

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07393

研究課題名(和文) 基質特異性の精査による 結合二糖類加水分解酵素活性中心のSubsite 研究

研究課題名(英文) Subsite studies on active sites of beta-diglycoside-hydrolyzing enzymes based on detail substrate specificity analysis

研究代表者

神崎 浩 (KANZAKI, HIROSHI)

岡山大学・環境生命科学研究所・教授

研究者番号：60183787

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)： $\beta$ -GlucosidaseとGlcNAcaseの基質認識機構に新たな知見を求めた。 $\beta$ -Glucosidaseに関しては、Penicillium multicolorから三種のpNPG分解酵素(50kDa, 102kDa, 117kDa)を精製し、102kDa酵素は新奇の基質特異性を有することを明らかにした。GlcNAcaseに関しては、阻害剤TMG-chitotriomycinの類縁体pNP-TMGを資化する微生物を単離し、pNP-TMGとpNP-GlcNAcを分解する活性を示す菌株を得た。pNP-TMGは既存のGlcNAcaseを阻害したため、これらの分解酵素の基質認識機構が注目される。

研究成果の概要(英文)：In the case of  $\beta$ -Glucosidase studies, we purified three different pNPG-hydrolyzing enzymes (50kDa, 102kDa, 117kDa) from the enzyme preparation of Penicillium multicolor and found that the 102kDa enzyme exhibited the unique substrate specificity. In the case of GlcNAcase studies, microorganisms assimilating pNP-TMG, an analog of TMG-chitotriomycin, were isolated, and some of them exhibited pNP-TMG- and pNP-GlcNAc-hydrolyzing activities. As pNP-TMG was found to inhibit the known GlcNAcase, elucidation of the substrate recognition mechanism of the enzymes of pNP-TMG-assimilating microorganisms is supposed to be interesting.

研究分野：生物有機化学、応用微生物学、

キーワード：糖質加水分解酵素 beta-glucosidase GlcNAcase 基質特異性 基質認識機構 TMG-chitotriomycin  
糖転移反応 アスコルビン酸配糖体

## 1. 研究開始当初の背景

我々が微生物代謝産物中に見出した新規の  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase (GlcNAcase) 阻害剤, TMG-chitotriomycin は昆虫・糸状菌由来の GlcNAcase を阻害するが, 植物・動物由来の酵素を阻害しない, すなわち同じ GH family の酵素中に, TMG-chitotriomycin による阻害を受ける酵素と受けない酵素が存在するという非常に興味深い知見が得られた<sup>1)</sup>。GlcNAcase 活性測定には一般的に人工基質 *p*-nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide (*p*NP-GlcNAc) が用いられているが, 生体内における本来の基質はキチンオリゴマーと GlcNAc を含む糖鎖といわれている。我々は本来の基質の違いが TMG-chitotriomycin の選択性を反映していると予測し, 異なる生物種由来の GlcNAcase の基質に対する反応性と TMG-chitotriomycin による阻害の有無を精査したところ, TMG-chitotriomycin 感受性 GH family 20 GlcNAcase はキチンオリゴマーを, 非感受性酵素は糖鎖を基質として認識する事が判明し, この事実は活性中心 Subsite の構造の違いを反映しているという興味深い事実を明らかにしてきた<sup>2)</sup>。

もう一つの  $\beta$ GH,  $\beta$ -Glucosidase の活性測定にも *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NPG) (人工基質) が用いられているが, 天然の基質は cellulose から生成する cellobiose と植物に含まれる glucose 配糖体等とされている。我々はアスコルビン酸の配糖体を  $\beta$ -Glucosidase の糖転移活性で酵素合成する研究を続けてきているが, その過程で, 同じ GH family 3 に属する  $\beta$ -Glucosidase の中に, セロオリゴ糖への分解活性が強い酵素と, 芳香族アグリコン配糖体の加水分解を優先的に行なう酵素が存在する事を見だしてきた (未発表)。加えてこの基質特異性が, 糖転移反応の糖供与体の特異性と合致することも見だしてきた。この結果は  $\beta$ -Glucosidase も GlcNAcase と同様にグリコシド結合切断メカニズムは類似していても (同じ GH family に属していても), 基質認識に違いを有している (Subsite 構造が異なる) 酵素が存在し, その性質で細分化されることを示している。

## 2. 研究の目的

上記背景から, とともに  $\beta$ 型二糖類を加水分解する酵素である GlcNAcase と  $\beta$ -Glucosidase には, 同じ GH family に属して加水分解反応機構が類似していても, それら酵素の本来の役割の差から, その基質認識機構が大きく異なる酵素が存在している事がわかる。加えて, これら二糖類の起源である多糖, キチン・cellulose は天然に非常に豊富に存在するバイオマスであることを考慮すると, これらの事実をより詳細に突き詰める事は, 酵素の

基礎研究ばかりでなく, 物質生産等の応用研究にとっても不可欠と考えられる。

そこで, 本研究においては  $\beta$ 結合を有する二糖類加水分解酵素について, これまでの研究で詳細に研究されていない基質認識機構を有すると推察できる酵素を選抜し, それらを酵素化学的に精査することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) $\beta$ -Glucosidase の活性測定

加水分解活性測定では, 芳香族配糖体 (*p*NPG を含む) またはグルコオリゴ糖を基質として 37 °C で 15 分間反応を行い, 遊離した *p*NP または glucose を定量することで分解活性を評価した。糖転移活性測定は, *p*NPG 分解活性を揃え, アスコルビン酸 (AA) を糖受容体, 芳香族配糖体またはグルコオリゴ糖を糖供与体として 37°C で 1 時間反応を行い, 生成した AA 配糖体を定量することで糖転移活性を評価した。

### (2) GlcNAcase および *p*-nitrophenyl N-trimethyl- $\beta$ -D-glucosaminium iodide (*p*NP-TMG) 分解活性測定

*p*NP-GlcNAc, *p*NP-TMG を基質とし  $\beta$ -Glucosidase の *p*NPG を基質とした場合と同様の手法で反応を行い, *p*NP を定量することで活性を評価した。

### (3) *p*NP-TMG, *p*NP-GlcNAc 資化性菌の取得

受託合成によって調製した *p*NP-TMG もしくは市販の *p*NP-GlcNAc を炭素源あるいは窒素源として用いて, 集積培養法・涵養培養法により, 各種土壌や河川水等から *p*NP-TMG 資化性菌及び *p*NP-GlcNAc 資化性菌を取得した。

### (4) 各種酵素の精製

*Penicillium multicolor* 由来酵素製剤からの各種  $\beta$ -Glucosidase の精製

天野エンザイム社製の *P. multicolor* 由来酵素製剤から, 硫酸分画, イオン交換クロマトグラフィー, 疎水性クロマトグラフィー, ゲル濾過クロマトグラフィーを組み合わせて, 電気泳動的に単一な三種の *p*NPG 分解酵素 ( $\beta$ -Glucosidase) を調製した。

### ハスモンヨトウ蛹 GlcNAcase の部分精製

ハスモンヨトウ蛹を緩衝液中で破碎して得られた無細胞抽出液から超遠心分離操作および硫酸分画操作によって得られた部分精製酵素を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) *Penicillium multicolor* 由来三種の $\beta$ -Glucosidase の精製とその基質特異性の精査

我々は上述の通り  $\beta$ -Glucosidase の糖転移活性を利用した AA $\beta$ -配糖体の合成研究において, *p*NPG を分解するという共通

点を持つ一方で、同じ $\beta$ -Glucosidase でも起源が異なると位置選択性をはじめとする糖転移活性に違いがあることを明らかにしてきた。その過程で *P. multicolor* 由来  $\beta$ -Glucosidase 製剤の精製を行い、本酵素製剤中に三種の *p*NPG 分解酵素を見出したので、これらについて加水分解反応および糖転移反応の基質特異性を中心に検討を行い、その結果とこれまでに我々が得ている情報とを総合して、 $\beta$ -Glucosidase の基質認識機構に新たな知見を得ることにした。

*P. multicolor* 由来 $\beta$ -Glucosidase 酵素製剤を各種クロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGE 上で単一のバンドを示す 50kDa, 102kDa, 117kDa の *p*NPG 分解酵素を得た。N 末端アミノ酸配列の解析結果から、これら (Pm $\beta$ -diglycase 50K, Pm $\beta$ -Glucosidase 102K, Pm $\beta$ -Glucosidase 117K と呼ぶ) はそれぞれ別の遺伝子によりコードされていることが分かった。また、Pm $\beta$ -diglycase 50K は鶴喰らが報告した $\beta$ -Diglycosidase<sup>3)</sup> であったが、Pm $\beta$ -Glucosidase 102K と Pm $\beta$ -Glucosidase 117K はこれまでに報告のない酵素であることが判明した。加水分解反応において、Pm $\beta$ diglycase 50K は $\beta$ -Diglycosidase であるものの monoglycoside である *p*NPG に対して分解活性を示した。Pm $\beta$ -Glucosidase 102K は芳香族配糖体に対して高い分解活性を示すという特徴的な基質特異性を有し、Pm $\beta$ -Glucosidase 117K は芳香族配糖体に加えてグルコオリゴ糖に対しても高い加水分解活性を示した。糖転移反応において、Pm $\beta$ diglycase 50K では配糖体生成量は少ないものの cellobiose を糖供与体とした時に優位に反応が進んだのに対し、Pm $\beta$ -Glucosidase 102K と Pm $\beta$ -Glucosidase 117K では *p*NPG に対して優位に反応が進んだ。配糖化位置選択性に注目すると、いずれも AA2 $\beta$ グルコシドと AA6 $\beta$ グルコシドの両方の生成が確認されたが、Pm $\beta$ -Glucosidase 102K と Pm $\beta$ -Glucosidase 117K は AA の C-6 位優先的に配糖化が起こった。

本結果より、*P. multicolor* は複数の *p*NPG 分解酵素を有し、これらは加水分解反応において異なる基質特異性を示すこと、AA を糖受容体とした糖転移反応において、活性の強さや配糖化位置選択性、基質優先性に明確な違いがあることが明らかとなった。さらにこれらの結果は我々がこれまでに明らかにしてきた、*p*NPG 分解活性を示し、かつ同じ GH ファミリーに属する $\beta$ -Glucosidase を、その基質認識の違いから細分化できることが確認された。

上述の通り *P. multicolor* 由来の三種の *p*NPG 分解酵素のうち 102 kDa の酵素 Pm $\beta$ -Glucosidase 102K は、加水分解反応及び糖転移反応において *p*NPG や indican などの芳香族配糖体に対し高い基質特異性を示す一方、セロオリゴ糖や $\beta$ -グルコ二糖を基

質として殆ど利用しないことが分かった。広く知られる *Aspergillus niger* 由来  $\beta$ -Glucosidase や *Trichoderma viride* 由来  $\beta$ -Glucosidase は、*p*NPG だけでなくセロオリゴ糖にも広く活性を示すのに対し、本酵素はそれらと異なるユニークな糖供与体選択性をもつことが明らかになった。そこで、本酵素のさらなる新奇性の確認を目的とし、加水分解反応及び AA への糖転移反応の速度論的解析及び基礎的性状解析を行った。基質には、芳香族配糖体として *p*NPG、二糖として cellobiose を用い、糖供与体を一定濃度とした場合と糖受容体を一定濃度とした両方の場合について、速度論的解析を行った。非線形最小二乗法により速度論的パラメータを算出した結果、加水分解反応において Pm $\beta$ -Glucosidase 102K は、cellobiose よりも *p*NPG に対して高い  $1/K_m$ 、高い  $k_{cat}$  を示した。本酵素の  $k_{cat}$  は *p*NPG と cellobiose のいずれに対しても他の二酵素 (*A. niger* および *T. viride* 由来) より低く、分子活性そのものが低い酵素であると考えられた。しかし、*p*NPG に対する  $1/K_m$  はいずれの酵素よりも高かったため、*p*NPG に対する触媒反応効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) は他の酵素に近いまたは高い値であった。このことは糖転移反応においても同様であった。よって、Pm $\beta$ -Glucosidase 102K は *p*NPG に対して高い基質特異性を示し、cellobiose を基質として殆ど利用できないことが明らかとなった。加えて *A. niger* 由来酵素は *p*NPG 加水分解反応において、2.5 mM 以上の *p*NPG により阻害を受けることが知られているが、*T. viride* 由来酵素と本酵素は *p*NPG 5.0 mM 以下では基質阻害を受けなかった。本酵素の最適温度、最適 pH を検討したところ、それぞれ 60°C 付近、pH4 付近であり、*A. niger* 由来酵素と同様の傾向を示したが、本酵素は *A. niger* 由来酵素より比較的狭い温度範囲及び狭い pH 範囲でのみ活性を示した。

Pm $\beta$ -Glucosidase 102K はこれまでに知られている *p*NPG 分解活性を示す酵素群の中で新奇な基質特異性を示したことから、その Subsite の構造に興味もたれる。今後、本酵素の立体構造が結晶構造解析などから解明されれば同じ反応機構で異なる基質認識を示す酵素の Subsite 構造の差異が明らかとなり、その情報を利用することにより有益な触媒能を示す酵素の創生も可能となることが期待される。

## (2) *p*NP-TMG 分解に関する研究

ハスモンヨトウガ蛹 GlcNAcase に対する *p*NP-TMG の阻害活性

本 GlcNAcase は *p*NP-TMG を全く分解しなかった。すなわち、*p*NP-GlcNAc 分解を示す酵素量の 1000 倍以上の酵素量で反応をしても *p*NP-TMG から *p*NP の遊離は

観察されなかった。

続いて pNP-GlcNAc 分解反応に対する pNP-TMG の阻害効果を測定したところ、IC<sub>50</sub>=400 $\mu$ M を示し、この数値は TMG-chitotriomycin の 1000 分の 1、TMG-monomycin<sup>4)</sup> とほぼ同程度であった。すなわち、TMG-類縁化合物の GlcNAcase 阻害活性には TMG 構造が不可欠であり、加えて、オリゴ糖の重合度がその強さに大きく関与することが改めて示された。

#### pNP-TMG、pNP-GlcNAc 資化性菌の取得とその酵素活性

各種土壌や河川水等から、集積培養法・涵養培養法により pNP-TMG 資化性菌、pNP-GlcNAc 資化性菌数十株ずつの取得に成功した。それら菌株を液体培養し、培養上清および菌体を用いて、pNP-TMG 分解活性と pNP-GlcNAc 分解活性を測定したところ、pNP-GlcNAc 資化性菌は一般のブイヨン培地でも pNP-GlcNAc 分解活性を示し、pNP-GlcNAc 添加によりその活性発現が大きく誘導される菌株が認められた。

一方、pNP-TMG 資化性菌の場合、弱いながら菌体に pNP-TMG 分解活性が認められ、同時に pNP-GlcNAc 分解活性も認められることがあきらかとなった。pNP-TMG 分解酵素についてはこれまで全く報告例がないことからその諸性質、特に GlcNAcase との Subsite 構造が大きく関わる基質認識機構の差異が興味深い。さらに、pNP-TMG 資化性菌が生産する GlcNAcase が pNP-TMG により阻害を受けない可能性があることから、この実験で明らかになったように pNP-TMG がハスモンヨトウ蛹由来 GlcNAcase を阻害することを考慮すると、pNP-TMG 資化性菌が生産する GlcNAcase 基質認識に重要な Subsite 構造が通常の GlcNAcase と異なっていることが予測され、その点も大変興味深く、今後の解明が期待される。

#### 参考論文

- (1) H. Usuki, T. Nitoda, M. Ichikawa, N. Yamaji, T. Iwashita, H. Komura, & H. Kanzaki, TMG-chitotriomycin, an enzyme inhibitor specific for insect and fungal  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases, produced by actinomycete *Streptomyces anulatus* NBRC 13369, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 4146–4152
- (2) H. Shiota, H. Kanzaki, T. Hatanaka, & T. Nitoda, TMG-chitotriomycin as a probe for the prediction of substrate specificity of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidases, *Carbohydr. Res.*, 2013, **375**, 29–34
- (3) K. Tsuruhami, S. Mori, S. Amarume, S. Saruwatari, T. Murata, J. Hiratake, K. Sakata, T. Usui, Isolation and Characterization of a  $\beta$ -primeverosidase-

like enzyme from *Penicillium multicolor*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, **70**, 691–698

(4) H. Usuki, Y. Yamamoto, Y. Kumagai, T. Nitoda, H. Kanzaki, & T. Hatanaka, MS/MS fragmentation-guided search of TMG-chitooligomycins and their structure–activity relationship in specific  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase inhibition, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 2943–2951

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

小出麻奈、菅沼笙子、仁戸田照彦、神崎浩 (岡山大院環境生命)

『*Penicillium multicolor* が生産する三種の p-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside 分解酵素が触媒する L-アスコルビン酸への糖転移反応における基質特異性の比較研究』, 日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018.3.16, 名古屋)

菅沼笙子、寺坂美紀、仁戸田照彦、神崎浩 (岡山大院環境生命)

『糖供与体選択性の異なる $\beta$ -グルコシダーゼが触媒するアスコルビン酸への糖転移反応の速度論的研究』, 日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017.3.18, 京都)

菅沼笙子、寺坂美紀、仁戸田照彦、神崎浩 (岡山大院環境生命)

『L-アスコルビン酸への糖転移反応における基質特異性および位置特異性の異なる $\beta$ -グルコシダーゼの速度論的研究』, 日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016.3.30, 札幌)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

神崎 浩 (KANZAKI, Hiroshi)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授

研究者番号：60183787

(4)研究協力者

菅沼笙子 (SUGANUMA, Shoko)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・博士前期課程学生 (平成 27, 28 年度)

小出麻奈 (KOIDE, Mana)

岡山大学・農学部・四回生 (平成 29 年度)