

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850129

研究課題名(和文)自然免疫を賦活化するラミナリンの基本骨格の解明とその酵素的評価法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of biologically active laminarin-structure and development of its enzymatic evaluation method

研究代表者

熊谷 祐也(Kumagai, Yuya)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00589997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：-(1,3)-グルカンは免疫賦活化能や抗腫瘍性作用など様々な生理活性を持つ糖質である。それらの構造は生物種により異なる。そのため糖質構造と生理活性の発現メカニズムの関連性は不明な点が残る。本研究では活性が限定的な酵素によるラミナリオリゴ糖の基本骨格の作製を試みた。それにより生理活性を持つオリゴ糖の作製および酵素の限定的な加水分解活性から機能性ラミナリン構造の評価が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Laminarin has biologically active saccharides such as the immunostimulation and antitumor activity. The laminarin structure differs from species, indicating that the relationship of the structures and the expression mechanism of bioactivities is still unclear. In this study, we employed glucanase with a limited hydrolysis activity toward laminarin and attempted for oligosaccharide production. The enzyme produced biologically active oligosaccharides and revealed the hydrolysis pattern of biologically active laminarin.

研究分野：農学

キーワード：ラミナリナーゼ オリゴ糖 ラミナリン

## 1. 研究開始当初の背景

ラミナリンは自然免疫を賦活化する糖質であるがラミナリンのどの単位構造が活性の発現に寄与するか分かっていない。これらはグルコースが -1,3-結合から成る主鎖に -1,6-結合したグルコース側鎖を有する糖質でコンブやアラメなどの褐藻類の貯蔵多糖として存在する。ラミナリンの構造は生物種により大きく異なるためどのラミナリン構造が生理機能を有するかという点が不明である。褐藻類は限られた品種のみ利用されており、それ以外のはほとんど利用されていない。未利用褐藻類に含まれるラミナリンを利用するにはそれらの関係を明らかにする必要がある。-1,3-グルカンの自然免疫に関わる研究は糖質受容体タンパク質 Dectin-1 が発見されたのが始まりである。その後どの反応経路によって自然免疫が発現するかについて解明されてきたが、受容体タンパク質がラミナリンのどの単位構造を認識して活性の発現につながるかという点においてははっきりしない。-1,3-グルカンの重合度に関して様々な報告があるが、その中でも5糖以上のオリゴ糖が生理活性を有すると報告されている。自然免疫を賦活化するラミナリンの基本骨格を決定して糖質の構造と受容体の関連性を明らかにすることがラミナリンによる自然免疫を発現するメカニズムの解明につながると考えられた。

## 2. 研究の目的

ラミナリンの持つ自然免疫能の解明には特定の単位構造を作製してその機能性を解明するのが効果的である。これまでは酸および酵素カクテルを用いた非特異的な加水分解による方法が多く、特定の構造をもつものの作製が難しい点、また大量にオリゴ糖を調製することが困難であったため、それらの機能解析が十分に行われていない。本研究では糖質の構造と機能発現の関連性の解明に必要なオリゴ糖の酵素的な調製方法の開発および酵素的に構造を評価する方法の開発を目的とした。Glucoside hydrolase family 16 (GH16)は -1,3-グルカンを加水分解する酵素ファミリーの中で種類が最も多いが、その主な生成物は5糖よりも小さい。GH64の酵素は -1,3-グルカンに対して限定的な活性を持つ。そのため本ファミリーの酵素を用いたオリゴ糖調製法の開発を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 組換え酵素の生産

*Kribbella flavida*由来 -1,3-グルカナーゼ (KfGH64)は大腸菌発現ベクター-pET28a に連結し、大腸菌 BL21(DE3)に導入した。得られた形質転換体を LB 培地植菌し、0.1 mM イソプロピル -チオガラクトピラノシド存在下、25℃にて14時間組換えタンパク質の誘導培養を行った。得られた形質転換体より組換え酵素は TALON affinity カラムクロマ

トグラフィーにより単一に精製し、以下の解析に用いた。

### (2) -1,3-グルカンの酵素反応前処理の条件検討

-1,3-グルカン(カードラン)は次の5つの条件で前処理を行った。未処理、アルカリ処理 中和 ホモジナイズ処理:1 M 水酸化ナトリウムで6時間処理後、0.1 M 塩酸で中和し、ホモジナイズにより均一化した。アルカリ処理 中和:1%水酸化ナトリウムで処理し、酢酸で pH を 5.5 に調整した。アルカリ処理 中和 加熱処理:0.1 M リン酸ナトリウム (pH 10.5) に溶解後、0.1 M 塩酸で中和し、70℃で2時間加熱処理した。加熱処理:70℃で2時間加熱処理した。

### (3) 加熱処理条件の最適化

加熱処理条件は前項(2)の加熱処理を元にして加熱温度(50-100℃)、加熱時間(0.5-4時間)、および加熱時の基質濃度(1-5%)について検討した。上記を最適化した前処理条件を用いて、酵素反応における基質濃度は0.5-1%および酵素濃度は2.5-20 μg/ml で検討した。

### (4) 生成物の分析

酵素反応生成物のサイズは陰イオンクロマトグラフィー(HPAEC-PAD)およびゲル濾過クロマトグラフィーにより評価した。平均重合度はフェノール硫酸法による全糖量および BCA 法により還元糖量を求めることで決定した。生成物のグルコシド結合はサンプルを D<sub>2</sub>O に溶解し、<sup>1</sup>H-NMR によりラミナリオリゴ糖標品のピークと比較することにより評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 組換え KfGH64 の一般的な諸性質

1 L の LB 培地から 40 mg の精製 KfGH64 が得られた。KfGH64 の最適温度および pH は 45℃ および 5.5 であった。KfGH64 は pH 4-7 (4、24時間)の間で安定であり、各温度における30分の加熱処理における酵素活性が半減する温度は 45℃ であった。長時間(100時間)のインキュベーションに対する酵素の熱安定性を評価したところ、KfGH64 は 37℃ で安定であり 40℃ で 80%の活性が保たれた。ラミナリン(*Laminaria digitata*)に対する初速の活性を 100%とすると、KfGH64 は加熱処理カードランに対して 89%、未処理カードランに対して 1%、および -グルカン(*Euglena gracilis*)に対して 0.4%であり、glucan from black yeast およびラミナラン(*Eisenia bicyclis*)に対して全く活性を示さなかった。KfGH64 のラミナリンに対する  $V_{max}$  および  $K_m$  はそれぞれ 442 (μmol/mg/min)および 21.1 (mg/ml)であった。

### (2) カードランの分解

研究の方法(2)で示した5つの前処理カードランを37、pH 5.5、100 rpmの条件下で酵素加水分解を試みた。KfGH64によるカードランの加水分解効率は経時的にサンプリングを行い、遠心分離により未分解カードランを除去し、可溶性画分に得られた糖量をフェノール硫酸法により測定して求めた。非加熱処理カードランの加水分解率[前処理条件 - ]は3%以下であったのに対し、アルカリ処理 - 中和 - 加熱処理カードランおよび5)加熱処理カードランに対する加水分解率はそれぞれ33%および43%であった。このことからKfGH64は加熱処理したカードランに対して有効であることが分かった。中でも加熱処理が有効なことから前処理条件の最適化を行った。その結果、最適化した条件で前処理を行い(90、30分)1gのカードランを10 μgのKfGH64で処理することで加水分解率は60%に達した。更なる加水分解率の向上を目指し、生成物と未分解のカードランを遠心分離により分離し、未分解物を洗浄後、最適化した条件で再度前処理を行い、酵素反応を行った。カードランを完全に分解することはできなかったが加水分解率は70%に達した。

### (3) 生成物の評価

酵素反応により得られた生成物はHPAEC-PADにより単糖などの低分子およびゲル濾過クロマトグラフィーにより大きい生成物を評価した。ゲル濾過クロマトグラフィー分析から主な生成物は5糖であり、少量の平均重合度(DP)13および130の糖質が見られた。HPAEC-PAD分析から5糖より小さい糖質は確認できなかった。化学的手法により求めた平均重合度は7.9であり、これは主生成物の5糖に加えてDP13および130のものが混在しているためと考えられた。1H-NMR分析から生成物のスペクトルは標品の5糖のものと類似していた。これらのことから-1,3-グルカンから成るDP5以上のオリゴ糖を効率的に調製する方法を確立できた。

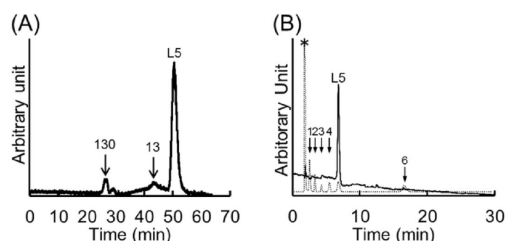


図1. 生成物の評価。(A)ゲル濾過クロマトグラフィーによる分析。(B)HPAEC-PADによる分析。

### (4) 本研究におけるインパクトおよびその展望

これまで多くの研究者が-1,3-グルカンオリゴ糖の作製を酸加水分解またはアルカリ処理によりランダムコイル構造を増やしたカードランに対して酵素による加水分解を試みてきたが、それらの生成物の多くは単

糖や2糖といった比較的短いものであった。本研究により生理活性を持つとされる5糖以上のオリゴ糖を簡単かつ高収率に作製可能となった。

KfGH64が低い加水分解率を示した前処理では真菌の酵素カクテルはカードランを完全に分解したが、生成物は4糖以下であった。このことは酵素の加水分解活性はカードランの構造に影響することを示している。カードランゲル構造は加熱処理およびアルカリ処理により異なる。アルカリ処理のものはlow-setゲルの構造と似ている。室温におけるカードランの構造はヘリックス構造および3重ヘリックス構造が混在している。80以上の加熱によりカードランは3重ヘリックス構造から成る熱不可逆のhigh-setゲルを形成する。High-setゲルカードランは3重ヘリックスの一部が他のヘリックスとつながることによりゲル状になる。KfGH64の加水分解率は加熱処理により上昇したことからKfGH64は3重ヘリックス構造を認識すると考えられた。KfGH64の加水分解率は60%で飽和に達し、酵素処理を再度行ってもカードランを完全に分解することはできなかった。また前処理なしに再度の酵素処理を行うと全く分解しなかった。このことから酵素反応後の前処理はKfGH64が加水分解しにくい3重ヘリックス構造を作っていることまたは加水分解に適さない短い-グルカンが生じたと考えられた。加熱処理によるカードランの構造変化はDPに依存している。DPの長いカードランはfibrils状の構造を取るが、DPが50のものはlamellar状になる。そしてDP25以下のものは特定の構造をとらないランダムコイルとなる。-グルカンはDPに依存した立体構造を有することからKfGH64の生成物を分析することで糖構造の評価が可能となる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者に下線)

[雑誌論文](計4件)

Yuya Kumagai, Masayuki Okuyama, Atsuo Kimura: Heat treatment of curdolan enhances the enzymatic production of biologically active - (1,3)-glucan oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers* 印刷中。(査読有)

doi:10.1016/j.carbpol.2016.03.066

Yuya Kumagai, Keitaro Yamashita, Takayoshi Tagami, Misugi Uraji, Kun Wan, Masayuki Okuyama, Yao Min, Atsuo Kimura: The loop structure of Actinomycete glycoside hydrolase family 5 mannanases governs substrate recognition. *FEBS Journal* 282: 4001-4014, 2015. (査読有)

doi:10.1111/febs.13401.

Wataru Saburi, Masayuki Okuyama, Yuya Kumagai, Atsuo Kimura, Haruhide Mori: Biochemical properties and substrate

recognition mechanism of GH31  
-glucosidase from *Bacillus* sp. AHU 2001  
with broad substrate specificity.  
**Biochimie** 108: 140-148, 2015. (査読有)  
doi:10.1016/j.biochi.2014.11.010  
Weeranuch Lang, Yuya Kumagai, Juri  
Sadahiro, Janjira Maneesan, Masayuki  
Okuyama, Haruhide Mori, Nobuo Sakairi,  
Atsuo Kimura: Different molecular  
complexity of linear-isomalto  
megalosaccharides and -cyclodextrin  
on enhancing solubility of azo dye ethyl  
red: Towards dye biodegradation.  
**Bioresource Technology** 169: 518-524,  
2015. (査読有)  
doi:10.1016/j.biortech.2014.07.025

[学会発表](計7件)

Sota Uekusa, Weeranuch Lang, Yuya  
Kumagai, Masayuki Okuyama, Atsuo  
Kimura: Solubilizing ability of double-  
anchor type isomaltomegalosaccharide  
for drug delivery of ibuprofen. 日本農  
芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 27 日  
~2016 年 3 月 30 日, 札幌コンベンション  
センター(北海道・札幌市).

Yuya Kumagai, Weeranuch Lang, Juri  
Sadahiro, Masayuki Okuyama, Haruhide  
Mori, Atsuo Kimura: Enzymatic synthesis  
of functional linear isomalto  
megalosaccharide by *Gluconobacter*  
*oxydans* dextran dextrinase. 11<sup>th</sup>  
Carbohydrate Bioengineering Meeting  
(CBM11). 2015 年 5 月 10 日~2015 年 5 月  
13 日, (Espoo, Finland).

熊谷祐也, 奥山正幸, 木村淳夫: 生理活性  
を持つ -1,3-グルカンオリゴ糖の酵素的  
調製法の検討. 日本農芸化学会 2015 年度大  
会, 2015 年 3 月 26 日~2015 年 3 月 29 日,  
岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市).

佐分利 亘, 奥山正幸, 熊谷祐也, 木村淳  
夫, 森 春英: *Bacillus* sp. AHU 2001 由  
来 GH31 -グルコシダーゼの生化学的諸性  
質と基質認識に重要な構造因子の解析. 日  
本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月  
26 日~2015 年 3 月 29 日, 岡山大学津島キ  
ャンパス(岡山県・岡山市).

熊谷祐也, 裏地美杉, 奥山正幸, 木村淳  
夫, 畑中唯史: 放線菌マンナナーゼの基質  
特異性に関するループ 7 の解析. 日本応用  
糖質科学会平成 26 年度大会, 2014 年 9 月  
25~2014 年 9 月 26 日, 朱鷺メッセ新潟コ  
ンベンションセンター(新潟県・新潟市).

坂谷 敦, 熊谷祐也, 貞寛樹里, Lang  
Weeranuch, 奥山正幸, 森 春英, 木村淳夫:  
Dextran dextrinase の Phe602 の生成物特  
異性に関する影響. 日本応用糖質科学会平  
成 26 年度大会, 2014 年 9 月 25~2014 年 9  
月 26 日, 朱鷺メッセ新潟コンベンシ  
ョンセンター(新潟県・新潟市).

熊谷祐也, 裏地美杉, 奥山正幸, 木村淳  
夫, 畑中唯史: 放線菌マンナナーゼの分枝  
オリゴ糖に対する基質特異性に関する解析.  
第 66 回日本生物工学会, 2014 年 9 月 9 日  
~2014 年 9 月 11 日, 札幌コンベンシ  
ョンセンター(北海道・札幌市).

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/rfoa/abs/ab2-3.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 祐也 (KUMAGAI, Yuya)

北海道大学・大学院農学研究院・研究員

研究者番号: 00589997

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし