

令和元年6月19日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07688

研究課題名(和文)メタゲノミクスを活用したオリゴ糖合成酵素の網羅的探索及び機能性オリゴ糖の創出

研究課題名(英文) Screening of novel carbohydrate phosphorylase using metagenomics

研究代表者

中井 博之 (NAKAI, Hiroyuki)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00400002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホリラーゼは、無機リン酸存在下で糖質のグリコシド結合を非還元末端側から順次加リン酸分解する酵素である。その反応は可逆的であり、オリゴ糖を効率的に合成することが出来る上、厳密な位置選択性を活かして目的とするオリゴ糖の選択的合成が可能である。しかしながら、合成可能なオリゴ糖の種類はホスホリラーゼの種類に依存する。今後合成可能なオリゴ糖のパリエーション拡大には、新たな反応特異性を示すホスホリラーゼの発見が必須である。そこで本研究では、糖質化性を改変した大腸菌を用いて、新規ホスホリラーゼの探索に特化したメタゲノミクススクリーニング手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内糖質代謝に関与する糖質加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)によるオリゴ糖合成の収率は高く、産業上有用な酵素になり得る。今回新規ホスホリラーゼの探索に特化したメタゲノミクススクリーニング手法を開発できたことで、今後これまで報告例のない新たな基質特異性を有する酵素の発見および合成可能なオリゴ糖のパリエーション拡大が期待される。また、新規ホスホリラーゼの発見は当該酵素が関与する新たな生体内糖質代謝機構の解明にも繋がり、生物学的意義からも学術的に重要な研究となる。

研究成果の概要(英文)：Phosphorylases are exolytic enzymes catalyzing phosphorolysis of particular glycosides to produce sugar 1-phosphate with strict substrate specificity. The reaction is reversible, enabling the practical synthesis of oligosaccharides. However, there is little variation among phosphorylases and this limits their utilization for the production of oligosaccharides. Therefore, it would be beneficial to identify phosphorylases with previously unreported substrate specificities. In this study, we developed a metagenomics screening method specialized for novel phosphorylase using *E. coli* with altered carbohydrate utilization.

研究分野：農学

キーワード：ホスホリラーゼ オリゴ糖

## 1. 研究開始当初の背景

ホスホリラーゼは、無機リン酸存在下で糖質のグリコシド結合を非還元末端側から順次加リン酸分解する酵素である。その反応は可逆的であり、オリゴ糖を効率的に合成することが出来る上、厳密な位置選択性を活かして目的とするオリゴ糖の選択的合成が可能である。しかしながら、合成可能なオリゴ糖の種類はホスホリラーゼの種類に依存する。今後合成可能なオリゴ糖のバリエーション拡大には、新たな反応特異性を示すホスホリラーゼの発見が必須であった。

新規ホスホリラーゼを発見するため、これまで主に系統樹解析や遺伝子クラスター解析などのバイオインフォマティクス的手法を用いて、新規ホスホリラーゼの網羅的探索を行ってきた。その結果、 $\beta$ -1,4 マンノシル N アセチルグルコサミンホスホリラーゼやセロピオン酸ホスホリラーゼのような新規酵素が発見されてきている。しかしながら、既知の遺伝子情報を基にしたバイオインフォマティクス的手法によりスクリーニングされてくるホスホリラーゼは、既知酵素と配列の類似性が高い酵素に限定される。

## 2. 研究の目的

本研究では、新規ホスホリラーゼを発見することに重点を置き、従来の方法とは異なるメタゲノムを活用したスクリーニング法の確立を目指した。メタゲノムとは、「多種多様な微生物が共存する複合微生物系の含有するゲノムの混合体」を意味する用語で、土壌などの環境サンプルから直接的に分離されたゲノム DNA のことである。環境中に生存する 99%以上の微生物は純粋培養できないと推定されており、メタゲノム解析は環境中に存在する膨大な数の未知の遺伝子や微生物を解明する手段として期待されている。本解析手法は主に腸内細菌叢や環境中の微生物群の機能解析を行うために用いられることが多いが、未知の酵素遺伝子や新しい抗生物質などを合成する遺伝子群を獲得するためにも利用されている。これまでにセルラーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、スクロースホスホリラーゼなどといった糖質関連酵素をコードする遺伝子をメタゲノムからスクリーニングした成功例が報告されている。

## 3. 研究の方法

まず環境試料からメタゲノムを抽出し、目的サイズの DNA 断片が多く含まれるメタゲノムについてはその精製方法を検討した。次に環境試料から抽出したメタゲノムを用いて、メタゲノムライブラリーを作製する際の各工程の条件検討を行い、実際にメタゲノムライブラリーを作製した。また、スクリーニングの際に使用する菌株に既知のホスホリラーゼ遺伝子を導入することで、使用菌株の糖 1 リン酸代謝についても確認した。その後、メタゲノム解析によるスクリーニング法の有用性を確認するため、作製したメタゲノムライブラリーから既知のセロピオン酸ホスホリラーゼ遺伝子をスクリーニングした。

## 4. 研究成果

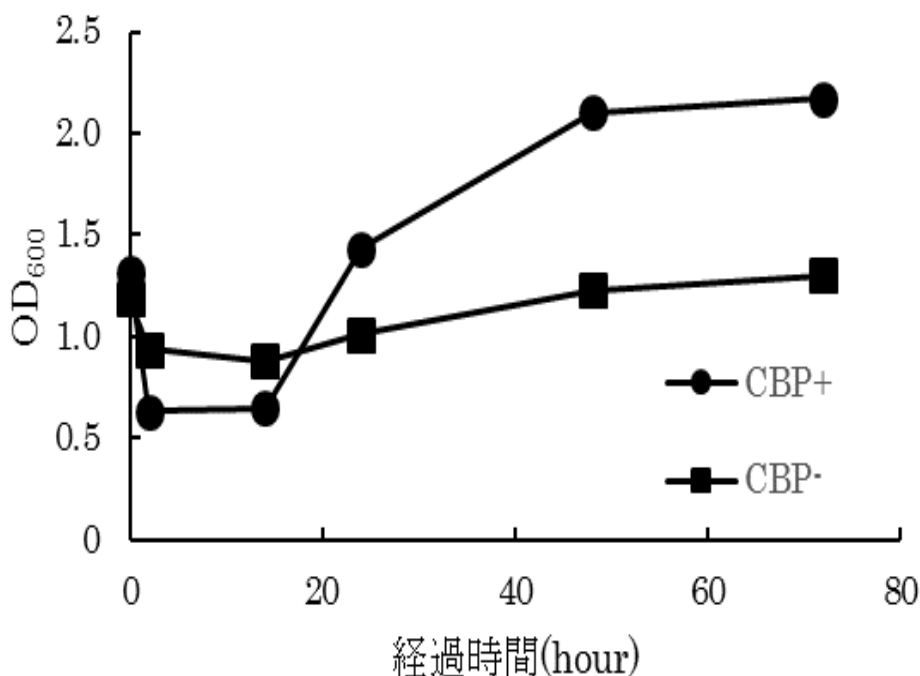
今回、環境試料中から回収したメタゲノム DNA を組み込んだメタゲノムライブラリーを電気穿孔方法により糖 1 リン酸のみ資化する改変大腸菌に導入後、炭素源として目的オリゴ糖のみを含む最小培地で培養し、生育の有無で菌体内でのホスホリラーゼ発現の有無を判別する手法を開発した。

1 つの環境試料由来のメタゲノムあたり  $10^7$  種類のクローンを確保するメタゲノムライブラリーの作製を目指した。まず、環境試料から抽出したメタゲノムを制限酵素処理により適当な大きさに断片化し、電気泳動に供することで目的サイズの DNA をインサートとして取得した。インサートはプラスミドベクター pTV118N とライゲーションし、大腸菌を形質転換した。種々検討の結果、インサート 200 ng、ベクター 200 ng、 $1\times$ LONG Ligation Buffer、DNA Ligase<LONG> 1  $\mu$ l、全量 50  $\mu$ l の条件でライゲーションした DNA を、*E. coli* HST08 Premium Electro-Cells 50  $\mu$ l に加えて形質転換することでメタゲノムライブラリーを作製することとした。本条件下で様々な環境試料から  $10^7$  種類のクローンを含むメタゲノムライブラリーを作製することに成功した。

本研究は新規ホスホリラーゼ遺伝子の発見を目指すものであるため、遺伝子配列の相同性に準拠した方法ではなく、酵素活性に準拠した方法を選択した。ホスホリラーゼによるオリゴ糖の加リン酸分解反応では、生成物として必ず糖 1 リン酸が生じるため、糖 1 リン酸を生成する活性をスクリーニングの指標とした。また、この酵素活性を発現する宿主のみが生育できるようにすることで、活性の検出ではなく生育の有無を判断するだけの効率の良いスクリーニングができるような工夫をした。具体的には、メタゲノムライブラリーを導入する宿主として、単糖の資化が制限されるように改変された大腸菌を使用し、炭素源として単一のオリゴ糖を含む最少培地にて培養することでホスホリラーゼ遺伝子をスクリーニングする。改変大腸菌は  $\alpha$ -グルコース 1-リン酸、 $\beta$ -グルコース 1-リン酸、 $\alpha$ -ガラクトース 1-リン酸の資化能を保持しながら、

グルコース、ガラクトース、キシロースの3つの単糖については、理論上資化できないように設計されている。そのため、炭素源として添加したオリゴ糖を改変大腸菌が菌体内に取り込み、そのオリゴ糖に作用するホスホリラーゼの遺伝子がメタゲノムライブラリー中に存在し、菌体内で発現すれば、オリゴ糖は加リン酸分解されて、対応する糖1リン酸が生じ、生育する。ホスホリラーゼが発現していない菌株や他の糖質加水分解酵素が発現している菌株では、糖1リン酸が生成されないため生育しないと考えられる。

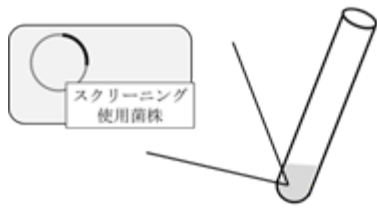
スクリーニングの予備実験として、*Cellvibrio gilvus* ATCC 13127 由来セロビオースホスホリラーゼ (CBP) 遺伝子を pTV118N に組み込んで改変大腸菌に導入し、セロビオース最少培地で培養した。その結果、CBPの有無で生育に顕著な差が認められた(下図)。CBP未導入株は初期 OD600 程度までしか OD600 が上がらないのに対し、CBP導入株は初期 OD600 を大きく上回り生育した。菌体内に取り込まれたセロビオースが CBPにより加リン酸分解され、生じた $\alpha$ -グルコース1-リン酸を資化して生育したと考えられる。



セロビオース最少培地における増殖曲線

次に、作製したメタゲノムライブラリーを改変大腸菌に導入し、セロビオースの最少培地で培養することで CBP 遺伝子のスクリーニングを行った。OD600 が上がった菌体群からコロニーを単離し、インサートの塩基配列を解析したところ、既知の性質決定されている CBP (*Ruminiclostridium thermocellum* および *Thermotoga neapolitana* の CBP) とアミノ酸配列上同一性 (それぞれ 75 %、65 %) を示す遺伝子の存在が確認された。また改変大腸菌を用いた本スクリーニング法においては、目的のホスホリラーゼ以外に改変大腸菌を作製する際に欠損させた遺伝子がスクリーニングされる可能性が示唆された。スクリーニング精度を向上させるため、メタゲノム由来の遺伝子を導入した形質転換体の生育状況の確認の他、培養上清の糖組成の確認、抽出プラスミドの RFLP によるインサート確認、粗酵素の活性確認などを適宜組み合わせる必要があると考えられる。

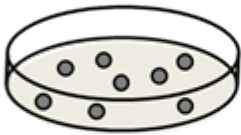
今回、糖1リン酸のみを資化するように改変された大腸菌を用いて、ホスホリラーゼに特化した新たなスクリーニング法を構築した。本スクリーニング法の概要を下図として示す。今回、実際にメタゲノムライブラリーからセロビオースホスホリラーゼホモログをスクリーニングすることができたことから、本スクリーニング法の有用性が示された。今後、本スクリーニング法を用いて、メタゲノムから新規なホスホリラーゼ遺伝子を発見することが期待される。



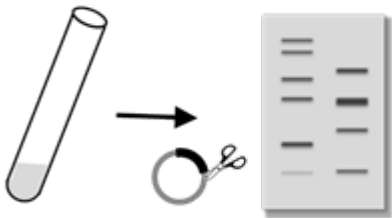
メタゲノムライブラリーを改変大腸菌に導入して最少培地で培養する。



OD<sub>600</sub> が上昇した菌体群を最少培地に植え継ぎ、培養する。



寒天培地にてコロニーを単離する。

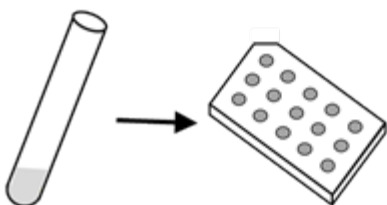


シングルコロニーを液体培地で培養する。

菌体からプラスミドを抽出し、RFLPによりインサートの有無を確認する。



インサートを確認したプラスミドについて、塩基配列を解析する。



液体培地に植え継ぎ、得られたホスホリラーゼの反応特性を解析する。

ホスホリラーゼに特化した新たなスクリーニング法の流れ

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

中井博之、機能性オリゴ糖の創出を目指したオリゴ糖ライブラリーの構築、日本農芸化学会2018年度大会シンポジウム(名古屋大学, 名古屋, 2018.3.18)

〔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〕

無し

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

無し

(2)研究協力者

無し

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。