

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07727

研究課題名(和文) マルトトリオシル配糖体合成酵素における糖転移反応の分子基盤と応用展開

研究課題名(英文) Molecular basis and development of transglycosylation reaction of maltotriose-forming amylase

研究代表者

炭谷 順一 (Sumitani, Jun-ichi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：10264813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Kitasatospora sp. MK-1785株由来マルトトリオース(G3)生成アミラーゼは、澱粉を三糖(G3)単位で加水分解する反応と、G3を水酸基含有化合物に転移させる糖転移反応を触媒する酵素である。糖転移活性が増強された変異酵素L191Rを用いたX線結晶構造解析と酵素化学的解析から、L191Rの変異部位の基質認識に果たす役割を解明し、糖転移反応に重要なF258-G260ループを同定することに成功した。また、肥満や糖尿病予防に有用なアミラーゼ阻害活性を有するグリセロールG3配糖体とプロビタミンとしての安定性を高めたアスコルビン酸G3配糖体を酵素合成し、各種機器分析にて構造を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

配糖体化は化合物の構造を修飾するための重要な方法のひとつであり、様々な化合物の溶解性、安定性、吸収性および味質などを改善するために用いられている。従来、単糖を転移する配糖化が行われてきたが、本研究ではこれまでにない特定の三糖を転移することが可能なアミラーゼの糖転移反応の分子機構について明らかにすることで、加水分解酵素の加水分解反応と糖転移反応の分水嶺となる分子機構を解明することを目標としている。また合成された三糖配糖体は単糖よりも溶解性や安定性が高まるだけでなく、新たな機能性を付与することが可能となり、産業上極めて有用である。

研究成果の概要(英文)：Maltotriose-forming amylase from Kitasatospora sp. MK-1785 catalyzes hydrolysis reaction releasing maltotriose unit from non-reducing end of starch and transglycosylation reaction transferring maltotriose to hydroxyl group of compounds such as sugars and alcohols. We clarified the role of R191 for substrate recognition and identified F258-G260 loop as important residues for transglycosylation reaction, using X-ray crystal structure analysis and biochemical analyses of L191R enhanced transglycosylation activity. Moreover, we succeeded to synthesize maltotriosyl glycerol as a prophylactic drug for obesity and diabetes and ascorbate 2-maltotrioside as a stabilized provitamin.

研究分野：応用微生物学

キーワード：アミラーゼ 配糖体 糖転移反応 マルトトリオース

### 1. 研究開始当初の背景

天然には様々な生理活性を持つ化合物が数多く知られているが、その化合物が強いにおいや刺激を持つこと、水溶性や安定性に乏しいことによって、その利用が限定されている。食品や化粧品、医薬品への有効利用を考える上で、そのような望ましくない物性を改変することは重要である。配糖体化は化合物の構造を修飾するための重要な方法のひとつであり、様々な化合物の溶解性、安定性、吸収性および味質などが改変されることが知られている。従来、配糖体化反応を触媒する酵素として糖スクレオチドを基質とするグリコシル転移酵素、及び糖転移活性が高い加水分解酵素が用いられてきたが、何れもアグリコン (糖受容体) に単糖を転移する酵素であった。例外として、サイクロデキストリン合成酵素 (CGTase) がマルトオリゴ糖を転移することは知られているが、得られる配糖体は単糖配糖体とオリゴ糖配糖体の混合物であり、これまで特定重合度のオリゴ糖を転移する配糖体化酵素は知られていない。

我々は特定重合度のマルトオリゴ糖生産を目的として、土壌からマルトトリオース (G3) を特異的に生成する酵素 (G3Amy) を生産する放線菌 *Kitasatospora* sp. MK-1785 株を単離した<sup>1)</sup>。G3Amy の諸性質を調べた結果、G3Amy は糖転移活性が極めて高く、加水分解と転移反応が同時進行することがわかった (図 1)。また糖転移反応のアグリコン特異性を調べた結果、糖類だけでなく水酸基を有する広範囲の化合物に G3 を転移することがわかった (表 1)。さらに遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主として生産した G3Amy の結晶化に成功し、X線結晶解析によって解像度 1.8 Å にて G3Amy 触媒ドメインの立体構造をアポ型と基質複合体両者において決定した。また、サブサイト親和力を測定したところ、図に示すとおり G3Amy はサブサイト-3 における親和力が最大となり、このことが G3 生成特異性に大きく寄与していることが伺われた。そこで、この結果を裏付けるために、立体構造解析から推定されたサブサイト-3 において基質と相互作用していると考えられる N134, Q192 に変異を導入した (図 2)。その結果 G3 生成特異性が消失し、通常のランダム型に切断する酵素に変換され、G3 生成特異性に関する分子機構を明らかにすることに成功した。また、糖転移活性を増大すべく活性残基近辺の 12 箇所のアミノ酸に変異を導入した合計 116 種類の部位特異的変異酵素を作製しスクリーニングした結果、加水分解活性が低下し糖転移活性が上昇した変異酵素 (L191R) の取得にも成功した (図 3)。

### 2. 研究の目的

本研究では、X線結晶解析や NMR を用いた構造生物学的アプローチと変異酵素を用いた酵素化学的アプローチを組み合わせ、本酵素の基質認識や糖転移に関する分子基盤を解明することを目的とする。また、その成果を基にして、糖転移活性をさらに高め、また糖受容体特異性を改変することで目的のアグリコンに応じた G3 配糖体合成酵素を創製し、特異な生理活性を有する G3 配糖体の酵素合成に応用することを目指す。

特に、糖転移活性が上昇した変異酵素 L191R に着目し、糖転移活性が上昇した構造基盤と作用機序を明らかにすることで、糖質加水分解酵素の加水分解活性と糖転移活性を別つ分子機構について知見を得ることを試みる。

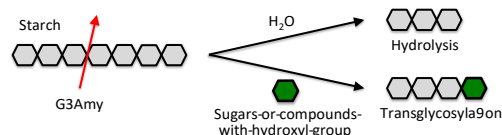


図1 G3Amy の加水分解とマルトトリオース転移反応

表1 G3Amy の糖転移反応における糖受容体特異性

Acceptor		Acceptor	
Methanol	+	Hydroquinone	+
Ethanol	+	Kojic acid	+
1-Butanol	+	Caffeic acid	+
2-Butanol	+	Protocatechuic acid	+
1-Heptanol	+	p-Nitrophenol	+
1-Octanol	+	Ferulic acid	+
Benzyl alcohol	+	Vanillin	+
Glycerol	+	(+)Catechin	+
Xylitol	+	Resveratrol	+
Mannitol	+	Ascorbic acid	+

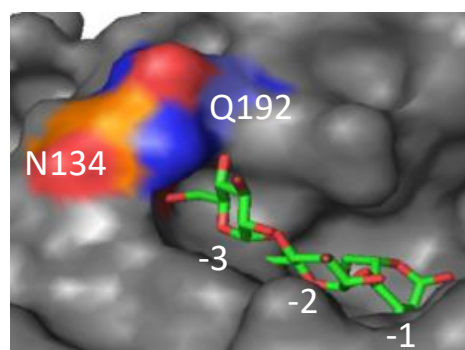


図2 G3Amy 非還元末端側のサブサイト構造

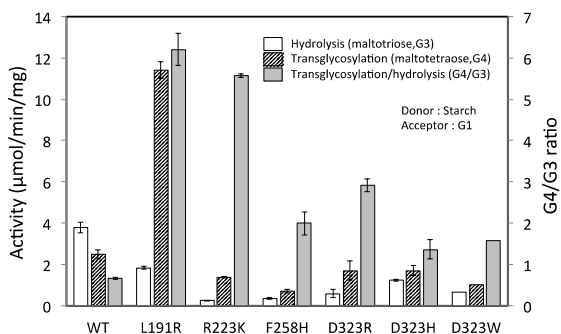


図3 G3Amy 変異酵素の加水分解活性と糖転移活性

### 3. 研究の方法

#### (1) G3Amy-L191R 変異酵素における糖転移活性上昇機構の解明

活性部位近辺における 116 種類の部位特異的変異酵素のスクリーニングから得られた L191R 変異酵素の糖転移活性上昇機構を明らかにすることを目的に, nucleophile による攻撃直前の状態を解析するために WT と L191R に nucleophile を破壊した D256A 変異を導入し, G5 や G6 複合体の X 線結晶構造解析を行う。また nucleophile による攻撃直後で糖受容体がプラス側サブサイトに存在する糖転移反応直前の状態を解析するために G3 複合体に糖受容体として G1 もしくは G2 を添加することでプラス側サブサイトに糖受容体が結合した複合体の X 線結晶構造解析を WT および L191R で行い比較することで, 糖転移反応時における R191 の役割について明らかにする。また, L191R のカイネティックパラメーターを測定して WT と比較することで, 構造変化と機能発現に関する知見を得ることを試みる。

#### (2) 加水分解活性および糖転移活性の pH 依存性の解明

図 7A はグルコース存在下における G3Amy の加水分解反応産物である G3 と糖転移反応産物である G4 の生成量に対する pH の影響を示したものである。このように G3Amy は加水分解反応と糖転移反応における至適 pH が異なる。この現象は G3Amy の糖転移反応機構を考える上で大きなヒントになる。即ち, 異なる pH で作製した結晶を用いた X 線構造解析を行うことで, pH 変化に伴う触媒残基周辺の構造変化を観察することで, 加水分解反応と糖転移反応で至適 pH が異なる分子基盤を明らかにする。

#### (3) アグリコン特異的転移活性上昇変異酵素の取得

これまでの研究で作製した活性残基近辺の 12 アミノ酸について部位特異的変異を導入した 116 種類の変異酵素を用いて, グルコースに加えてグリセロール, アスコルビン酸などに対して糖転移反応が進行する変異酵素を抽出する。アグリコンの大きさや形と変異導入部位の関係を調べると共に多重変異酵素を作製し, 各アグリコンに対する最適化を試みる。もし良好な変異酵素が得られなかった場合は, 上記アミノ酸に隣接するアミノ酸を標的として部位特異的変異を導入した変異酵素を用いてスクリーニングを行う。目的の配糖体の合成が確認できれば, 大量に合成して精製を行い, 各種機器分析によって目的の配糖体が合成されているか確認する。

### 4. 研究成果

#### (1) G3Amy-L191R 変異酵素における糖転移活性上昇機構の解明

WT と L191R のアポ型と G3 複合体の X 線結晶構造解析を行ったところ (図 4), 触媒残基 (D225, E256) の位置は一致しており, WT のアポ型と G3 複合体における L191 の配置も一致していた。しかし L191R のアポ型と G3 複合体における R191 の配置を比較すると, アポ型では側鎖がサブサイト+1 側に向いているのに対し, G3 複合体では側鎖がサブサイト-2 側に向いていた。また, L191R の求核残基欠失変異酵素 L191R/D225A と G4 の共結晶を解析したところ, マイナス側サブサイトには微弱ながら残存する触媒作用を受けた G3, プラス側サブサイトには G4 が配置していたが, R191 側鎖はサブサイト-2 とサブサイト+1 に存在するグルコース残基に向いていた (図 5A)。さらに L191R/D225A G3-G4 複合体結晶を G6 溶液に浸漬することで作製した L191R/D225A G6 複合体では, R191 側鎖の配置については揺らぎが大きく電子密度として確認することができなかった (図 5B)。以上の結果から, 糖転移活性が上昇した変異酵素 L191R は, R191 側鎖がマイナス側サブサイトに存在する糖転移反応の供与体となる G3 のグルコース残基と相互作用しながら, プラス側サブサイトに存在する糖受容体となるグルコース残基とも相互作用することで糖転移反応を促進している可能性が考えられた。

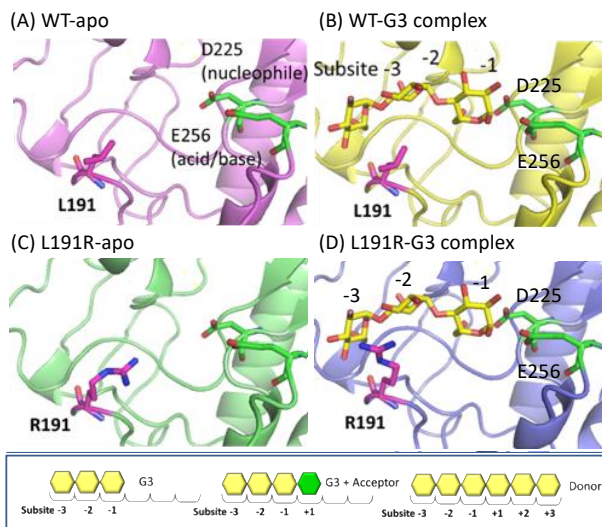


図4 WT および L191R のアポ型および G3 複合体のサブサイト構造の比較

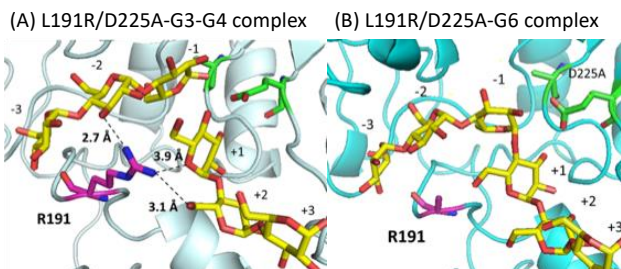


図5 L191R/D225A G3-G4 複合体と G6 複合体における R191 側鎖の比較

表2 可溶性デンプンに対する加水分解反応の kinetic parameter

	$K_m$ (g/L)	$k_{cat}$ (sec <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (g <sup>-1</sup> ·L·sec <sup>-1</sup> )
WT	0.97	4.1	4.2
L191R	0.41	4.2	10

WT および L191R について可溶性デンプンの加水分解に対するカイネティックパラメータを測定したところ (表 2), L191R は加水分解反応の触媒効率が低下することで糖転移活性が上昇したのではなく、逆に可溶性デンプンに対する  $K_m$  が低下することで加水分解反応の触媒効率が上昇していることがわかった。可溶性デンプンに対する親和性の上昇は、X 線結晶構造解析で得られた結果と一致した。糖転移活性の上昇は R191 側鎖がマイナス側サブサイトに存在する G3 供与体だけでなく、プラス側サブサイトの G3 受容体となるグルコース残基とも相互作用しているためと考えられた。

また、糖転移反応の際に G3 受容体となる基質が配置するプラス側サブサイトに存在する F258, P259, G260 から構成されるループに着目してみると、プラス側サブサイトに基質が存在しない L191R のアポ型や G3 複合体での配置と、プラス側サブサイトに基質が存在する L191R/D225A-G3-G4 複合体や G6 複合体における配置では異なっていることがわかった (図 6)。この F258-G260 ループは、アノマー保持型酵素の二段階目の加水分解と糖転移の分かれ目となる反応に関与する酸塩基触媒である E256 と非常に近く、このループの配置の変化は二段階目の反応に大きく影響する可能性が考えられた。プラス側サブサイトにおける基質の存在が酸塩基触媒の配置を制御している可能性が考えられ、その制御に F258-G260 ループが大きな影響を与える可能性が示唆された。

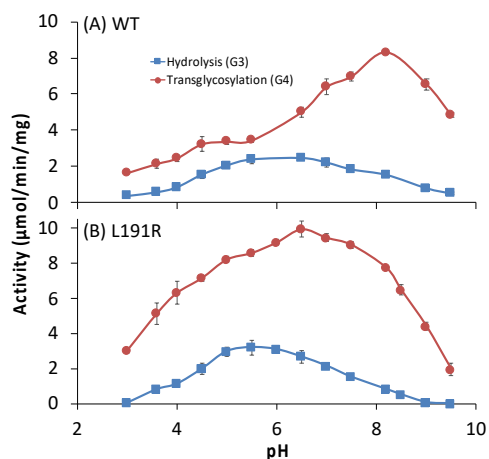
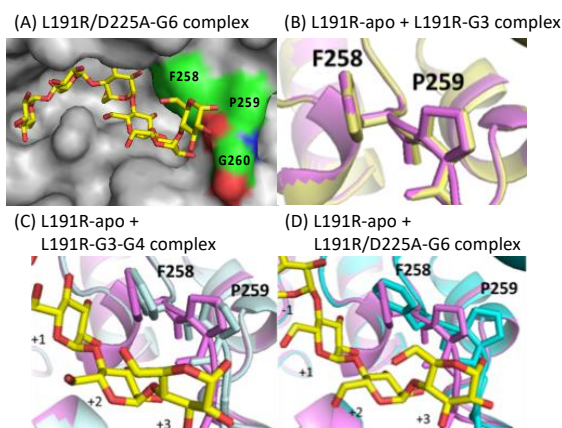


図6 L191RとL191R/D225Aのアポ型と基質複合体の重ね合わせ 図7 WTおよびL191Rの加水分解と糖転移活性のpH依存性

(2) 加水分解活性および糖転移活性の pH 依存性の解明

L191R の加水分解反応と糖転移反応における pH の影響を調べた結果 (図 7B), 加水分解の至適 pH は WT と同様弱酸性側であったが、糖転移反応の至適 pH はアルカリ側から酸性側へとシフトすることがわかった。そこで、WT において加水分解の至適 pH である 6.5 と糖転移の至適 pH である 8.2 で作製したアポ型と G3 複合体の結晶を構造解析して比較した。揺らぎを示す B-ファクターに着目したところ、アポ型、G3 複合体とも pH 8.2 において値が大きくシフトする領域が存在し (図 8), それらが F258-G260 ループ領域であることがわかった。図 9 に示す通り、pH 8.2 では、F258, P259 に相当する電子密度が明瞭に観察されず、揺らいでいることが明らかとなった。そこで、糖転移活性が高く、糖転移活性の至適 pH が酸性領域である変異酵素 L191R において、F258-G260 ループ領域の揺らぎを調べたところ (図 10), L191R では、pH 6.5 で作製した結晶においても pH 8.2 で作製した WT の結晶と同様に揺らぎが観察され、F258-G260 ループ領域の揺らぎが糖転移活性に大きく影響している可能性が強く示唆された。このループ領域中に存在する F258 は、W179 とともに *Bacillus* sp. 1011 由来 CGTase<sup>2)</sup>において同定された基質認識に重要なアミノ酸 F259, F183 と同じ位置に存在することからも、糖転移反応に重要な役割を果たしていることが強く示唆された (図 11)。

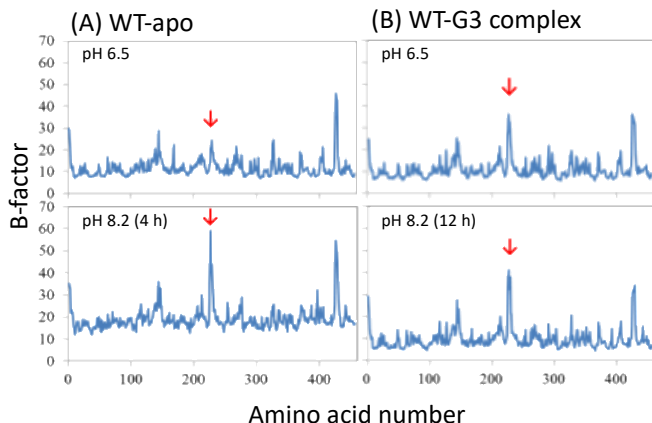


図8 WT アポ型と基質複合体のB-factorにおけるpHの影響

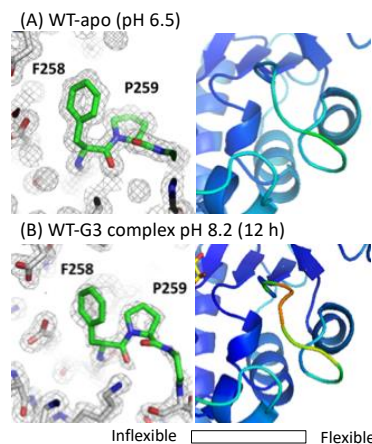


図9 WT F258-G260 ループ構造におけるpHの影響

(3) アグリコン特異的転移活性上昇変異酵素の取得

G3 配糖体とすることで有用な性質付与が期待される化合物として、グリセロールとアスコルビン酸を選択した。G3 グリセロール (G3Gly) はアミラーゼ阻害剤として肥満防止や糖尿病予防に有用とされているグルコシルグリセロールよりも 400 倍阻害活性が高い<sup>3)</sup>。また G3 アスコルビン酸 (ASA-G3) は、プロビタミンとして実用化されているアスコルビン酸 2-グルコシドと比較してグルコース鎖が長い分、腸内細菌による分解から免れ、小腸上皮細胞から吸収される率が高くなることが期待される。G3Gly については、WT を含む多くの変異酵素で合成が確認されたが、その中で最も合成効率が高かった変異酵素として L191R を選択し、反応産物は活性炭カラムによって精製した。質量分析から精製標品の分子量は目的の G3Gly と同じ 578 であること、NMR スペクトル解析によって、精製標品はグルコースの 1 位に G3 が結合した glycerol 1-maltotrioside であることを確認した (図 10)。グリセロール配糖体における G3 の結合位置については、選択性がなく、1 位に付加したものと 2 位に付加したものの混合物が得られるものと予想していたが、選択性があることは予想外であった。今後、変異酵素によって位置選択性が異なるか明らかにすることが課題となる。

アスコルビン酸の場合、G3 結合部位となり得る水酸基がいくつか存在するが、安定なプロビタミンとなる 2 位の水酸基を G3 で配糖化 (ASA-2G3) する必要がある。予備実験から L191R は糖転移産物の生成量が多いものの、目的の 2 位ではなく、6 位の水酸基 (ASA-6G3) であることが判明したので、L191R とは異なる糖転移産物を生成する変異酵素をスクリーニングした。116 種類の変異酵素の中から F279V/S283R が ASA-6G3 とは異なる反応産物を生成することがわかり (図 11)、反応産物を活性炭カラムにて精製した。質量分析から精製標品の分子量は目的の ASA-2G3 と同じ 662 であること、NMR スペクトル解析によって精製標品はアスコルビン酸の 2 位の水酸基に G3 が結合した ascorbate 2-maltotrioside であることを確認した (図 12)。

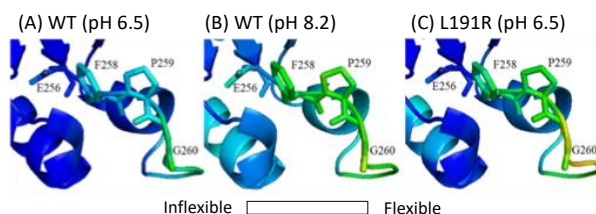


図10 WT および L191R の F258-G260 ループの揺らぎ

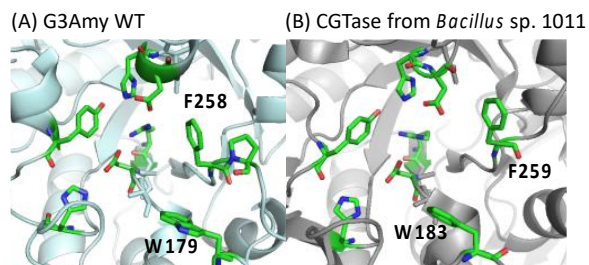


図11 G3Amy と CGTase における基質認識に重要なアミノ酸の比較

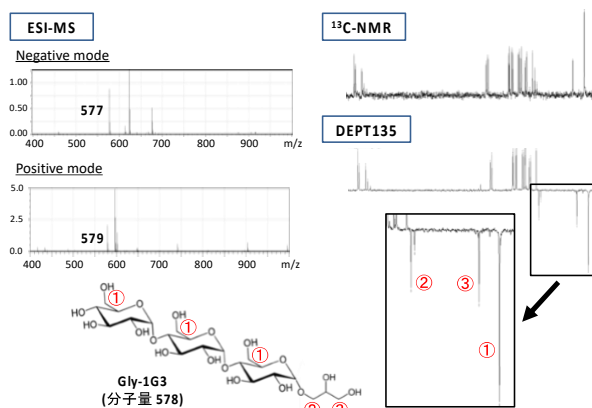


図12 G3Amy L191R を用いて合成した G3Gly の構造解析

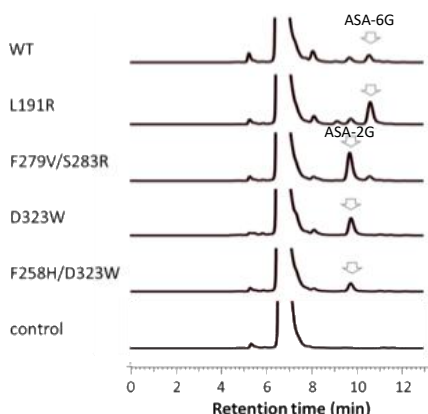


図13 各種変異酵素を用いて合成した ASA-G3 の HPLC 解析

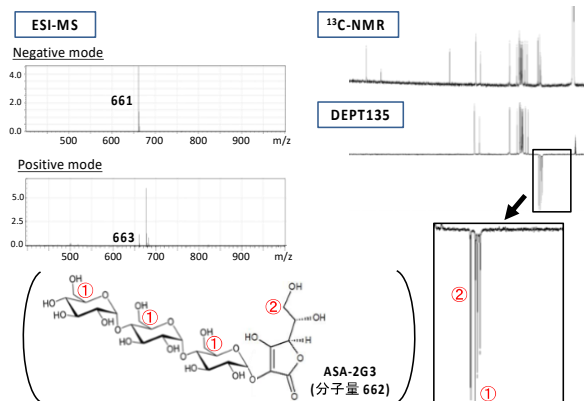


図14 G3Amy F279V/S283R を用いて合成した ASA-G3 の構造解析

<引用文献>

- 1) Kamon M, et al, *Appl Microbiol Biotechnol*, **99**, 4743-4753, 2015
- 2) Haga K, et al, *J Biochem*, **134**, 881-891, 2003
- 3) Nakano H, et al, *J Biosci Bioengin*, **95**, 583-588, 2003

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井彩美, 掃部正浩, 甲斐建次, 谷 修治, 炭谷順一, 川口剛司
2. 発表標題 マルトトリオース生成アミラーゼを用いたアスコルビン酸配糖体とグリセロール配糖体の合成
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 田中真奈, 西村重徳, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司
2. 発表標題 微生物由来耐熱性 -アミラーゼに関する研究
3. 学会等名 第20回関西グライコサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 真奈, 西村 重徳, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司
2. 発表標題 微生物由来耐熱性 -アミラーゼの性質とX線結晶構造解析
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 炭谷順一
2. 発表標題 グリコシダーゼ阻害剤研究の現状と可能性
3. 学会等名 関西グライコサイエンスフォーラム（招待講演）
4. 発表年 2018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	西村 重徳  (Nishimura Shigenori)  (90244665)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教    (24403)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------