

令和元年9月9日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07386

研究課題名(和文)機能未知ホスホリラーゼ類似酵素の特性解明と有用糖質合成への応用

研究課題名(英文)Characterization of novel phosphorylases and synthesis of functional carbohydrates

研究代表者

磯野 直人 (ISONO, Naoto)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：70378321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：組換えタンパク質を用いて細菌由来のいくつかの機能未知タンパク質の性質を調べた。これらは数種類の新規酵素を含むホスホリラーゼ(多糖やオリゴ糖の加リン酸分解とその逆反応を可逆的に触媒する酵素)であることが明らかとなった。これらの酵素を利用して、ラミナリオリゴ糖、 $\beta$ -1,3-1,4-グルカンなどの有用糖質を試験管内で合成する方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではこれまでに報告のない複数の新規糖質関連酵素を発見した。この成果は生化学・酵素科学・糖質科学の発展に寄与するものである。また、これらの酵素を用いて、数種類の多糖やオリゴ糖を試験管内合成する新規方法を開発した。酵素合成で得られる糖質は天然物からの抽出物よりも純度が高い利点があり、新しい糖質や既知の有用糖質の実用的合成に役立つ可能性がある。食品・医薬品・化粧品の成分の製造へ応用される可能性があるほか、各糖質の生化学的・生理学的性質の解明や、関連酵素の機能解析に寄与できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined the properties of some function-unknown proteins from bacteria using recombinant proteins. These were phosphorylases (enzymes catalyzing phosphorolysis of oligosaccharides and polysaccharides and the reverse reaction) including novel enzymes. We developed methods to synthesize functional carbohydrates such as laminarioligosaccharides and  $\beta$ -1,3-1,4-glucan using these enzymes.

研究分野：糖質科学

キーワード：ホスホリラーゼ GH94  $\beta$ -1,3-グルカン ラミナリデキストリン  $\beta$ -1,3-1,4-グルカン ゲンチオピオース

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ホスホリラーゼは多糖やオリゴ糖の非還元末端のグリコシド結合を加水分解し、糖 1 リン酸エステルを生成する酵素の総称である。酵素反応が可逆であるため、糖 1 リン酸エステルを基質として多糖やオリゴ糖を合成できることがホスホリラーゼの大きな特徴である。 $\alpha$ -グルコース 1-リン酸 ( $\alpha$ -G1P) などの糖リン酸エステルは容易に調製できるので、有用糖質の実用的な合成が可能である。また、酵素合成で得られる糖質は天然物からの抽出物よりも純度が高い利点がある。しかし、既知のホスホリラーゼの種類はそれほど多くないため、合成できる糖質のバリエーションが限定されている。したがって、新しいホスホリラーゼの発見は、新しい糖質や既知の有用糖質の実用的合成に役立つ可能性がある。

$\beta$ -1,3-グルカンやラミナリオリゴ糖に関連するホスホリラーゼ [ $\beta$ -1,3-(Glc)<sub>n</sub> +  $\alpha$ -G1P  $\rightleftharpoons$   $\beta$ -1,3-(Glc)<sub>n+1</sub> + Pi] は 3 種類知られており、各酵素が作用しやすい糖鎖の重合度が異なる。このうち、ラミナリデキストリンホスホリラーゼ (LDP, EC 2.4.1.30) と  $\beta$ -1,3-グルカンホスホリラーゼ (BGP, 2.4.1.97) については約 40 年前に微細藻類から発見された酵素であるが、研究報告が極めて少なく、詳細な性質や構造はこれまで全く不明であった。研究代表者は黄金色藻 *Ochromonas danica* や土壌細菌 *Paenibacillus polymyxa* の  $\beta$ -1,3-グルカンホスホリラーゼについて詳細な特性解析を行ってきた。また、好冷細菌 *Psychromonas ingrahamii* の機能未知タンパク質 (*O. danica* BGP とのアミノ酸配列類似性は 30 %) が LDP であることを明らかにした。しかし、この LDP は至適温度が低く (20 °C)、失活しやすい特徴があった。糖質加水分解関連酵素はアミノ酸配列の類似性をもとに GH ファミリーとして分類されているが、BGP や LDP は Glycoside hydrolase family (GH) 94 の酵素とのアミノ酸配列類似性が観察された。

### 2. 研究の目的

BGP や LDP と相同性を示すタンパク質の大半は機能が不明である。研究代表者が行った予備的な実験では、BGP と相同性を示す数種類のタンパク質は、 $\beta$ -1,3-グルカンやラミナリオリゴ糖に関連したホスホリラーゼでなかった (機能は未解明)。すなわち、機能未知タンパク質の中には新規反応を触媒する酵素が含まれていることが予想された。そこで、本研究では新規ホスホリラーゼの発見を目標とした。また、研究代表者が発見した LDP は好冷細菌由来のため熱に不安定であった。LDP はラミナリオリゴ糖をはじめとする有用な糖質を合成できる有用な酵素である。本研究では *Psychromonas ingrahamii* LDP と相同性を示す熱安定性に優れた LDP の獲得も目標とした。また、本研究で獲得した酵素や、既知の酵素を利用して、ラミナリオリゴ糖や  $\beta$ -1,3-1,4-グルカンなどの有用糖質や、新規構造の糖質の試験管内合成を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 酵素の調製と機能解析

BGP や LDP と相同性を示す、数種類の機能未知タンパク質を分析の対象とした。また、多糖・オリゴ糖の合成のために使用した。目的タンパク質をコードする遺伝子を PCR で増幅した。PCR 増幅断片を大腸菌発現ベクター (pCold 2 または pET-23a) に連結し、これらを用いて大腸菌 (BL21(DE3) または Rosetta 2(DE3)) を形質転換した。培養した大腸菌を超音波破碎し、ニッケルカラムを用いて目的の酵素を精製した。*Halobacillus halophilus* 由来の GH30 酵素についても同様に調製した。

得られた精製酵素と様々な基質を混合して、加水分解反応・糖質合成反応・加水分解反応を行い、吸光度法・TLC・HPLC などにより基質や生成物の変化を観察した。基質特異性や pH・温度の影響などを調べることで、各酵素の特性を解析した。

#### (2) オリゴ糖・多糖の合成と構造解析

(1) で得た酵素を用いて、グルコース、ラミナリオース、セロビオースなどをアクセプター、糖 1 リン酸エステルをドナーとした反応を行い、 $\beta$ -1,3-グルカン、ラミナリデキストリン、 $\beta$ -1,3-1,4-グルカンなどを合成した。また、GH30 酵素である  $\beta$ -1,6-グルコシダーゼを用いて、グルコースを基質とした縮合反応により、ゲンチオピオースを合成した。

合成した多糖やオリゴ糖は、遠心分離、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、活性炭クロマトグラフィーなどにより精製した。また、GC-MS を用いたメチル化分析、NMR、ESI-MS、HPLC などにより、糖の構造や分子量を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラミナリデキストリンホスホリラーゼの機能解析とラミナリデキストリンの合成

ラミナリデキストリン(ラミナリオリゴ糖)は約 20 個以下のグルコースが  $\beta$ -1,3-グリコシド結合したオリゴ糖である。ラミナリデキストリンにはプレバイオティクスや抗アポトーシスなどの機能があることが報告されているものの、特に重合度 5 以上のラミナリデキストリンの調製は非常に難しいためその性質や利用法はまだ十分には検討されていない。LDP は、ラミナリデキストリンの加リン酸分解とその逆反応(合成反応)を触媒する酵素である。本研究では好熱菌 *Melioribacter roseus* のゲノム中にコードされている機能未知タンパク質が LDP であることを見出した。

本酵素は三糖以上のラミナリオリゴ糖に対する分解活性が高く、ラミナリオースに対する分解活性は低かった。 $\alpha$ -G1P を基質とした合成反応ではグルコース、ラミナリオリゴ糖、ラミナリンのほか、セロピオース、ソホロース、ゲンチオピオース、2-デオキシグルコース、グルコサミンなどをアクセプターとした反応も触媒した。本酵素の至適温度は 55 °C、至適 pH は 7.4、安定温度域は 55 °C 以下であった。

$\alpha$ -G1P(100 mM)とグルコース(0.4–100 mM)を基質として、45 °C で一晚酵素反応を行ったところ、ラミナリオリゴ糖や短鎖の  $\beta$ -1,3-グルカン(重合度 10 以上)が合成された。 $\alpha$ -G1P/グルコースの値が大きくなるにつれて、反応産物の平均鎖長が増加した。また、グルコースとスクロースを基質とした LDP と *Leuconostoc mesenteroides* 由来スクロースホスホリラーゼの同時反応によってもラミナリオリゴ糖や短鎖の  $\beta$ -1,3-グルカンが得られた。

##### (2) $\beta$ -1,3-1,4-グルカンの合成

$\beta$ -1,3-1,4-グルカンは  $\beta$ -1,3-グリコシド結合と  $\beta$ -1,4-グリコシド結合の二種類の結合を持つ多糖であり、水溶性で分岐のないグルカンである。 $\beta$ -1,3-1,4-グルカンは大麦などのイネ科穀物に含まれており、血中コレステロール値の低下や血糖値上昇抑制などの有用な生理活性があることが報告されている。穀物の  $\beta$ -1,3-1,4-グルカンでは、 $\beta$ -1,3-グリコシド結合と  $\beta$ -1,4-グリコシド結合の比率が 1:2 から 1:3 程度と報告されている。植物の  $\beta$ -1,3-1,4-グルカンは構造や分子量が均一でなく、また高純度に精製することは困難であるため、 $\beta$ -1,3-1,4-グルカンの構造と機能の関係についての知見は十分には得られていない。

BGP の合成反応によって形成されるグリコシド結合の様式は必ず  $\beta$ -1,3-結合であるが、アクセプターの認識はそれほど厳密ではなく、ラミナリオリゴ糖だけでなくセロオリゴ糖などをアクセプターとした反応も可能である。また、セロデキストリンホスホリラーゼ(CDP)によって形成されるグリコシド結合の様式は  $\beta$ -1,4-結合であるが、セロオリゴ糖以外にラミナリオリゴ糖などをアクセプターとした反応も触媒する。そこで、BGP と CDP を同時に反応させることによって、水溶性多糖である  $\beta$ -1,3-1,4-グルカンの合成を試みた。

一晚酵素反応を行ったところ、BGP と CDP の濃度比がある範囲内の場合においてのみ、水溶性の多糖が合成された。メチル化分析等を行ったところ、この多糖は  $\beta$ -1,3-1,4-グルカンであることが明らかとなった。

使用酵素の濃度によって  $\beta$ -1,3-1,4-グルカンの  $\beta$ -1,3/1,4 グリコシド比が変化した。グルコースとスクロースを基質とした BGP、CDP、スクロースホスホリラーゼ(EC 2.4.1.7)の同時反応によっても  $\beta$ -1,3-1,4-グルカンが得られた。分子量は 7600 程度、収率は約 90 %であった。このように、ホスホリラーゼを用いて安価な基質から高収率で  $\beta$ -1,3-1,4-グルカンを合成できることが示された。また、天然物と異なる結合比の多糖も調製できることがわかった。

##### (3) $\beta$ -1,6-グルコシダーゼの機能解析とゲンチオピオースの分解・合成

*Halobacillus halophilus* DSM 2266 株由来の GH94 酵素については、様々な基質に対する活性を調べたがいずれにも作用せず、その機能を明らかにすることができなかった。そこで、この GH94 酵素の機能の推定に役立つことを期待して、GH94 酵素遺伝子のすぐ下流にある GH30 サブファミリー 1 の酵素(HhGH30A)の機能を調べた。GH30 には  $\beta$ -グルコシルセラミダーゼ、 $\beta$ -1,6-グルカナーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼなどの糖質加水分解酵素が含まれており、構造によってさらにサブファミリーに分類されている。GH30 サブファミリー 1 に属する酵素は主に動物で調べられており、 $\beta$ -グルコシルセラミダーゼであることが明らかとなっているが、原核生物由来の酵素の機能については報告されてなかった。

基質特異性や生成物の分析を行ったところ、HhGH30A は  $\beta$ -グルコシルセラミダーゼではなく、ゲンチオピオースやプスツラン、ラミナリンの  $\beta$ -1,6-グリコシド結合を非還元末端側から分解してグルコースを生成するアノマー保持型の  $\beta$ -1,6-グルコシダーゼであることが明らかとなった。本酵素はソホロース、ラミナリオリゴ糖、セロオリゴ糖、キシロピオース、 $\alpha$ -グルコ二糖、キトオリゴ糖などに対しては活性を示さなかった。本酵素の至適温度は 50 °C、至適 pH は 6.2、安定温度域は 50°C 以下、安定 pH 域は 5.4–

8.8 であった。

ゲンチオピオースは苦味を呈する二糖である。ゲンチオピオース、ソホロース、ラミナリピオース、セロピオースの混合液に本酵素を加えて反応を行ったところ、ゲンチオピオースのみが分解された。また、高濃度のグルコースに本酵素を加えて長時間反応を行ったところ、縮合反応によりゲンチオピオースが合成された。このように、HhGH30A はゲンチオピオースの選択的分解や合成に有用な酵素であることが示された。

#### (4) その他

*Paenibacillus glucanolyticus* NBRC 15330 株由来の機能未知タンパク質が BGP であることを見出した。本酵素の至適温度は 35°C、至適 pH は 7.5 であった。本研究前に解析を行った *P. polymyxa* の BGP は至適温度が高い(50 °C)にも関わらず、20 °C でも失活が進行するほど熱安定性に劣る酵素であったが、 $\alpha$ -G1P の共存により熱安定性が大幅に向上する特性があった。一方、*P. glucanolyticus* 由来 BGP は  $\alpha$ -G1P の非存在下でも安定な酵素であった。また、この酵素を用いて直鎖  $\beta$ -1,3-グルカン(重合度 30)を合成できることを確認した。

さらに、他の数種類の GH94 酵素が新規ホスホリラーゼであることを発見し、これらの酵素を用いて有用なオリゴ糖や多糖を合成できることを示した。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

磯野直人 (2015) ホスホリラーゼによる多糖の合成. 化学と生物 53: 574-575. [査読有] DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.53.574

[学会発表](計 13 件)

磯野直人, 北村梓, 米倉裕貴:  $\beta$ -1,3-1,4-グルカンの酵素合成, 日本応用糖質科学会 2018 年度大会, 2018 年 9 月 10 日, 秋田県立大学(秋田県秋田市)

寺田真衣, 磯野直人: *Halobacillus halophilus* 由来  $\beta$ -1,6-グルコシダーゼの機能解析, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年 3 月 10 日, 名城大学(愛知県名古屋市)

牛谷健作, 川島大地, 寺田真衣, 磯野直人: 土壌細菌由来  $\beta$ -1,3-グルカンホスホリラーゼ, 日本農芸化学会中部支部第 180 回例会, 2017 年 10 月 7 日, 名古屋大学(愛知県名古屋市)

森晴彦, 伊藤僚哉, 十万真奈, 磯野直人: 細菌ラミナリデキストリンホスホリラーゼの機能解析とラミナリオリゴ/メカロ糖合成, 日本農芸化学会中部支部第 177 回例会(愛知県名古屋市), 2016 年 9 月 24 日, 名古屋大学(愛知県名古屋市)

森晴彦, 磯野直人: *Melioribacter roseus* 由来ラミナリデキストリンホスホリラーゼの機能解析, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 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)

森晴彦, 十万真奈, 近藤桃子, 伊藤僚哉, 磯野直人: 細菌ラミナリデキストリンホスホリラーゼの発見と機能解析, 第 64 回日本応用糖質科学会中部支部講演会, 2016 年 3 月 3 日, 愛知県産業労働センター(愛知県名古屋市)

[その他](計 2 件)

磯野直人: 機能性多糖の酵素合成, 産学官コミュニティシンポ, 2015 年 8 月 28 日, 三重大学(三重県津市)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 勝崎 裕隆  
ローマ字氏名: (KATSUZAKI, Hirotaka)  
所属研究機関名: 三重大学  
部局名: 生物資源学研究科  
職名: 准教授  
研究者番号(8桁): 10262990

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。