

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292049

研究課題名(和文)糖質酵素が示す糖転移反応を支配する新規な構造因子の分子機構の究明と応用

研究課題名(英文)Molecular mechanism and application of structural elements that govern
carbohydrase-catalyzed transfer reaction

研究代表者

木村 淳夫(KIMURA, Atsuo)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90186312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、糖質酵素が示すオリゴ糖の合成反応(糖転移作用)を支配・向上できる新しい4つの現象を解析し、本反応の分子機構を知り、応用研究に結びつけることにある。以下に得られた成果を述べる。1)新奇な-1,3-グルコシド転移酵素において-1,3転移を担う構造因子を確定した。2)触媒残基の変異酵素に見出された高転移活性に関して反応機構を調べ、強い転移能を有する変異体を取得した。3)活性部位にある細孔の分子解析を行い、触媒水の供給機能があることを推定した。4)多糖合成酵素が示すオリゴ糖合成に關与する構造因子を決定した。

研究成果の概要(英文)：This project aims at identification and application of structural elements that regulate and improve the carbohydrase-catalyzed transfer activities by elucidating four promising phenomena, which we newly found. Results obtained are as follows: 1) we identify the structural elements to control the -1,3-transfer reaction displayed by -1,3-glucoside-transfer enzyme; 2) we reveal the reaction mechanism of the catalytic residue-mutated glycosidase that shows the high transfer yield; 3) a pore canal at the active site of glycosidase plays a role that supplies the catalytic water by study at the molecular level. 4) we analyze the polysaccharide-producing enzyme and identify its structural elements to contribute to the synthesis of oligosaccharides.

研究分野：応用生物化学

キーワード：糖質酵素 糖転移反応 構造因子

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの成果と着想の経緯

糖質酵素はグリコシド結合に対し「加水分解と糖転移」を触媒する(図1)。特に糖転移作用は応用性が高い反応であり、清涼飲料水などに含まれる機能性オリゴ糖の工業生産に利用される(Nakakuki, 2005)。我々は、長年にわたり『糖質酵素の機能と構造』を究明してきた。最近、糖転移反応を支配できる4つの現象を見出した。以下にその詳細を述べる。

① 新奇な α -1,3-グルコシド転移酵素

我々は新奇な α -1,3-グルコシド転移酵素を見出した。ニゲロオリゴ糖(食することで免疫能を活性化)を大量に産生する新しい性質を示した。 α -1,3 転移がない相同酵素のアミノ酸配列と高い一致を示すことから、一致がない残りの配列に「 α -1,3 転移の構造因子」があると着想した。因子の予想には、我々が解明した立体構造も利用できる(Tagami *et al.*, 2013)。従って、相同酵素に当該因子を発生させ、 α -1,3 転移機能の付与が期待できる。

② 触媒残基の変異酵素

我々は、触媒残基の変異酵素の転移作用に注目している。その理由は、加水分解がなく、合成の理論収率が極めて高くなるからである。 α -グルコシダーゼ(加水分解酵素)の触媒残基の置換酵素が、非常に高い収率の転移反応を示したので解析を行う。同様な触媒残基の変異実験を他の酵素でも行い、本現象の一般化を図る。

③ 触媒水の供給機構

図1の加水分解と糖転移の両反応は、それぞれ水分子が反応に参加および不参加と捉えることができる。我々は、水分子(触媒水)の排除で「転移反応の一方的進行」を発想した。一方、我々は α -グルコシダーゼのX線結晶解析に成功した。驚いたことに活性部位に「酵素分子の外部に通じる細孔」が存在していた。本細孔は「触媒水の供給経路」と予想され、変異による細孔の閉塞で触媒水の供給を断ち、転移反応の増加を試験する。我々の予備実験で当該発想を支持するデータが得られているので、本知見の拡充と理論化を図りたい。

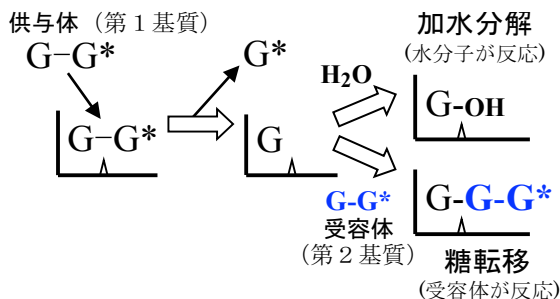


図1. 加水分解反応と糖転移反応

Gはグリコシル残基を示し、G*は還元力があるグルコース残基(あるいはグルコース)を示す。△は切断部位を表す。青色で示した「G-G*」が結合する部位を『受容体基質の結合サイト』と称する。

④ 多糖合成酵素のC末端削除体

多糖合成酵素のC末端削除体が「多糖合成の低減・オリゴ糖合成の増加」を示した。C末端領域に注目し、オリゴ糖合成を促す構造因子を決定する。

(2) 研究動向

現在、上述の(1)項①~④に関する解析研究は、国の内外においてほぼ皆無である。一方、糖転移反応を扱う一般的研究は欧州で活発に行われているため、近い将来において競合も予想される。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、『1項(1)の①~④で述べた4つの現象から糖質酵素が触媒する糖転移の構造因子と分子機構を知り、応用研究への進展を図ること』である。以下に、具体的な目的を示す。

(1) 新奇な α -1,3-グルコシド転移酵素

このユニークな転移酵素に関し、立体構造の解析から構造因子を推測し、実験的に確認を行う。次に構造因子の移植を図り、その応用を目指す。

(2) 触媒残基の変異酵素

触媒残基の変異で高い転移能を示した酵素について、まず糖転移反応に関する基本的性質を明らかにする。また置換アミノ酸の種類・触媒残基の種類による影響を調べる。他の酵素についても同様な試みを行い、高転移能力の付与を検討する。

(3) 触媒水の供給機構

細孔を形成する幾つかのアミノ酸に対し変異を導入し、触媒水を供給する細孔の閉塞を行い、転移活性の上昇を観察する。

(4) 多糖合成酵素のC末端削除体

オリゴ糖合成に関与する構造因子がC末端領域に存在すると推察できるので、C末端領域の配列削除やアミノ酸置換により構造因子を推定する。

3. 研究の方法

2項で述べた目的を達成するため、以下の方法で研究を実施する。

(1) 新奇な α -1,3-グルコシド転移酵素

① 立体構造の解析

酵素結晶を作製しX線構造解析を行う。その後、基質との複合体結晶も調製する。

② 構造因子の決定

前項で得た立体構造から α -1,3 転移に関わる構造因子を予想する。予想構造に変異を導入し転移能を調べ、構造因子を決定する。なお、①項で行う立体構造解析に遅延や不首尾が生じた場合は、相同酵素の立体構造から因子を推定する。

③ 構造因子の移植

配列保存性があるが α -1,3 転移が少ない相同酵素に当該構造因子を発生させ、免疫細胞

の活性化を促すニゲロオリゴ糖の生産を観察する。

(2) 触媒残基の変異酵素

① 基本的性質

高い転移能を示した触媒残基の変異酵素に対し、供与体(第1基質)や受容体(第2基質)

(それぞれの基質は図1参照)に関する特異性を調べる。同時に生成物の構造を決定する。

② アミノ酸の影響

アミド型アミノ酸への変異で見出された現象であるが、他のアミノ酸に置換し、高効率な転移反応を与える変異体を探索する。

③ 他の触媒残基

糖質加水分解酵素の触媒アミノ酸は一般的に2残基存在する。従って、他方の置換酵素にも本現象を示す可能性があるので調べる。

④ 当該現象の応用

他の酵素についても同様な触媒残基の置換酵素を作製し、高転移能を調べる。

(3) 触媒水の供給機構

① 細孔形成のアミノ酸

供給孔を遮断し触媒水の供給を断つため、次の方法を用いて検証する。すなわち、細孔を狭めるため「細孔中央のアミノ酸」および「細孔の外部出口部分にあるアミノ酸」を嵩の大きな残基に置換する手法である。評価は、転移活性の上昇と加水分解活性の低下で行う。なお、予備研究で「細孔中央のアミノ酸」の置換実験データ(転移能の増加)を得ているので、本変異酵素を比較に用いる。

(4) 多糖合成酵素のC末端削除体

① 領域の絞り込み

多糖合成酵素のC末端領域に対し、C末から大規模に削除し、オリゴ糖合成と多糖合成を指標に構造因子を有する領域を把握する。次に、候補の領域について小規模な削除を行い、目的領域を確定する。

② 構造因子の推定

前項で得た領域の各アミノ酸に点置換を発生させ、本機能を発揮させる構造因子を推定する。

4. 研究成果

(1) 新奇な α -1,3-グルコシド転移酵素

本酵素遺伝子の異種宿主発現に成功した。触媒残基は類縁酵素の一次構造から予測し、部位特異的変異実験で確認した。この知見から活性部位の立体構造上の位置情報を取得した。本情報をもとに α -1,3-グルコシド結合特異性に関するアミノ酸を類縁酵素の立体構造から推定し、点変異法を用いて検討を行った。その結果、複数の候補を認めた(芳香族残基と酸性残基)。両者の置換は、 α -1,3-グルコシド基質への親和性を親酵素より高めたが、前者の転移能は低下した。一方、後者は親酵素より高い転移活性を与えたので、当該の酸性アミノ酸が構造因子と推定した。精製組換

え酵素の結晶は得られなかったが、類縁酵素の構造情報から両残基は転移サイトに存在した。以上の結果から、 α -1,3-転移に関わる構造因子を解明できた。当該構造因子を α -1,3-転移活性が低い相同酵素に変異発生させると、本転移能の若干増加が観察された。

(2) 触媒残基の変異酵素

糖質加水分解酵素の触媒アミノ酸は一般的に2つの酸性残基から成る(残基-Iと残基-IIと称す)。 α -グルコシダーゼが有する残基-Iの置換酵素が転移効率を増加させたので、本残基の変異酵素を調製した。すなわち、アミド型アミノ酸への置換(変異体A)および水酸基を有する小さな残基への置換(変異体B)である。まず、両変異体の基本的な性質を調べた。両者の加水分解活性は大きく低下した。転移反応における供与体基質を探索すると、最適供与体はフッ素基質(グルコシル・フルオリド)であった。本供与体を用いて転移反応を調べた結果、初速度は変異体Aが高く、長時間反応による転移糖の生成量は変異体Bが大きいことが判明した。次に、受容体特異性を調べた。変異体Aの特異性は狭く、受容体基質の種類が少なかった。一方、変異体Bは受容体基質の種類が多く、特異性が広いことが判明した。両酵素が生成するオリゴ糖の構造は、親酵素と同じであった。本知見を他の糖質酵素に活用し、触媒アミノ酸の変異体を構築した。弱い転移力を示したので、受容体基質を検討した。特定の受容体に対し転移活性が認められたが、十分な転移量が得られなかった。この理由は、置換した残基-Iが糖転移の受容体サイトを形成するためと考えられた。さらに、もう一方の触媒アミノ酸(残基-II)の置換酵素を作製し、本現象の有無を調べたが、確認できなかった。

(3) 触媒水の供給機構

α -グルコシダーゼに存在する「触媒水の供給孔」を構築する2種のアミノ酸について嵩が大きな残基への置換を行った。すなわち、細孔中央にあるアミノ酸の置換酵素(変異体-Int)と細孔の外部出口部分にあるアミノ酸の置換酵素(変異体-Ext)を構築した。得られた変異体-Intと変異体-Extの触媒能力を調べると、両者ともに加水分解力の低下と転移活性の上昇を示した。従って、細孔の遮断が触媒水の供給を低下させ(加水分解も低下)、転移反応を増加させたと考えられた。一方、転移能を比較すると、変異体-Extが変異体-Intよりも高いことが認められた。細孔中央の変異が触媒部位に影響を与え、特に転移反応における受容体基質の結合サイト(図1)に構造変化が生じたと考えられた。逆に「細孔の外部出口部分」の変異は、活性部位構造に与える変化が少ないことを意味する。

(4) 多糖合成酵素のC末端削除体

C末端領域にあるオリゴ糖の合成増加と多

糖合成の低下に関わる構造因子を知るため、C末端側から徐々に配列を削除した変異酵素を作製した。それぞれの削除体が示すオリゴ糖や多糖の合成活性から、構造因子が存在する領域を推定すると、複数の構造因子が存在する結果が得られた。候補領域に残基置換を導入することで、2アミノ酸(2箇所)の構造因子を決定できた。一方、削除実験の結果から「C末端領域」と「それ以外の部位」に新たな構造因子が存在する可能性が示された。

<引用文献>

- ① Teruo Nakakuki, Present status and future prospects of functional oligosaccharide development in Japan, *Journal of Applied Glycoscience*, Vol 52, 2005, 267-271.
- ② Takayoshi Tagami, Keitaro Yamashita, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Min Yao, Atsuo Kimura, Molecular basis for the recognition of long-chain substrates by plant α -glucosidase, *Journal of Biological Chemistry*, Vol 288, No. 26, 2013, 19296-19303.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計12件)

- ① Masayuki Okuyama, Kana Matsunaga, Kenichi Watanabe, Keitaro Yamashita, Takayoshi Tagami, Asako Kikuchi, Min Ma, Patcharapa Klahan, Haruhide Mori, Min Yao, Atsuo Kimura, Efficient synthesis of α -galactosyl oligosaccharides using a mutant *Bacteroides thetaiotaomicron* retaining α -galactosidase (BtGH97b), *The FEBS Journal*, 査読有, Vol. 284, No. 5, 2017, 766-783.
DOI:10.1111/febs.14018
- ② Takayoshi Tagami, Eri Miyano, Juri Sadahiro, Masayuki Okuyama, Tomohito Iwasaki, Atsuo Kimura, Two novel glycoside hydrolases responsible for the catabolism of cyclobis-(1 \rightarrow 6)- α -nigerosyl, *The Journal of Biological Chemistry*, 査読有, Vol. 291, No. 32, 2016, 16438-16447.
DOI:10.1074/jbc.M116.727305
- ③ Masayuki Okuyama, Wataru Saburi, Haruhide Mori, Atsuo Kimura, α -Glucosidases and α -1,4-glucan lyases: structures, functions, and physiological actions, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 査読有, Vol. 73, No. 14, 2016, 2727-2751.
DOI:10.1007/s00018-016-2247-5
- ④ Wataru Saburi, Hiroaki Rachi-Otsuka, Hiro-nori Hondoh, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Atsuo Kimura, Complete Conversion of specificity of a glycoside hydrolase family 13 exo-glucosidase for glucosidic linkage through rational mutations, *FEBS Letters*, 査読有, Vol.

589, 2015, 865-869.

DOI:10.1016/j.febslet.2015.02.023

- ⑤ Juri Sadahiro, Haruhide Mori, Wataru Saburi, Masayuki Okuyama, Atsuo Kimura, Identity of the two dextran dextrinases produced by *Gluconobacter oxydans* ATCC 11894 and its localization change depending on the cell growth, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, Vol. 456, 2014, 500-505.
DOI:10.1016/j.bbrc.2014.11.115
- ⑥ Weeranuch Lang, Sarote Sirisansaneeyakul, Ligia O Martins, Lukana Ngiwsara, Nobuo Sakairi, Wasu Pathom-aree, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Atsuo Kimura, Different molecular complexity of linear isomaltomegalosaccharides and β -cyclodextrin for enhancing a solubility of azo ethyl red: towards the dye biodegradation, *Bioresource Technology*, 査読有, Vol. 169, 2016, 518-524.
DOI:10.1016/j.biortech.2014.07.025

[学会発表] (計18件)

- ① Min Ma, Masayuki Okuyama, Megumi Sato, Takayoshi Tagami, Haruhide Mori, Atsuo Kimura, Structure element to regulate transglucosidation specificity of *Aspergillus niger* α -glucosidase, The Sixth Symposium on the Alpha-Amylase Family, September 11-15 2016, Smolenice (Slovakia).
- ② Atsuo Kimura, Novel single- or double-anchor-type isomaltomegalosaccharide, which enables to solubilize BCS-II compounds, International Symposium: Current Issues in Food Chemistry and Biotechnology, August 1 2016, Pyeongchang (Korea). (基調講演)
- ③ Min Ma, Takayoshi Tagami, Masayuki Okuyama, Atsuo Kimura, Purification and characterization of α -1,3-glucosidase from *Aspergillus niger*, 2016 International Carbohydrate Symposium, July 17-22 2016, New Orleans (USA).
- ④ 木村淳夫, 直鎖のアンカー型イソマルトメガロ糖: 生産・機能・応用, 日本農芸化学会2015年度大会・大会シンポジウム (新たな機能性糖質、アンカー型イソマルトメガロ糖の生産と特性), 平成28年3月29日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市). (招待講演)
- ⑤ Atsuo Kimura, Improved production of megalosaccharides, namely linear isomaltomegalosaccharides, and their function, 30th Anniversary Fall Meeting and International Symposium of The Korean Society for Biotechnology

and Bioengineering, October 12 2015, Incheon (Korea). (招待講演)

- ⑥ Yuya Kumagai, Juri Sadahiro, Weeranuch Lang, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Satoshi Ishizuka, Hiroshi Hara, Young-Min Kim, Doman Kim, Atsuo Kimura, Molecular mechanism of novel megalosaccharide-producing enzyme and its application, 13th China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering. November 16-20 2014, Jeju (Korea).

[図書] (計1件)

- ① Atsuo Kimura, Masayuki Okuyama, Shoukadoh Book Sellers, Application of Microbiology and Biochemistry in "Frontiers of Agricultural Science", 2015, pp. 161-171.

[その他]

- (1) ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/rfoa/abs/abs2-3.html>

- (2) アウトリーチ活動情報

- ① 奥山正幸、木村淳夫：平成27年度研究室訪問（北海道札幌西高等学校）
② 奥山正幸、木村淳夫：平成28年度環境教育講座（北海道札幌藻岩高校）
③ 奥山正幸、木村淳夫：平成27年度スーパーサイエンスハイスクール事業（北海道旭川西高等学校）
④ 奥山正幸、木村淳夫：平成27年度環境教育講座（北海道札幌藻岩高校）
⑤ 奥山正幸、木村淳夫：平成26年度スーパーサイエンスハイスクール事業（北海道旭川西高等学校）
⑥ 奥山正幸、木村淳夫：平成26年度環境教育講座（北海道札幌藻岩高校）

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

木村 淳夫 (KIMURA, Atsuo)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：90186312

- (2) 研究分担者

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

- (3) 連携研究者

なし

- (4) 研究協力者

なし