

Tagami T, Yamashita K, Okuyama M, Mori H, Yao M, Kimura A, Structural advantage of sugar beet  $\alpha$ -glucosidase to stabilize the Michaelis complex with long-chain substrate, *J. Biol. Chem.*, 2015, 290 (3), 1796-1803. 査読有, doi: 10.1074/jbc.M114.606939

Sadahiro J, Mori H, Saburi W, Okuyama M, Kimura A, Extracellular and cell-associated forms of *Gluconobacter oxydans* dextran dextrinase change their localization depending on the cell growth, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015, 456 (1), 500-505. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.115

Saburi W, Okuyama M, Kumagai Y, Kimura A, Mori H, Biochemical properties and substrate recognition mechanism of GH31  $\alpha$ -glucosidase from *Bacillus* sp. AHU 2001 with broad substrate specificity, *Biochimie*, 2015, 108, 140-148. 査読有 doi: 10.1016/j.biochi.2014.11.010.

Okuyama M, Yoshida T, Hondoh H, Mori H, Yao M, Kimura A, Catalytic role of the calcium ion in GH97 inverting glycoside hydrolase, *FEBS Lett.*, 2014, 588 (17), 3213-3217. 査読有 doi: 10.1016/j.febslet.2014.07.002

〔学会発表〕(計 2 2 件)

$\alpha$ -Glucosidase newly found in *Aspergillus niger* displays high specificity to  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucosidic linkage. Ma M, Okuyama M, Tagami T, Kimura A, 12th Carbohydrate Bioengineering Meeting (4 月 23-26 日, 2017, ウィーン, オーストリア)

Enzymatic characterization of trehalose-6-phosphate hydrolase from *Streptococcus* mutants NBRC13955. Klahan P, Okuyama M, Tagami T, Kimura A, 12th Carbohydrate Bioengineering Meeting (4 月 23-26 日, 2017 年, ウィーン, オーストリア)

シングルアンカー型イソマルトメガロ糖におけるケルセチン-3-O- $\beta$ -グルコシド可溶性に寄与する糖質構造の決定 土生 慎二、ラング ビーラヌッチ、熊谷 裕也、貞廣 樹里、植草 聡太、田上 貴祥、奥山 正幸、原 博、木村 淳夫 日本農芸化学会 2017 年度大会 (3 月 17-20 日, 2017 年, 京都女子大学・京都市・京都府)

Characterization of thermostable  $\alpha$ -glucosidase from *Geobacillus caldoxylosilyticus* NBRC 107762, which displays remarkable transglucosylation Ma M, Okuyama M, Tagami T, Kimura A, 日本農芸化学会 2017 年度大会 (3 月 17-20 日, 2017 年, 京都女子大学・京都市・京都府)

*Zymomonas mobilis* 由来 levansucrase と invertase の生成物特異性に関する構造因子の推定 芹沢 領, 奥山正幸, 木村淳夫, 日本農芸化学会 2016 年度北海道支部例会 (11 月 23 日, 2016 年, 北海道大学・札幌市・北海

道)

GH97  $\alpha$ -galactosidase 求核触媒変異酵素が触媒する糖転移反応の反応機構 松永夏奈, 奥山正幸, 渡辺健一, 田上貴祥, 山下恵太郎, 姚 閔, 森 春英, 木村 淳夫, 日本応用糖質科学会平成 28 年度大会 (9 月 14 日-16 日, 2016 年, 福山大学・福山市・広島県)

*Bacteroides thetaiotaomicron*  $\beta$ -L-arabinopyranosidase の立体構造解析 菊池麻子, 加藤公児, 奥山正幸, 大寄翔平, 姚 閔, 木村 淳夫, 日本応用糖質科学会平成 28 年度大会 (9 月 14 日-16 日, 2016 年, 福山大学・福山市・広島県)

Purification and characterization of  $\alpha$ -1,3-glucosidase from *Aspergillus niger* Ma M, Tagami T, Okuyama M, Kimura A, International Carbohydrate Symposium – ICS 2016 (7 月 17-21 日, 2016, New Orleans, USA)

Analysis of amino acid residues relating to specificity of endodextranase from *Streptococcus mutans* Klahan P, Okuyama M, Mori H, Kimura A, International Carbohydrate Symposium – ICS 2016 (7 月 17-21 日, 2016, New Orleans, USA)

*Zymomonas mobilis* 由来 levansucrase と invertase の反応特異性の解析 芹沢 領, 田沼 正成, 奥山 正幸, 木村 淳夫, 日本農芸化学会 2016 年度大会 (3 月 27-30 日, 2016 年, 札幌コンベンションセンター・札幌市・北海道)

*Kribbella flavida* 由来 isomaltosyltransferase の機能解析 宮野 江梨, 田上 貴祥, 奥山 正幸, 木村 淳夫, 日本農芸化学会 2016 年度大会 (3 月 27-30 日, 2016 年, 札幌コンベンションセンター・札幌市・北海道)

Efficient production and characterization of  $\alpha$ -1,3-glucosidase from *Aspergillus niger* Ma M, Tagami T, Okuyama M, Kimura A, 日本農芸化学会 2016 年度大会 (3 月 27-30 日, 2016 年, 札幌コンベンションセンター・札幌市・北海道)

*Gluconobacter oxydans* 由来の菌体外酵素 dextran dextrinase は自らの生成物デキストランによって細胞表層から遊離する。 貞廣 樹里, 森 春英, 佐分利 亘, 奥山 正幸, 木村 淳夫 日本農芸化学会 2016 年度大会 (3 月 27-30 日, 2016 年, 札幌コンベンションセンター・札幌市・北海道)

Isomaltooligosaccharide 6- $\alpha$ -glucosyl transferase の構造と触媒部位の機能性アミノ酸残基の同定

川田恭平, 藤本 瑞, 鐘ヶ江倫世, 西村崇志, 奥山正幸, 森 春英, 木村淳夫  
日本応用糖質科学会平成 27 年度大会(9 月 16 日-18 日, 2015 年, 奈良春日野国際フォーラム・奈良市・奈良県)

Podospora anserina  $\alpha$ -glucosidase の高い糖転移能に関わる構造因子

福本健太, Song Kyung-Mo, 奥山正幸, 木村淳夫  
日本応用糖質科学会平成 27 年度大会(9 月 16 日-18 日, 2015 年, 奈良春日野国際フォーラム・奈良市・奈良県)

A transglycosylation of catalytic nucleophile mutant of GH97  $\alpha$ -galactosidase with an external nucleophile

Okuyama M, Matsunaga K, Watanabe KI, Tagami T, Yamashita K, Mori H, Yao M, Kimura  
11th Carbohydrate Bioengineering Meeting (5 月 10-14 日, 2015 年, エスポー, フィンランド)

A Structural and biochemical studies of sugar beet  $\alpha$ -glucosidase exhibiting high specificity for long-chain substrates

Tagami T, Yamashita K, Okuyama M, Mori H, Yao M, Kimura A  
11th Carbohydrate Bioengineering Meeting (5 月 10-14 日, 2015 年, エスポー, フィンランド)

Bacillus subtilis 由来 levansucrase による sucrose 類似体の合成および受容体特異性に関する研究

渡辺基志, 奥山正幸, 木村淳夫  
日本農芸化学会 2015 年度大会(3 月 26-29 日, 2015 年, 岡山大学津島キャンパス・岡山市・岡山県)

Bacteroides thetaiotaomicron 由来 GH97  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼの機能解析

大寄 翔平, 松永 夏奈, 奥山 正幸, 木村 淳夫  
日本農芸化学会 2015 年度大会(3 月 26-29 日, 2015 年, 岡山大学津島キャンパス・岡山市・岡山県)

糖質加水分解酵素ファミリー97 における触媒機構と多様性

奥山正幸  
日本農芸化学会 2015 年度大会シンポジウム(3 月 26-29 日, 2015 年, 岡山大学津島キャンパス・岡山市・岡山県)

④ 放線菌マンナーゼの分岐オリゴ糖に対する基質特異性に関する解析

熊谷祐也, 裏地美杉, 奥山正幸, 木村淳夫, 畑中唯史

第 66 回日本生物工学会大会(9 月 9-11 日, 2014 年, 札幌コンベンションセンター・札幌市・北海道)

②Dextran dextrinase の Phe602 の生成物特異性に関する研究

坂谷 敦, 熊谷祐也, 貞廣樹里, Lang Weeranuch, 奥山正幸, 森 春英, 木村淳夫  
日本応用糖質科学会平成 26 年度大会(9 月 24 日-26 日, 2014 年, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター・新潟市・新潟県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥山 正幸 (OKUYAMA, Masayuki)  
北海道大学・農学研究院・講師  
研究者番号: 00344490

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )