

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07708

研究課題名(和文) セミドライ反応系での  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ転移反応の検討とニゲロオリゴ糖生産研究課題名(英文) Transglycosylation activity of  $\alpha$ -1,3-glucanase AgI-KA under semi-dry condition

研究代表者

矢野 成和 (YANO, Shigekazu)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：50411228

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)：Bacillus circulans KA-304由来  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼAgI-KAは、 $\alpha$ -1,3-グルカンを加水分解する。本研究では、低含水条件下におけるAgI-KAの転移反応を調べた。その結果、AgI-KAとニゲロオリゴ糖の凍結乾燥標品を湿度80%で保持すると、転移活性が確認できた。また、転移反応の指摘pHは10付近であった。

本研究では、AgI-KAの触媒ドメインのX線結晶構造解析も行った。本触媒ドメインは、ガラクトース結合性レクチン様領域とヘリックス領域から構成されており、触媒必須アミノ酸である1067、1090、1091番目のアスパラギン酸が基質結合クレフト中に存在した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を行うことで、新規のニゲロオリゴ糖生産法を示した。低含水状態、あるいは高濃度基質存在下で  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの転移反応が進行したことから、様々な加水分解酵素でも同様の条件下で転移反応が進行する可能性がある。この技術は、新規のオリゴ糖、配糖体やペプチドの合成を可能にするので、食品業界に広く普及する。セミドライでの転移反応は、乾燥食品中でも起きている可能性があり、乾燥食品の味の秘密を解き明かすのに役立つと考えている。

また、本研究では、 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ触媒ドメインの結晶構造を明らかにした。本結果をもとに、産業利用に適した改変型  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの作製も期待できる。

研究成果の概要(英文)：  $\alpha$ -1,3-Glucanase AgI-KA from Bacillus circulans KA-304 hydrolyzes the  $\alpha$ -1,3-glucoside linkages in  $\alpha$ -1,3-glucan. In this study, we investigated transglycosylation activity of AgI-KA under a low water content. Lyophilized AgI-KA and nigero-oligosaccharides were stored at 80% humidity. After incubation, transglycosylation activity was confirmed, and the optimum pH of the transferring reaction was 10.

We also analyzed molecular structure of the catalytic domain of AgI-KA. The structure was determined using X-ray crystallography. The catalytic unit consists of a complex structure of two tandemly connected regions, the N-terminal galactose-binding-like region and the C-terminal right-handed  $\alpha$ -helix region. Biochemical assays have found that Asp1067, Asp1090, and Asp1091 are important for catalysis, and these residues indeed locate to the putative substrate binding cleft, which forms a closed end and explains the product specificity.

研究分野：応用微生物学

キーワード： $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ 転移反応 ニゲロオリゴ糖 結晶構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

$\alpha$ -1,3-グルコシド結合を有するニゲロオリゴ糖は、酒や味醂のコク味に関わる機能性オリゴ糖である。ニゲロオリゴ糖の生産法としては、マルトオリゴ糖を基質として  $\alpha$ -グルコシダーゼの転移反応を利用した方法<sup>(1)</sup>、あるいはニゲロースホスホリラーゼを用いたグルコース-1-リン酸からの生産法が知られている<sup>(2)</sup>。

上記のニゲロオリゴ糖生産法の他に、 $\alpha$ -1,3-グルカンを基質とした  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの加水分解を用いた方法が挙げられる。*Bacillus circulans* KA-304 の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ Agl-KA は、 $\alpha$ -1,3-グルカンを加水分解して 2~4 糖のニゲロオリゴ糖を生産できる。申請者は、より長鎖のニゲロオリゴ糖の生産を目指して、Agl-KA の転移反応を調べた。各種検討の結果、ニゲロオリゴ糖と Agl-KA からなる乾燥標品が吸湿する程度のわずかな水分子を得ることで転移反応が起こることを見出した。

これらの結果より、Agl-KA の転移反応は、水分子が極めて少ない状況下で酵素分子に対して圧倒的に多い基質分子が存在している場合に、触媒サイトにおいて生成物のアクセプターとなる水分子の代わりにオリゴ糖が存在すること、で進行すると考えられる。このように予測する転移反応を制御できれば、さらに長鎖のニゲロオリゴ糖が生産できると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、セミドライ状態での転移反応を解析することで、新規オリゴマー生産技術の基礎を築くため。以下の 2 項目を目的とする。

(1)  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ Agl-KA の転移反応条件を明らかにするために、吸湿と加湿の条件を検討し、最適な酵素の量を調べ、転移反応を促進させる添加剤をスクリーニングする。これらの検討を行い、セミドライ状態で進行する  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ転移反応の基本的な反応条件を解明し、ニゲロペンタオース、ニゲロヘキサオース、さらに長鎖のニゲロオリゴ糖合成法を確立する。

(2)  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの反応機構を解明するために、 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの中から転移活性の優れた酵素を探す。また、Agl-KA の変異酵素を作製し、触媒必須アミノ酸の解析と X 線結晶構造解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ Agl-KA と Agl $\Delta$ DCD-UCD の調製

Agl-KA は、pET ベクター系を用いて *Escherichia coli* Rosseta-gami B (DE3) で発現させた。Agl-KA は、Discoidin ドメイン I (DS1)、Carbohydrate binding Module 35 型ドメイン (CB35)、Discoidin ドメイン II (DS2)、機能未知ドメイン (UCD)、触媒ドメインから構成されており、触媒ドメインのみからなる欠失酵素 Agl $\Delta$ DCD-UCD も *E. coli* Rosseta-gami B (DE3) で発現させた。Agl $\Delta$ DCD-UCD に部位特異的変異導入した各種変異酵素も同様に発現させた。これら酵素は、陰イオン交換クロマトグラフィーと疎水クロマトグラフィーによって、単一に精製した。

#### (2) $\alpha$ -1,3-グルカンとニゲロオリゴ糖の調製

*Streptococcus mutans* 由来の GTF-I 遺伝子を大腸菌で発現させた。酵素を発現させた大腸菌の無細胞抽出液を酵素標品とし、20%スクロースを含む 50 mM カリウムリン酸緩衝液に加え、室温で静置した。沈殿物を純水で数回洗浄した後、アルカリ可溶化処理とアルコール沈殿を行ったものを  $\alpha$ -1,3-グルカンとした。ニゲロオリゴ糖 (2 - 4 糖の混合物) は、 $\alpha$ -1,3-グルカンを Agl-KA で加水分解することで得た。

#### (3) Agl-KA の転移反応

ニゲロオリゴ糖、緩衝液と  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの混合液を凍結乾燥した。凍結乾燥物を温度と湿度を一定値に保った恒温加湿器内で静置して吸湿させた。

#### (4) Agl $\Delta$ DCD-UCD の結晶化

結晶化プレートのウェル上に母液を 500  $\mu$ l になるよう調製し、カバーガラス上で調製した母液と結晶化用に調製した Agl $\Delta$ DCD-UCD を静かに混合した。ウェル上にカバーガラスをかぶせて密封し、静置した。得られた結晶について、X 線結晶構造解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 転移反応条件の検討

##### 酵素・基質凍結乾燥標品の吸湿条件の検討

Agl-KA あるいは Agl $\Delta$ DCD-UCD とニゲロオリゴ糖水溶液を混合し、凍結乾燥を行うことで酵素・基質凍結乾燥標品を調製した。酵素・基質凍結乾燥標品に対する加湿条件を検討するため、恒温恒湿器の温度を 30°C に固定し、湿度を 60-80% に変化させた。その結果、湿度 60% ではどちらの酵素も反応が全く進行しなかった。65% に設定した場合、Agl-KA は 4 糖の加水分解が進行し、2 糖を主として 3 糖と 4 糖が確認できた。また、Agl $\Delta$ DCD-UCD は、加水分解が進行して、2 糖とグルコースが蓄積した。湿度を 70-80% と上昇させた結果、Agl-KA と Agl $\Delta$ DCD-UCD の両方でわずかに転移反応が起こった。

次に、吸湿した際の pH を変化させる目的で、凍結乾燥する前の Agl-KA とニゲロオリゴ糖の混合液に各種緩衝液を添加して凍結乾燥を行った。その結果、緩衝液 pH が 10 付近で、転移反応が進行しや

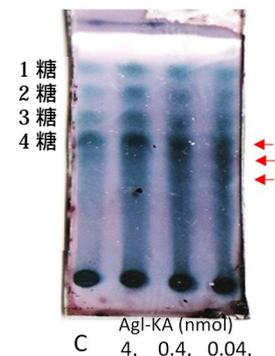


図 1 吸湿時の pH と Agl-KA 濃度の影響

すい傾向にあった。図 1 は、凍結乾燥前に反応液 pH を 10 に調製し、酵素添加量を 0.04, 0.4, 4 nmol にして 5 日間吸湿させた結果である。矢印で示すように酵素濃度が低ければ、ニゲロテトラオースが減少して長鎖のオリゴ糖が生成した。

#### 低含水条件下での転移反応

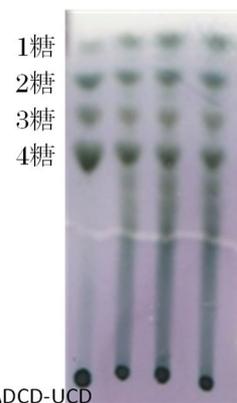
高濃度 (10%) のニゲロオリゴ糖を含む条件下で転移反応を検討した。なお、酵素は触媒ドメインのみからなる変異酵素 Agl ΔDCD-UCD を用いた。

ニゲロオリゴ糖と Agl ΔDCD-UCD を含む反応液に水溶性の優れたエチレングリコール、グリセロールを 45-90% (v/v) になるように添加して反応を試みた。しかしながら、転移反応を確認することができなかった。

次に、各種 pH 条件で活性を調べた結果、pH 10 付近で転移反応が進行しやすく、4 糖以上の長鎖オリゴ糖が生成していた (図 2)。

以上のように、酵素・基質凍結乾燥標品を吸湿させることによる転移反応と高濃度基質を含む反応液を用いた転移反応を調べた結果、どちらの条件下でも反応 pH を 10 程度に高めることで、転移反応が進行することが明らかになった。

反応時間: 3日



Agl-ΔDCD-UCD (nmol/ml) 0, 4, 0.4, 0.04

図 2 高濃度基質存在下での転移反応

#### (2) α-1,3-グルカナーゼ Agl-KA の反応機構解明

##### 触媒必須アミノ酸の解析

Agl-KA の触媒必須アミノ酸を明らかにするため、アミノ酸のカルボキシル基を化学修飾できる 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド (EDC) を触媒ドメインのみから構成される AglΔDCD-UCD に作用させた。EDC 添加量と反応時間を変化させて実験したところ、EDC 添加量と反応時間が増加するにつれて AglΔDCD-UCD の活性は低下した。本結果からアミノ酸側鎖のカルボキシ基が加水分解反応に関与すると考え、AglΔDCD-UCD に含まれるアスパラギン酸とグルタミン酸残基をアラニンに置換した変異酵素を作製して加水分解活性を比較した。表 1 に示すように、D737、D739、D853、D884、D1067、D1090、D1091、E763、E854、E889、E1032 の 11 アミノ酸をそれぞれアラニンに置換した酵素を用いて、加水分解活性を測定したところ、D737、D739、D853、D884、E854、E1032 をアラニンに置換した変異酵素は、活性を 80-100% 保持し、E763 と E889 をアラニンに置換した変異酵素はおおよそ 30% の活性を保持した。一方、D1067、D1090、と D1091 をアラニンに置換した変異酵素は活性を失った。D1067、D1090、と D1091 をアラニンに置換した変異酵素の CD スペクトルを測定した結果、AglΔDCD-UCD のスペクトルとほとんど一致したことから、部位特異的変異導入は立体構造に影響を及ぼさないことが示された。

表 1 変異導入酵素の加水分解活性

Mutation sites	Relative activity (%)
Wild type (AglΔDCD-UCD)	100.0
D737A	88.8
D739A	100.3
E763A	28.8
D853A	80.8
E854A	92.4
D884A	80.4
E889A	39.4
E1032A	96.3
D1067A	n.d.
D1090A	n.d.
D1091A	n.d.

##### X 線結晶構造解析

ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて AglΔDCD-UCD の結晶条件を検討した。ポリエチレングリコール (PEG) の濃度、金属イオン濃度、緩衝液について検討した結果、PEG6000 が 10%-13%、10 mM ZnSO<sub>4</sub> と 0.1 M HEPES pH 8.5 の条件で結晶が得られた。得られた結晶の位相は、セレノメチル化酵素を用いて行った。AglΔDCD-UCD の結晶構造は、到達分解能 1.82 Å で決定した (図 3)。

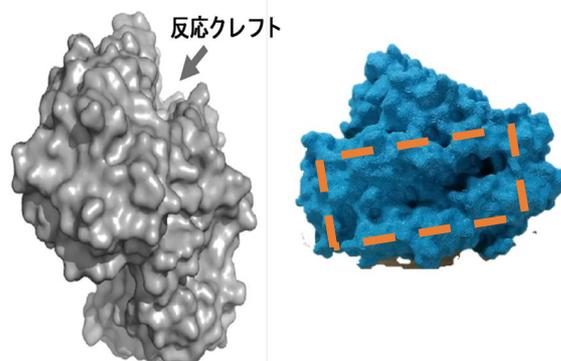


図 3 Agl-KA 触媒ドメインの立体構造モデル

得られた立体構造を解析した結果、触媒ドメインの N 末端の約 180 アミノ酸がガラクトース結合性レクチン様ドメインからなり、C 末端 400 アミノ酸が  $\beta$  ヘリックスを構成していた。ドッキングシミュレーションを行ったところ、酵素の変異解析から明らかになった触媒必須アミノ酸である 1067、1090、1091 番目のアスパラギン酸が位置する部位にニゲロースが結合すると予測された。

$\alpha$ -1,3-グルカナーゼは、ニゲロオリゴ糖生産に応用できるだけでなく、歯垢除去や病原性カビの防除にも利用できる酵素として期待されている。X 線結晶構造解析によって明らかになった  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの構造をもとに、様々な分野で利用できる変異酵素の作製が期待できる。

#### 参考文献

- (1) Konishi Y., Shindo K. Production of Nigerose, Nigerosyl Glucose, and Nigerosyl Maltose by *Acremonium* sp. S4G13. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 439-442, (1977)
- (2) Nihira T., Nakai H., Chiku K., Kitaoka M., Discovery of nigerose phosphorylase from *Clostridium phytofermentans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 1513-1522, (2012)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yano Shigekazu, Suyotha Wasana, Zanma Sumika, Konno Hiroyuki, Cherdvorapong Vipavee, Wakayama Mamoru	4. 巻 64
2. 論文標題 Deletion of uncharacterized domain from $\alpha$ -1,3-glucanase of <i>Bacillus circulans</i> KA-304 enhances heterologous enzyme production in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 212 ~ 220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2017.12.005	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 該当する

1. 著者名 Yano Shigekazu, Suyotha Wasana, Oguro Natsuki, Matsui Takashi, Shiga Shota, Itoh Takafumi, Hibi Takao, Tanaka Yoshikazu, Wakayama Mamoru, Makabe Koki	4. 巻 9
2. 論文標題 Crystal structure of the catalytic unit of GH 87-type $\alpha$ -1,3-glucanase AgI-KA from <i>Bacillus circulans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-019-51822-5">https://doi.org/10.1038/s41598-019-51822-5</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Itoh Takafumi, Intuy Rattanaporn, Suyotha Wasana, Hayashi Junji, Yano Shigekazu, Makabe Koki, Wakayama Mamoru, Hibi Takao	4. 巻 -
2. 論文標題 Structural insights into substrate recognition and catalysis by glycoside hydrolase family 87 $\alpha$ -1,3 glucanase from <i>Paenibacillus glycanilyticus</i> FH11	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15161	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢野成和, 玉木友理, 小黒夏樹, 今野博行, 若山 守
2. 発表標題 細菌型 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼを用いたニグロオリゴ糖生産
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 矢野 成和
2. 発表標題 真菌細胞壁溶解に寄与する細菌型 -1,3-グルカナーゼの特性
3. 学会等名 第31回日本キチン・キトサン学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石黒奈緒子，矢野成和，大塚 唯，上地敬子，平良東紀
2. 発表標題 Bacillus circulans KA-304 由来 -1,3-グルカナーゼを用いたオリゴ糖生産条件の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019 年度西日本・中四国支部合同沖縄大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石嶺悠悟，津波古遥奈，高島智也，矢野成和，上地敬子，平良東紀
2. 発表標題 Paenibacillus sp. 14B 株由来 -1,3-グルカナーゼの諸性質と抗真菌活
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019 年度西日本・中四国支部合同沖縄大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚 唯，矢野成和，伊藤貴文，日比隆雄，田中良和，若山 守，真壁幸樹
2. 発表標題 Bacillus circulans KA-304 由来 -1,3-グルカナーゼの 機能解析と構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Intuy Rattanaporn, 伊藤貴文, スヨタワサナ, 林 順司, 矢野成和, 真壁幸樹, 豊竹洋佑, 若山 守, 日比隆雄
2. 発表標題 Paenibacillus glycanilyticus FH11 由来 -1,3-グルカナーゼ触媒ドメインの反応機構と結晶化
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020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
研究 分 担 者	今野 博行  (Konno Hiroyuki)  (50325247)	山形大学・大学院理工学研究科・教授    (11501)	