

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19159

研究課題名(和文)自然界におけるL-グルコシド分解酵素の探索と機能性未知L-オリゴ糖の合成

研究課題名(英文) Search for L-glucoside degrading enzymes in nature and synthesis of unknown functional L-oligosaccharides

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：天然の多くの糖質はD体により構成されているが、L体の単糖ならびにオリゴ糖が存在していても理論的にはおかしくないという背景のもと研究を開始した。既存酵素に新しいL-グリコシドに対する特異性を発見し、また新奇L-グリコシド特異性を有する酵素を配列データベースより取得することに成功した。またこれらL-グリコシダーゼを用いたL体の糖質からなるオリゴ糖や、D体とL体が混在したオリゴ糖を合成することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然に新規L-グリコシダーゼを発見した本研究は、既存のL-フコシドやL-ラムノシドに加えて新しいL-グリコシドが天然に存在することを示唆するものである。新しい研究分野として今後発展させていきたいと考えている。オリゴ糖や希少糖といわれる糖質には、腸内フローラを整えるなど、いわゆるプロバイオティクス効果を有するものが数多く存在する。今回合成することに成功したL体糖質からなるオリゴ糖にもこれら効果が期待され、来る我が国の高齢化社会に向けて、あたらしい健康素材を提供する可能性を有していると考えている。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted on the basis that most of the natural carbohydrates are composed of the D-series, but I believe that even if L-series monosaccharides and their oligosaccharides are naturally occurring, they are not theoretically strange. We discovered a new specificity for L-glycoside in an existing enzyme, and succeeded in obtaining an enzyme with a novel L-glycoside specificity from a sequence database. In addition, these L-glycosidases were used to synthesize oligosaccharides consisting of L-series carbohydrates and a mixture of D- and L-series oligosaccharides.

研究分野：酵素科学

キーワード：L系列糖質 オリゴ糖 L-グリコシダーゼ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自然は何らかの理由でD糖を選択し、D糖優位のホモキラリティーを有している。しかし近年、L-グルコースを代謝する微生物が発見され、天然にもL-グルコースが存在することが示唆されて始めている。一方で、L-グルコースはD系列の糖のエピメリ化により生じたものなのか、それとも光合成のようなL系列炭水化物合成系が存在し、これにより作られた糖類の分解物なのかは不明である。

またL糖を構成糖とするオリゴ糖(L-オリゴ糖)には、未知の機能性が秘められている可能性がある。ここでの機能性とは、例えば、ヒトには分解されず有用腸内細菌に資化されるプレビオティクスとしての機能や希少糖といわれるD-プシコースやD-アロースに見られる生活習慣病の予防や改善またガン細胞増殖抑制作用といった機能である。しかし現時点で、L-オリゴ糖を簡便に酵素合成する手段はなく、機能性を解析することは困難である。

自然界にはL糖が全く存在しないというわけではない。L糖のグリコシド結合として $\alpha$ -L-フコシド、 $\alpha$ -L-ラムノシドなどが存在する。 $\alpha$ -L-フコシドはヒトミルクオリゴ糖や血液型H、A、およびB抗原、キシログルカン側鎖に存在し、 $\alpha$ -L-ラムノシドはペクチンに存在することが知られている。またこれらを加水分解する $\alpha$ -L-フコシダーゼや $\alpha$ -L-ラムノシダーゼの存在も知られている。

### 2. 研究の目的

本研究では、L糖配糖体やL-オリゴ糖に作用する新しいL-グリコシド分解酵素を天然に見つけ出すことを目的とする。本研究での新しい基質特異性を有するL-グリコシド分解酵素、例えばL-グルコシド分解酵素の発見は、天然にこれまで知られていないL-オリゴ糖やL糖配糖体が存在する可能性を示唆するものとなり、地球上に隠れたL系列の糖類が存在することを示唆することになる。

また得られたL-グリコシド分解酵素を用いたL-オリゴ糖酵素合成系の開発も本研究の目的とする。天然に普遍的に存在するD系列のオリゴ糖は糖質加水分解酵素の糖転移反応や糖質加リン酸分解酵素の逆反応により合成可能である。これらの反応を、L-グリコシド分解酵素にも適用し、L-オリゴ糖酵素合成系を開発する。

### 3. 研究の方法

本研究ではパイオインフォマティクスならびにタンパク質工学により得られたL-グリコシド分解酵素の機能解析とこれら酵素を用いたL-オリゴ糖合成、L糖資化ならびにL-グリコシド分解酵素保有菌のスクリーニングを実施した。

酵素の機能解析に用いる基質については、市販品がほとんど存在しないため、有機化学合成し用いた。

アミノ酸配列解析ではMAFFT server (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>)を使用し、系統樹のビジュアライゼーションにはiTOL (<https://itol.embl.de/>)を使用した。

糖の分析では、薄層クロマトグラフィー(TLC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、パルスドアンペロメトリ検出器を用いた陰イオンクロマトグラフィー(HPAEC-PAD)により分析した。

L糖資化ならびにL-グリコシド分解酵素保有菌のスクリーニングでは、北海道各地の土壌、海洋開発研究機構(JAMSTEC)より恵与いただいた海底堆積物からスクリーニングを実施した。

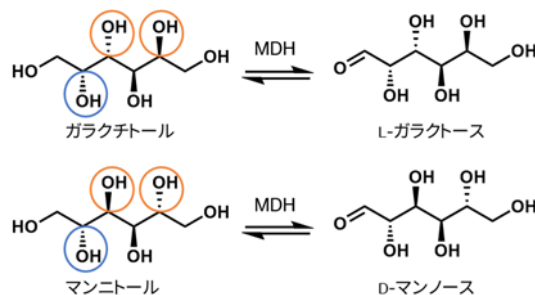
### 4. 研究成果

#### 1) L-ガラクトースの合成

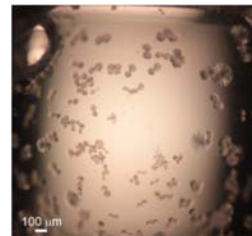
L-ガラクトースは市販価格が高く、また入手が困難である。本研究ではL-ガラクトースやL-ガラクトシドを頻繁に使用するため、自前での合成系の構築を試みた。

酵素合成系 — 植物起源のマニトール脱水素酵素(MDH)を用いて、ガラクトチールからL-ガラクトースを合成する反応系の構築を試みた。MDHがガラクトチールを基質とし、L-ガラクトースを生成することを確認できたが、本来の基質であるD-マンニトールに対する反応速度の14%と触媒効率が低かった。低触媒効率また補因子である $\text{NAD}^+$ の枯渇による反応停止を克服するため、①MDHのタンパク質工学による改変、②酵素反応カップリングによる $\text{NADH}$ のリサイクルを試みた。

①MDHは元来マンニトールを基質としてD-マンノースを生成する酵素である。この酵素は図に示すように2位水酸基の立体選択性がマンニトールと一致する基質の1級アルコールを還元する。そのためMDHはガラクトチールを基質として還元、L-ガラクトースを生成できるが、3位、5位水酸基の立体配置が異なる(赤丸)ために、触媒効率が悪いと考えられた。そこで、これらの立体選択性をタンパク質工学的に改変することを試みた。MDHは立体構造が未知であるため、まずX線結晶構造解析による立体構造解析を試みた。MDH cDNAを大腸菌に最適なコドンに変換したDNAを受託合成し、大腸菌で組換

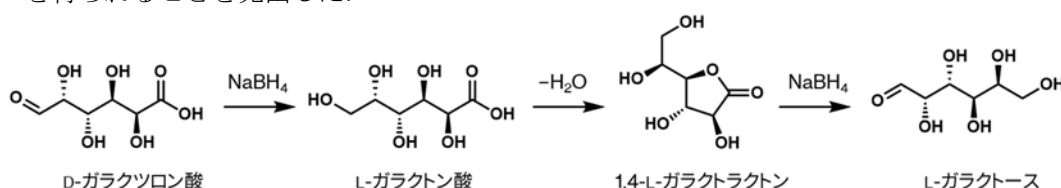


えタンパク質を調製した。金属アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーにより精製したタンパク質の結晶（右写真）に対して X 線を照射したが構造解析できるデータを得ることができなかった。また類縁酵素を用いたホモロジーモデリングを試みたが、鋳型となり得る配列類似性が十分に高いタンパク質での立体構造解析がなされておらず、適切なモデル構造を得ることができなかった。



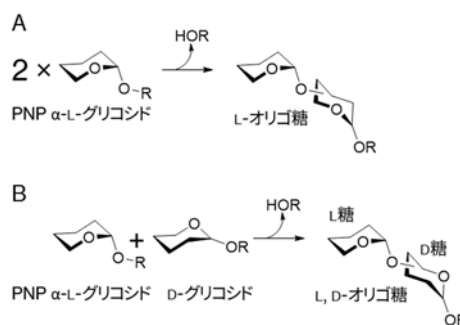
② NADH oxidase を用いて NADH を  $\text{NAD}^+$  へ変換し、リサイクルすることを試みた。微生物から NADH oxidase 遺伝子をクローニングし、大腸菌での組換え酵素の生産を試みたが、十分量の可溶性タンパク質を得ることができなかった。可溶性タンパク質を得る目的で、通常の pET システムによる発現に加え、低温誘導性プロモーターをもつ pCold プラスミド、また可溶性を高める SUMO タグとの融合タンパク質としての生産を試みたがいずれも十分量の可溶性タンパク質を得ることができなかった。そもそもの化学平衡がガラクトースに偏っていることも考慮し、次に示す化学的方法による L-ガラクトース合成に移行した。

化学反応合成系 — D-ガラクトツロン酸を水素化ホウ素ナトリウムで還元し、L-ガラクトン酸を経由して L-ガラクトースに変換する方法（下スキーム）は以前から知られていた方法ではあるが、1,4-L-ガラクトラクトンの生成とその還元についてのこれまでの方法が曖昧であったため、高収率で L-ガラクトースを得ることができなかった。本研究では、1,4-L-ガラクトラクトンの結晶を得る方法、ならびに還元反応において pH を 5.0 付近に維持することで効率よく L-ガラクトースを得られることを見出した。

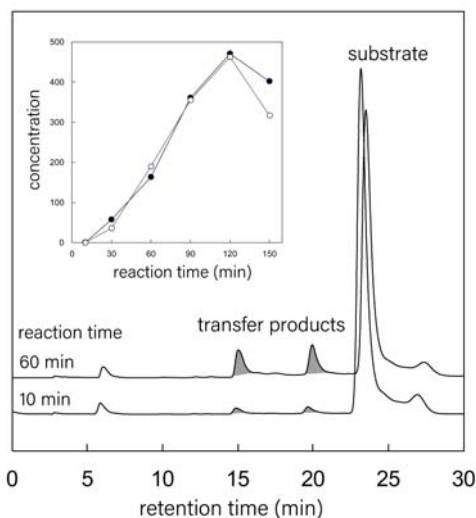


## 2) 既存 $\alpha$ -L-フコシダーゼの基質特異性

$\alpha$ -L-フコシダーゼは自然界に数少ない L 糖のグリコシド結合である  $\alpha$ -L-フコシドに作用・加水分解する酵素である。 $\alpha$ -L-フコシダーゼでは多くの酵素化学的な研究がなされており、立体構造が明らかとされているものも数多く存在する。これまでの研究では、基質のアグリコンに対する基質特異性に関する報告は数多くある。一方で、グリコン、すなわち  $\alpha$ -L-フコシドに対する特異性の揺らぎについての報告はない。本研究では有機化学合成した各種 *p*-ニトロフェニル  $\alpha$ -L-グリコシドに対する好熱菌由来  $\alpha$ -L-フコシダーゼ (Ts  $\alpha$ -L-Fuc) の反応速度を調査した。Ts  $\alpha$ -L-Fuc は *p*-ニトロフェニル  $\alpha$ -L-フコシドに対して最も高い基質特異性を示したものの、これまで報告のない *p*-ニトロフェニル  $\alpha$ -L-グリコシドも基質とすることがわかった。またこの *p*-ニトロフェニル  $\alpha$ -L-グリコシドを基質として糖転移反応も触媒し、L 糖から構成される L-オリゴ糖（右図 A）を合成することも明らかとした。さらに Ts  $\alpha$ -L-Fuc に点変異を導入し、*p*-ニトロフェニル  $\alpha$ -L-グリコシドを供与体とするが、これを受容体とせず、D 糖のみを受容体とする変異酵素の取得に成功した。この酵素を用いることで、L 糖と D 糖が混在するオリゴ糖（右図 B）を合成することが可能となった。



また別の細菌由来  $\alpha$ -L-フコシダーゼを用いて *p*-ニトロフェニル  $\alpha$ -L-グリコシドを基質とした糖転移反応を解析した。反応生成物を HPLC により分析し（右図）、経時的な生成物の濃度を測定した（右図挿入図）。糖転移産物の収率は 10%程度であり、今後収率向上を目指した研究が必要になると考えられた。



## 3) 新規 $\alpha$ -L-グリコシダーゼの発見

アミノ酸配列データベースに登録される L-グリコシドに作用する酵素とその類似配列を系統解析し、特徴的なアミノ酸配列を有する配列を探索した。得られたアミノ酸配列をコードする DNA を受託合成し、大腸菌で組換え酵素を生産した。得られた酵素について、有機化学合成した各種 *p*-ニトロフェニル  $\alpha$ -L-グリコシドに作用させ

たところ、これまで報告のない  $\alpha$ -L-グリコシドを加水分解することを見出した。この酵素を用いて糖転移反応を行い、新規 L-オリゴ糖を合成することに成功した。

#### 4) L-グルコース資化菌のスクリーニング

L-グルコースを炭素源とした最小液体培地に対して、北海道各地の土壌もしくは JAMSTC より恵与いただいた海洋堆積物を接種し、振とう培養した。土壌からのスクリーニングでは Shimizu らの報告にある培地を用いた。海洋堆積物からのスクリーニングで用いた培地を右表に示した。

培養液を新たな培地に植え継ぎ、L-グルコース資化集積培養系を構築した。この際、L-グルコースの資化を培地上清の TLC により確認した。6 から 7 回植え継ぎ培養を繰り返したのち、上述最小培地に寒天を加えた固体培地に画線し、シングルコロニーアイソレーションを実施した。得られたシングルコロニーからコロニー PCR により 16SrRNA 高度可変領域の一部を増幅し、塩基配列を解析することで菌を同定した。スクリーニングした菌には、*Bacillus* 属、*Halomonas* 属が含まれていた。

NaCl	27.5 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4.18 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.4 g
KCl	0.33 g
2 M CaCl <sub>2</sub>	0.5 mL
20×P*	0.5 mL
yeast extract B2	0.5 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.5 g
L-glucose	2.5 g
1 L あたりの組成 固体培地の場合には、Agar, 20 g を加えた。 * 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	

1) Shimizu T., et al J. Biol. Chem., 287 (48), 40448-40456 (2012)

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 Klahan P, Okuyama M, Jinnai K, Ma M, Kikuchi A, Kumagai Y, Tagami T, Kimura A.	4. 巻 82
2. 論文標題 Engineered dextranase from <i>Streptococcus mutans</i> enhances the production of longer isomaltooligosaccharides.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 1480-1487
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2018.1473026	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 Ma M, Okuyama M, Tagami T, Kikuchi A, Klahan P, Kimura A.	4. 巻 67
2. 論文標題 -1,3/ -1,4-Glucosidase from <i>Aspergillus niger</i> Exhibits Unique Transglucosylation to Generate High Levels of Nigerose and Kojibiose.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Agric Food Chem	6. 最初と最後の頁 3380-3388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jafc.8b07087	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菊池 麻子, 中川 雄登, 奥山 正幸, 田上 貴祥, 木村 淳夫
2. 発表標題 Bacteroides thetaiotaomicron由来GH97酵素：5つの機能未知パラログの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 雄登, 松永 夏奈, 菊池 麻子, 奥山 正幸, 田上 貴祥, 木村 淳夫
2. 発表標題 Bacteroides thetaiotaomicron由来 -galactosidase (BtGal97a) の天然基質に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----