

令和元年6月11日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07504

研究課題名(和文) -1,6グルカンの酵素合成と特性解析

研究課題名(英文) Enzymatic synthesis and characterization of beta-1,6-glucan

研究代表者

金野 尚武 (KONNO, NAOTAKE)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：60549880

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)：きのこ類に含まれる -1,6グルカンは免疫活性化機能を持つ。本研究では純粋な -1,6グルカンを人工合成することを目的とした。きのこ類(スエヒロタケおよびウシグソヒトヨタケ)由来の -1,6-グルカナーゼの合成酵素への変換に成功し、フッ化ゲンチオビオースを用いて糖転移活性を行うことができた。酵素反応生成物の分子量をMALDI-TOF MSにて解析したところ5糖、6糖、7糖、8糖、9糖、10糖に相当するピークが得られた。このように、最長で10糖までの糖鎖(-1,6-グルカン)を本酵素反応で合成可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

きのこ類に含まれる -1,6グルカンは免疫活性化機能を持つ。しかしながら、きのこ類からの単離・精製は困難であるため、純粋な -1,6グルカンが得られた例はない。-1,6グルカンは生物の中で真菌類のみが唯一所有する分子あり、ヒトは -1,6グルカンを真菌類を認識する際の目印としている可能性がある。近年、食用きのこの大量栽培が可能になってきたが、消費量は伸び悩んでいる。本研究によって -1,6グルカンを、免疫に關与する新しい機能性食物繊維として提唱できれば、きのこ類に新たな価値を生み出すことができ、きのこ産業の活性化に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Beta-1,6-glucan, a cell wall component of fungi, is known as a bioactive (antitumor) polysaccharide. In this study, the cDNAs encoding Beta-1,6-glucan degrading enzymes (Beta-1,6-glucanases) were cloned from basidiomycetes, and two Beta-1,6-glucanases, Sc30 (from *Schizophyllum commune*) and Cc30 (from *Coprinopsis cinerea*), were heterologously expressed in *Aspergillus oryzae*. Sc30 (57 kDa) and Cc30 (50 kDa) catalyzed depolymerization of Beta-1,6-glucan endolytically, and were highly specific toward Beta-1,6-glucan polysaccharide. The enzymes were most active at pH 5.0. We prepared glycosynthase mutants using the Beta-1,6-glucanases, Sc30 and Cc30. Some prepared Beta-glucan oligosaccharides with various structures showed the immunostimulatory activity on murine macrophage-like cells. It was suggested that these functional oligomers were consisted of Beta-1,6-linkages, and their degree of polymerization were greater than five.

研究分野：生物高分子材料学

キーワード：きのこ グルカン 糖質関連酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) きのかに含まれる β -グルカンの生理機能と関連研究の課題

植物細胞壁の主成分が β -1,4 グルカン (セルロース) であるのに対し、きのか類などの真菌類は β -1,3 および β -1,6 グルカン (β -グルカンと総称) を細胞壁主成分として有している。きのか類 β -グルカンは免疫活性化機能 (抗腫瘍作用) を持つことで注目され、一部は医薬品としてがん治療に利用されている^{1,2)}。しかしながら、生理機能メカニズムについては殆ど明らかになっていない。その理由として、 β -グルカンが複雑かつ不均一な構造を持つ複合体として細胞壁内に存在し、精製が困難であることが挙げられる³⁾。解決策としてモデル材料の人工合成が挙げられるが、その方法は確立されていない。

(2) β -1,6 グルカン構造が免疫活性化機能の鍵

β -1,6 グルカンは真菌類に特有の分子である。きのか類の免疫活性化 β -グルカンの中で、MD フラクションと呼ばれるマイタケ抽出物の主成分は β -1,6 グルカン分子であることが報告されている⁴⁾。これらの知見は β -グルカンの機能性の鍵は『 β -1,6 グルカン構造』であることを示唆した。そこで申請者は、一般的な真菌類とは異なり β -1,3 グルカン構造を殆ど持たず、主に β -1,6 グルカンのみを構造多糖として有している真菌類「イワタケ」から抽出物を調製し分析したところ、免疫活性化機能を示すことを明らかにした。しかし、イワタケは希少生物であり入手は困難である、また、生長が遅く (年間生長 2 mm 程度) 大量培養も望めない。よって、イワタケから大量かつ安定に β -1,6 グルカンを得ることは難しい。一方で、通常真菌類中では、 β -1,6 グルカンは他の成分と複雑な複合体を形成しており、分離は困難である。従って純粋な β -1,6 グルカンが得られた例はなく、分子特性や生理機能は解明されていない。

そこで申請者は、酵素を用いて、純粋な β -1,6 グルカンを人工合成したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、 β -1,6 グルカン合成酵素を獲得し、これらの酵素を用いて β -1,6 グルカンを安定かつ大量に合成する。さらに、 β -1,6 グルカンの分子特性を解明する。申請者は 3 種のきのか由来 β -1,6 グルカナーゼを所有している。グルカナーゼの活性中心に変異を与えると、グルカン分解酵素から合成酵素へ変換できることが報告されている⁵⁾。そこで本手法を用いて β -1,6 グルカナーゼを β -1,6 グルカン合成酵素に変換する。

きのか類の β -グルカンは人体に対して免疫活性化機能を示し、生体内には β -グルカンを認識する結合タンパク質が存在する。実際に SP-D、Dectin1 等のレクチンが β -グルカン結合タンパク質であると予想されている⁶⁾。これらレクチンはその特異性から β -グルカンの構造 (結合様式、高次構造) を厳密に認識していると考えられるが、認識機構と β -グルカン構造の相関は解明されていない。本課題で酵素合成した β -1,6 グルカンを用いることで、生体内の β -1,6 グルカンの生理機能を分析する。

* 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

(1) β -1,6 グルカンの分子特性を明らかにする

-1,6 グルカンは、セルロースや -1,3 グルカンと比べ先行研究が少なく、高次構造、水や有機溶媒への溶解性なども明らかにされていない。一方、 -1,6 グルカンは生物の中で真菌類のみが唯一所有する分子あり、ヒトは β -1,6 グルカンを真菌類を認識する際の『目印』としている可能性がある。本課題では -1,6 グルカンと結合する生体内のタンパク質を特定し、免疫活性化機能を分子レベルで解明する。世界に先駆けて -1,6 グルカンの分子特性を明らかにすることは、糖質科学、高分子化学のみならず免疫学分野の進展にも繋がる。

(2) 林産物由来の新しい機能性材料を生み出す

本研究は、きのこ類の未知の成分であった -1,6 グルカンとその機能に光を当てるものである。近年、食用きのこの大量栽培が可能になってきたが、消費量は伸び悩んでいる。本研究によって β -1,6 グルカンを、免疫に関与する新しい機能性食物繊維として提唱できれば、きのこ類に新たな価値を生み出すことができ、きのこ産業の活性化に繋がる。

3 . 研究の方法

(1) -1,6 グルカナーゼの合成酵素への変換 (研究協力者 : 大学院生 1 名)

本申請者らは既にシイタケから -1,6 グルカナーゼを単離している。また、H25 年度新たに 2 種の β -1,6 グルカナーゼ遺伝子 (ヒトヨタケ、スエヒロタケ由来) をクローニングし、麹菌を用いて異種発現することに成功している (H25 JSPS 特別研究員奨励費)。糖質加水分解酵素の一部で、活性中心に存在する 2 つの酸性アミノ酸のうち、求核剤として働く側の変異体を作成することで合成酵素へ変換できることが報告されている⁵⁾。そこで、類似タンパク質群のマルチアライメントの結果から活性中心残基を予想し、一方がグリシン、アラニン、セリンに置換された変異酵素を麹菌による異種発現系により作成した。市販のフッ化グルコース (フッ化 α -D-グルコピラノシル) と得られた酵素を緩衝液中で反応させ、生成物の有無を薄層クロマトグラフィー (TLC) で確認した。

(2) 変異 -1,6 グルカナーゼによる糖鎖合成 (研究協力者 : 大学院生 1 名)

糖鎖合成活性が確認された変異 -1,6 グルカナーゼについては基質特異性や pH、温度、基質濃度等の影響を調査した。 -1,6 グルカナーゼと親和性が高いゲンチオビオース (-1,6 グルコース 2 糖) を Jünne mann の手法⁶⁾を用いてフッ素化し、 -1,6 グルカンの合成反応の材料として用いた。

(3) -1,6 グルカンの特性解析

反応生成物である β -1,6 グルカンは、TLC および MALDI-TOF-MS 装置を用いて分子量を解析した。生理活性機能については、マウスマクロファージ細胞における TNF 発現の誘導により評価した。

4. 研究成果

β -1,6 グルカン加水分解酵素 (β -1,6 グルカナーゼ) の遺伝子を担子菌類よりクローニングした。2種の β -1,6 グルカナーゼ遺伝子 (ウシグソヒトヨタケ由来 Cc30、スエヒロタケ由来 Sc30) はともに GH ファミリー30 に分類される。GH ファミリー30 に分類される酵素群は2つのグルタミン酸を活性中心に持つ。一方のグルタミン酸が求核剤としてはたらく、分解反応の初段階においてグリコシド結合の1位の炭素に電子を供与することで反応が開始する。糖質加水分解酵素の活性中心残基の置換による合成酵素化では、求核剤としてはたらくアミノ酸残基の置換が必要となる。そこで、マルチアライメントの結果から、Cc30において207番目と302番目、Sc30では225番目と320番目の完全に保存されている2つのグルタミン酸が活性中心残基であると予測した。糖質加水分解酵素の活性中心残基のうち、求核剤として反応する側のアミノ酸を、グリシンなどに置換することで、分解酵素を合成酵素化した例が報告されている。Cc30、Sc30の活性中心と予測された2つのグルタミン酸をそれぞれグリシンに置換した。Cc30についてE207GをCc30Mu1、E302GをCc30Mu2、Sc30についてE225GをSc30Mu1、E320GをSc30Mu2と表記する。それぞれ麹菌に形質転換し、異種発現させた。TALON Metal Affinity Resin とヒスチジンタグを用いた精製で、分子量 52.7 kDa の Cc30Mu1 と分子量 55.0 kDa の Cc30Mu2 を単一バンドになるまで精製することができた。

-glucosyl fluoride を用いた試験では、糖鎖合成反応が進まなかった。野生型酵素の特性解析の結果、酵素が多糖を分解できるのに対し、2糖を分解できなかったことから、変異酵素についても低分子を基質としないと考えられた。

そこで、-1,6-グルカン2糖であるゲンチオピオースの還元末端位にフッ素を付加した α -フッ化ゲンチオピオースを用いて、変異酵素による反応試験を行った。基質濃度を 10 mM にしたときは糖鎖合成が認められなかったが、基質濃度を 20 mM にしたとき、原点に残る高分子のスポットが検出された。

以上のことから、Cc30、Sc30について、活性中心残基のうち求核剤としてはたらくグルタミン酸をグリシンに置換することによる糖質加水分解酵素の合成酵素化が成功した。また、合成酵素と α -フッ化ゲンチオピオースを用いた反応により、多糖とオリゴ糖が合成されたことが示唆された。糖鎖合成反応の最適化を行ったところ、反応溶液における基質濃度と酵素濃度を上げることで、より多くの生成物を得ることができた。一方、最適な反応温度は 20 程度であり、反応温度 40 以上では生成物が得られないことが判明した。

酵素反応生成物の分子量を MALDI-TOF MS にて解析した。5糖、6糖、7糖、8糖、9糖、10糖に相当するピークが得られた。このように、最長で10糖までの糖鎖 (β -1,6-グルカン) を本酵素反応で合成可能であることが示された。また、生成物の構造および免疫賦活機能が異なることが示唆された。

引用文献：1) Chihara et al, *Nature*. 222:687-688 (1969). 2) Xu, et al. *J Biol Chem*. 287:871-878 (2012). 3) Shida et al, *J Biochem*. 90:1093-100 (1981). 4) Masuda et al. *Int. Immunopharmacol*. 9:620-626 (2009). 5) Hrmova et al. *J Biol Chem*. 277:30102-30111 (2002). 6) Jünneemann et al. *Carbohydr Res*. 249:91-94. (1993).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Tanaka Y, Suzuki T, Nakamura L, Nakamura M, Ebihara S, Kurokura T, Iigo M, Dohra H, Habu N, Konno N. (2019). A GH family 28 endo-polygalacturonase from the brown-rot fungus *Fomitopsis palustris*: purification, gene cloning, enzymatic characterization and effects of oxalate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 108-116.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.004>, 査読有

Sakamoto Y, Nakade K, Sato S, Yoshimi A, Sasaki K, Konno N., Abe K. (2018). Cell wall structure of secreted laccase-silenced strain in *Lentinula edodes*. *Fungal Biology*, 122(12), 1192-1200. 10.1016/j.funbio.2018.09.005, 査読有

Tanaka Y, Suzuki T, Kurokura T, Iigo M, Toyama F, Habu N, Dohra H, Konno N. (2017). The complete genome sequence and phylogenetic analysis of the mitochondrial DNA of the wood-decaying fungus *Fomitopsis palustris*, *Genes & Genomics*, 39 (2), 1377–1385. DOI 10.1007/s13258-017-0603-y, 査読有

Sakamoto Y, Nakade K, Sato S, Yoshida K, Miyazaki K, Natsume S, Konno N. (2017). *Lentinula edodes* Genome Survey and Postharvest Transcriptome Analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, 83 (10) e02990-16. doi: 10.1128/AEM.02990-16, 査読有

金野尚武 (2016), きのこと産業への貢献を目指した多糖研究, *Polysaccharide researches for the mushroom industry, Cellulose Communications*, 23(3):121-125, 査読無

〔学会発表〕(計6件)

海老原俊、金野尚武 他、オオウズラタケ由来 -1,3/1,6 グルカナーゼ群の機能解析、第67回日本木材学会大会、2017年3月、福岡

本郷杏里紗、金野尚武 他、-1,6-グルカンオリゴ糖の生理機能解析、第67回日本木材学会大会、2017年3月、福岡

中村 舞、金野尚武 他、-1,6-グルカンの酵素合成、日本きのこ学会第20回大会、2016年9月、静岡

本郷杏里紗、金野尚武 他、-グルカンオリゴ糖の免疫賦活作用、セルロース学会第23回年次大会、2016年7月、つくば

中村 舞、金野尚武 他、きのこ由来の酵素を用いた -1,6-グルカンの酵素合成、第66回日本木材学会大会、2016年3月、名古屋

中村 舞、金野尚武 他、きのこ由来 -1,6-グルカナーゼの特性解析と機能性材料開発への応用、セルロース学会第22回年次大会、2015年7月、札幌

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中村舞

ローマ字氏名：(NAKAMURA, mai)

研究協力者氏名：本郷杏里紗

ローマ字氏名：(HONGO, arisa)