

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05382

研究課題名(和文) 微生物が持つ新しい糖質異性化酵素群を活用した糖質変換技術の開発と応用

研究課題名(英文) Carbohydrate conversion by novel bacterial carbohydrate epimerases

研究代表者

佐分利 亘 (Saburi, Wataru)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00598089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多様な構造を持つ糖質は様々な優良な機能を持つが、自然界での糖質の存在は極端に偏っている。このため有用な希少糖質の活用には豊富な糖質資源を原料とした酵素合成技術の充実が必要である。本研究ではマンノース2-エピメラーゼ(ME)に関し、当初発見された*Runella slithyformis*由来酵素に加えて、*Dyadobacter fermentans*など複数の菌株が保有するホモログの機能を明らかにした。また、MEの類縁酵素の解析により、1-4二糖に加えてグルコースやガラクトースなどの単糖にも作用する広い特異性を持つセロビオース2-エピメラーゼを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多様な機能が期待される糖質の有効利用には糖質合成技術の充実が不可欠である。本研究では、自然界に豊富な糖質資源を希少糖質も変換する異性化酵素に注目した。本研究で詳細な機能を明らかにしたME酵素はグルコースをマンノースに変換する酵素であるが、マンノースは鶏卵のサルモネラ汚染の防除剤やヒトの尿路感染症予防剤として有用であることから、本研究成果はマンノースの効率生産技術の基盤として貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Carbohydrates with various structures have a variety of excellent functions, but kind of carbohydrates, which are abundantly present, is extremely limited. Therefore, it is necessary to establish the enzymatic synthesis technology using abundant carbohydrate resources for the utilization of useful rare carbohydrates. In this study, we clarified the functions of mannose 2-epimerase (ME) homologs from several strains, such as *Dyadobacter fermentans*, in addition to the originally discovered enzyme from *Runella slithyformis*. In addition, a cellobiose 2-epimerase with broad specificity that acts on monosaccharides such as glucose and galactose in addition to 1-4 disaccharides was discovered through functional analysis of ME homologs.

研究分野：酵素化学

キーワード：マンノース2-エピメラーゼ セロビオース2-エピメラーゼ マンノース タロース

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖質は、多様な構造を持ち、多様な物理化学的特性・生物機能性を示す。構造の多様性とは対照的に地球上に存在する糖質の存在比率は偏っており、豊富に存在する糖質は極少種に限定される。セルロースや澱粉は豊富な糖質の好例であるがいずれもグルコースを構成単位とする。このことから、希少糖質の機能性を発見、利用するには、豊富な糖質原料からの効率的な希少糖質合成技術を確立し、供給体制を整える必要がある。

糖質の合成は有機合成と酵素合成に二分される。有機合成は少量合成に有用だが、工程が煩雑で有機溶媒の使用に伴う環境負荷も大きく大量生産に適さない。一方、酵素合成は目的糖質の合成に適す酵素があれば、水系、温和な条件下で反応が可能、大規模化も容易である。産業的な糖質生産のほとんどが酵素反応を利用したものであることはこのことを反映している。したがって、糖質の酵素合成技術の発展は、環境に優しい効率的な糖質利用に不可欠と言える。酵素合成の可否は、触媒酵素に完全に依存し、目的糖質を合成する酵素がなければ適用外となってしまう。このことから、糖質変換に利用可能な酵素のバリエーションの充実が必要である。

解糖系やペントースリン酸経路など主要経路を含む糖質代謝において異性化酵素（エピマー間の変換やアルドースのケトースへの変換を触媒）は必須の機能を果たし、豊富な糖質資源の希少糖質への変換に有用である。膨大な知見の蓄積がある加水分解酵素など分解酵素と比して、異性化酵素はバリエーションに乏しく、糖質合成での利用が制限されることが問題である。酵素種の充実が特に求められ、解決すべき課題であった。

2. 研究の目的

多様な環境に適応し、幅広い糖質を分解代謝する微生物は、糖質代謝酵素のリソースとして優良である。異性化糖やトレハロースなど幅広く利用される糖質のほとんどは新しい微生物酵素の発見により産業利用が実現した。ルーメン細菌 *Ruminococcus albus* より見出されたオリゴ糖異性化酵素セロピオース 2-エピメラーゼ（以下 CE； -(1 4)二糖のエピメリ化を触媒）のホモログの機能解析の中で、*Runella slithyformis* 由来の CE 様タンパク質が二糖に全く作用せず、単糖マンノース (Man) をグルコース (Glc) にエピメリ化する活性、すなわち Man 2-エピメラーゼ (ME) というべき新規活性を示すことを見出した。Man を一段階反応で Glc にエピメリ化する酵素の報告はこれまでになく（二つのイソメラーゼの利用による Glc の Man への変換は既知だが収率は 10%程度と低い）、可逆反応なため安価な Glc を原料とした Man の高効率生産が期待された。Man はサルモネラ菌の繊毛に結合して腸管表皮細胞への吸着を阻害することが知られ、鶏卵のサルモネラ菌汚染防除効果やヒトでの膀胱への感染予防効果が認められている。しかし、 α -マンナン分解に依存した現在の製法ではコストが高く、低コストの Man 製造法が求められている。そこで本研究では、*R. slithyformis* に見出された ME (RsME) の酵素機能を明らかにし、このホモログタンパク質の解析・機能強化酵素の開発を通じて Man の革新的合成法を提供すること、ME および CE ホモログから新しい糖質異性化酵素を取得し、糖質異性化酵素の充実を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組換えタンパク質の調製

RsME など目的のタンパク質をコードする遺伝子を pET-23a プラスミドにクローニングし、発現プラスミドとした。ME や CE ホモログの遺伝子は、DSMZ などから取得したゲノム DNA を鋳型とした PCR により得た。各酵素の発現プラスミドを導入した大腸菌 BL21(DE3) 株において、IPTG 存在下で組換えタンパク質を生産し、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより電気泳動的に単一に組換えタンパク質を精製した。

(2) 酵素活性の測定

ME の活性測定では、マンノースに対するエピメラーゼ活性により生じるグルコースをヘキソキナーゼ法により定量した。その他の糖質に対する異性化活性については、HILICpac VG-50 4E カラムなどを用いた HPLC 分析により反応生成物を定量することで求めた。

(3) 部位特異的飽和変異酵素の解析

RsME を親酵素とし、基質結合部位周辺に位置する保存性の低いアミノ酸残基に対して部位特異的飽和変異を導入した。変異の導入には Primestar mutagenesis basal kit (タカラバイオ) を用い、変異導入位置のアミノ酸残基をコードするコドンに NNS に置換した。

4. 研究成果

(1) RsME の機能

組換え RsME を大腸菌により生産・精製し、酵素機能を解析した。本酵素を各種基質に作用させた結果、マンノースとグルコースの間のエピメリ化を特異的に触媒した。分析条件下では、本酵素は、ME 類縁タンパク質の CE が基質とする 1-4 二糖には作用せず、同じく類縁タンパク質マンノースイソメラーゼが触媒するマンノースのフルクトースへの異性化も触媒しなかった。RsCE によるグルコースからマンノースの合成収率は 24% であり、既報のマンノース合成法、すなわち二つのイソメラーゼを組み合わせた酵素合成法（マンノース フルクトース グルコース）よりも高い収率でマンノースを合成できることを確認した。ME による反応機構を明らかにするために、ME 反応を重水中で行い、この反応生成物の構造を解析した。酵素反応中にリアルタイムで反応生成物の $^1\text{H-NMR}$ を測定すると、マンノースからの反応でもグルコースからの反応でも型の生成物を与えることがわかった。またグルコースに対する反応では、 α -グルコースに対する反応よりも β -グルコースに対する反応において反応生成物の顕著な生成が確認されたことから、本酵素は β -アノマーの糖を基質とすることがわかった。すなわち、ME の反応は、 β -グルコース \rightleftharpoons β -マンノース

であると結論づけた。

反応平衡に達するまで保持した反応液中の溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣を軽水に溶解した後に $^2\text{H-NMR}$ を測定すると、基質の 2 位のプロトンが反応生成物において重水素に置換されていることが確認された。すなわち、マンノース 2-エピメラーゼの反応では、基質の 2-H が酵素のより引き抜かれ、*cis*-エンジオレート中間体を経て、別のプロトンが酵素により与えられる反応機構に従うことが示唆された。以上の機能については新規な酵素活性として認められ、マンノース 2-エピメラーゼは、EC 5.1.3.44 として登録された。

(2) ME ホモログの機能解析

RsME は、CE などの類縁タンパク質とアミノ酸配列を比較すると、特徴的に長いループ領域を有する。このループ領域を含め、RsME と高い配列同一性を示す *Dyadobacter fermentans* などいくつかの菌株のホモログについて大腸菌組換え酵素を調製し、酵素活性を検討した。検討したホモログはいずれも ME 活性を示した。このことより、RsME の配列的特徴に基づき、未知タンパク質から ME を精度良く取得できることが示された。これらホモログの機能解析の中で、本酵素がキシロースやリキソースなどの単糖にも作用し、エピメラーゼ活性のみならずイソメラーゼ活性も微弱ながら示すことが明らかになった。

ME に認められた長いループ構造に注目して CE などの類縁タンパク質群の配列を解析すると、*Melioribacter roseus* 由来 CE 様タンパク質 (MrCE) は CE と高い配列同一性を示しつつも ME と同等の長さのループ構造を有することが判明した。この MrCE の酵素機能を調べると、本酵素は CE と同様に β -(1-4) 二糖高い活性を示したが、CE とは異なり、グルコースやガラクトースにも有意なエピメラーゼ活性を示した。ガラクトースに対する反応を利用し、希少単糖タロースの合成を行った。400 g/L ガラクトースを基質とした反応により、50 g/L タロースの生成が認められた。この反応では、イソメラーゼ反応生成物であるタガトースの生成も見られた。カルシウム配位型イオン交換樹脂を用いたクロマト分画により、純度 92% のタロースを 547 mg 得た。以上より、本酵素はタロース生産に実質的に利用できることが明らかになった。

MrCE に見られた長いループに注目し、この削除変異酵素を調製し、基質特異性を検討した。当該変異酵素では野生型酵素より明らかに単糖に対する特異性が低下した。ループの短縮化に伴う単糖特異性の低下から、本ループ構造が MrCE の単糖への高い活性に重要なことが明らかになった。

(3) 部位特異的飽和変異による RsME の高活性化

RsME のマンノース生産への利用のため、本酵素の高活性化を検討した。推定触媒部位近傍に位置し、ホモログ間における配列保存性が低いアミノ酸残基 17 残基に注目し、各残基に部位特異的飽和変異を導入した。各残基における飽和変異ライブラリーのスクリーニングのため、変異酵素のハイスループットスクリーニング系を検討した。すなわち、96 穴プレートを活用した小規模培養系による組換え酵素生産条件、溶菌試薬による酵素抽出条件と無細胞抽出液の酵素活性の評価方法を確立した。飽和変異ライブラリーより、野生型酵素の 1.5 倍の比活性を示す変異酵素 P233K を取得した。P233K のマンノースに対する速度パラメータを測定すると、本変異酵素の K_m 値は野生型酵素の 1/2 程度であり、P233K 変異によりミカエリス複合体が安定化したことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saburi, W., Sato, S., Hashiguchi, S., Muto, H., Iizuka, T., Mori, H.	4. 巻 103
2. 論文標題 Enzymatic characteristics of D-mannose 2-epimerase, a new member of the acylglucosamine 2-epimerase superfamily	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 6559-6570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-019-09944-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐分利 亘	4. 巻 11
2. 論文標題 セロピオース2-エピメラーゼと類縁酵素群の構造と機能に関する研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 応用糖質科学	6. 最初と最後の頁 22-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 鈴佳, 佐分利 亘, 飯塚 貴久, 森 春英
2. 発表標題 単糖に有意な活性を示す <i>Melioribacter roseus</i> 由来セロピオース2-エピメラーゼによる希少糖D-タロースの生産と基質特異性に寄与する構造
3. 学会等名 日本農芸化学会北海道支部第2回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋口 早紀, 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 部位特異的ランダム変異による <i>Runella slithyformis</i> 由来マンノース2-エピメラーゼRunsI_4512の高活性化
3. 学会等名 応用糖質科学会北海道支部シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐分利 亘
2. 発表標題 セロピオース2-エピメラゼおよび類縁酵素群の構造と機能に関する研究
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋口 早紀, 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 マンノース2-エピメラゼの高活性化および菌体外発現系の構築
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会北海道支部/第50回日本栄養・食糧学会北海道支部合同学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐分利 亘
2. 発表標題 セロピオース2-エピメラゼと類縁酵素群の機能・構造・応用
3. 学会等名 日本応用糖質科学会北海道支部令和2年度シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 エピメリ化活性を有するタンパク質	発明者 佐分利亘、森春英、 飯塚貴久、藤本佳 則、高木宏基	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、W02019/035482A1	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 糖のエピメリ化触媒用の酵素剤、エピメリ化反応生成物の製造方法およびエピメリ化反応生成物	発明者 森春英、佐分利亘、 谷美生夏、金井研太 飯塚貴久	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6657453	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

北海道大学大学院農学研究院生物化学研究室ホームページ
<http://lab.agr.hokudai.ac.jp/biochem/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------