

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02133

研究課題名(和文)糖質の多様化高機能化に向けた酵素法アプローチの新展開

研究課題名(英文)Utilization of enzymes for production of a variety of carbohydrates

研究代表者

森 春英 (MORI, Haruhide)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：80241363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖質の多様化に寄与する酵素合成法として、合成酵素と糖転移酵素に関する基盤的研究を行った。合成酵素としてはSS酵素によるスクロースからのUDP-Glcを介した糖質合成により新規糖質の合成、およびSS酵素の特異性改変酵素を作出した。特異性の異なるGS酵素も見出した。糖転移酵素としては、マルトオリゴ糖からインマルトオリゴ糖および環状糖を合成するマルチドメイン酵素のドメイン機能を明らかにし、類縁酵素2種の機能同定、および、これらの基質結合に寄与する残基を特定し、生成物特異性に関する機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖質は構成糖の多様性と結合様式の多様性の組み合わせによって顕著な多様性を示す物質群である。味覚、消化性、エネルギーの違いに加えて、腸内細菌叢の改善効果や抗腫瘍・高血圧抑制効果などの健康機能性を有するなど等、有用なものも多く知られている。バイオ素材等も含め潜在的な有用物質の宝庫と言える。糖質機能の発見と応用利用に向けて、多様性に対応可能な効率的合成手法の確立が必須である。ある程度のマスの糖質を合成するには酵素利用法が一般に優れている。一般には加水分解酵素を用いた多糖の低重合度化や、糖転移反応を利用したオリゴ糖や配糖体の合成、加リン酸分解の逆反応による糖質合成が行われている。

研究成果の概要(英文)：To develop the enzymatic production of carbohydrates, some enzymes were investigated in this study. As glycosyltransferases using sugar nucleotides as glycosyl donor, SS-enzyme and GS-enzyme were used. New disaccharides were produced using the SS-enzyme, in one-pot reaction with sucrose. The SS-enzyme was engineered for phosphorylated products. A new type of GS-enzyme was found. As transglycosylases, enzymes producing useful oligosaccharides and cyclic oligosaccharides were analyzed. Functions of the domains of the multi-domain structure, residues involved in the acceptor binding and determining their product preference were clarified.

研究分野：応用生物化学

キーワード：糖質生産 酵素利用 酵素機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖質は構成糖の多様性と結合様式の多様性の組み合わせによって顕著な多様性を示す物質群である。味覚、消化性、エネルギーの違いに加えて、腸内細菌叢の改善効果や抗腫瘍・高血圧抑制効果などの健康機能性を有するなど等、有用なものも多く知られている。バイオ素材等も含め潜在的な有用物質の宝庫と言える。

糖質機能の発見と応用利用に向けて、多様性に対応可能な効率的合成手法の確立が必須である。ある程度のマスの糖質を合成するには酵素利用法が一般に優れている。一般には加水分解酵素を用いた多糖の低重合度化や、糖転移反応を利用したオリゴ糖や配糖体の合成、加リン酸分解の逆反応による糖質合成が行われている。

2. 研究の目的

本研究では、糖質多様化に向けた合成手法として、主に合成酵素と転移酵素の利用による方法に注目した。

(1)合成酵素は糖質合成の糖供与体に UDP-Glc など糖ヌクレオチドを必要とする。この糖ヌクレオチド供給に寄与する酵素の探索と効率的な利用、糖質合成への利用、新規酵素の発見、改変酵素の作出等を行い、酵素分子の基盤的理解を進めることを目的として実施した。

(2)糖転移酵素を用いた糖転移生成物合成については、特に α -グルカンに作用し α -1,6-グルコシル転移する酵素に注目し、新規酵素の探索と酵素機能の解析、および機能に直接寄与する構造を秋からにすることを目的とした。また、転移に伴う結合様式の変化についての分子メカニズムについて明らかにすることも目指した。

3. 研究の方法

各種酵素を大腸菌組換え酵素として生産し、精製酵素の反応速度を測定して評価した。変異酵素のデザインにおいては、類似タンパク質の構造に基づき変異箇所を決めた。

4. 研究成果

(1) 合成酵素

合成酵素を利用した糖質合成

スクロースシンターゼ (SS 酵素) を利用した糖質合成を行った。すなわち UDP-Glc を Glc 供与体とし、Fru 以外の単糖への Glc 転移によりスクロース以外の新規オリゴ糖を合成した。なお、ここでオリゴ糖合成に必要な UDP-Glc をスクロースの加 UDP 分解により行った。すなわち、触媒量の UDP 存在下におけるスクロースからの UDP-Glc 生成反応と単糖からのオリゴ糖合成反応をワンポットで行いオリゴ糖を生成させた。単糖 11 種を試験し、5 種が基質となり、試験条件下、スクロースからの変換率 (分子数ベース) は 22%-45% で合成された。

合成活性の多様化のための合成酵素の改変

スクロースシンターゼ (SS) とスクロースリン酸シンターゼ (SPS) は、植物における糖質代謝上では全く異なる経路にかかわる酵素であるが、いずれも UDP-Glc のグルコシル転移を触媒し、それぞれスクロース (Suc)、スクロース 6-リン酸 (Suc6P) を生成する酵素であり、活性の違いは受容体基質の特異性 (それぞれ Fru または Fru6P) の差異による。SS 酵素の多様性を広げる変異酵素として、SS 酵素を SPS 酵素様に改変した。すなわち、Fru6P のリン酸結合部位を導入した変異酵素を作出した。本変異体では SPS 活性が SS 活性活性の 3 倍以上に達した。

GS 酵素による合成反応と逆反応の解析

マルトオリゴ糖の α -(1-4)-グルカン伸長を触媒する GS 酵素についても解析を行った。本研究では、細菌由来酵素を用いた。大腸菌での組換え酵素生産では、malQ 欠損株を宿主に使用し、大腸菌由来の MalQ 混入を解消した。精製標品は UDP 依存的にマルトオリゴ糖の鎖長を不均化した。速度解析により反応は三者複合体を経由することを示した。基質鎖長の特異性解析により、サブサイト-1 から +4 を有すること、マルトースなど短鎖基質や短鎖分岐鎖の多糖に良く作用する特徴を見出した。

(2) 転移酵素

マルチドメイン TS 酵素の解析

マルチドメインタンパク質 TS 酵素の各ドメインの機能解析と環状オリゴ糖合成活性について明らかにした。すなわち、本酵素は一次構造上 3 ドメイン A, B, C を含むと予想された。特にドメイ

ン A と B はそれぞれ独立した酵素活性を有すると予想された。ドメイン単独およびドメイン組み合わせたタンパク質を作出し、機能解析を行った。ドメイン A 単独酵素は、1-6 多糖（デキストラン）に作用して、イソマルトオリゴ糖と環状イソマルトオリゴ糖を生成した。すなわちドメイン A は dextran の加水分解活性と糖転移による CI 合成活性を持つことが判明した。ドメイン A を欠失させた B-C 酵素は、M4(6)GT 活性を有していた。すなわち、マルトオリゴ糖に作用して、1-4 転移による各種鎖長のマルトオリゴ糖の生成および 1-6 転移による長鎖 1-6 グルカンの生成を経て、最終的にイソマルトオリゴ糖を生成した。ドメイン B は糖結合ドメインと予想され、多糖含有ゲルを用いた Native-PAGE により多糖への親和性が確認された。3 残基の三重変異により、この親和性の低下が認められた。すなわち、ドメイン B における糖結合に機能する 3 残基が確認された。ただし、B-C 酵素の基質特異性、生成物特異性には、ドメイン B の 3 重変異は影響を与えなかった。

A-B-C からなる全長酵素は、マルトオリゴ糖に作用して、B-C 酵素と同様の生成物、マルトオリゴ糖とイソマルトオリゴ糖に加え、環状糖も生成した。すなわち、本酵素は、B-C の機能によりマルトオリゴ糖の結合様式を変えてイソマルトオリゴ糖とし、これをドメイン A の転移反応により環状化する機能を有することが確認された。

近縁酵素の機能解析

TS 酵素の類縁酵素として、PT 酵素および TD 酵素（大腸菌組換え酵素）の解析も行った。これはドメイン C のみを共有し、この部分の配列同一性は 40-50%程度である。反応の至適温度に違いがみられたが、いずれも TS 酵素同様に M4(6)GT 活性を示した。すなわち、マルトオリゴ糖を基質として、-1,4-転移により鎖長の多様化が見られる。グルコースやマルトースなど短鎖には -1,6 転移をして 1-6 鎖を生成する。

この短鎖マルトオリゴ糖に対する -1,6 転移能に差が見られた。すなわち 3 糖では PT 酵素は 1,4 転移のみするのに対し、TD 酵素は -1,6 転移も示した。

TD 酵素の特異性に寄与する残基の解析と M4(6)GT 機能発現機構

TD 酵素の基質結合部位を推定し、変異酵素の機能解析を行った。研究対象の転移酵素群自体は非常に独自性の高いものであるが、反応機構を異にする加水分解酵素群とタンパク質構造に類似性がある。これら加水分解酵素群の既存の構造を参考にして、機能残基を抽出し、変異酵素の機能解析により関連残基を選択した。このうちサブサイト-1 近傍に位置すると予想される Lys 残基変異酵素は、二糖基質の 1-4 基質特異性を喪失し、1-6 基質特異性を示した。また、プラス側サブサイトに位置すると予想される Val および Glu 残基の改変により、マルトオリゴ糖の重合度に依存した特異性増加は不明瞭になるとともに、-1,6 転移の増加ならびに加水分解活性の出現が認められた。すなわち、これらの残基はサブサイト+2~+3 において主にマルトオリゴ糖結合に寄与し、マルトオリゴ糖結合能の低下により -1,6 転移することが示された。グルコース、マルトースなど短鎖マルトオリゴ糖で -1,6 転移し、これより長鎖基質では -1,4 転移する一因として、これらの残基が寄与していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 森春英	4. 巻 10
2. 論文標題 各種糖質加水分解酵素・加リン酸分解酵素・異性化酵素の機能と応用に関する研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 応用糖質科学	6. 最初と最後の頁 165～174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5458/bag.10.3_165	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Taguchi Yodai, Saburi Wataru, Imai Ryozo, Mori Haruhide	4. 巻 488
2. 論文標題 Efficient one-pot enzymatic synthesis of trehalose 6-phosphate using GH65 -glucoside phosphorylases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 107902～107902
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.carres.2019.107902	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川村 大棋, 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 スクロースシンターゼへのリン酸結合部位導入によるスクロースリン酸シンターゼ活性の付与
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾下 晴紀, 澤田 桃, 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 マルトオリゴ糖4(6)グルコシルトランスフェラーゼのサブサイト変異に伴う1-4/1-6転移反応の変化
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川村 大棋, 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 スクロースシンターゼのショ糖分解・合成両反応によるオリゴ糖合成
3. 学会等名 日本応用糖質科学会北海道支部2020年度支部講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木 美那, 藤岡 郁美, 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 Bacteroides fragilis由来のGT3に属するグリコーゲンシンターゼの機能解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会北海道支部2020年度支部講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤田 桃, 尾下 晴紀, 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 Tepidibacillus decaturensis由来4(6)グルコシルトランスフェラーゼTdm4(6)GTの基質結合部位周辺アミノ酸残基への変異による基質特異性の改変と糖転移活性の改変
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会北海道支部/第50回日本栄養・食糧学会北海道支部合同学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田 桃, 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 Pseudoclostridium thermosuccinogenesおよび Tepidibacillus decaturensis由来GH15マルトオリゴ糖4(6)グルコシルトランスフェラーゼの糖転移反応の解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田 桃, 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 Pseudoclostridium thermosuccinogenesおよびTepidibacillus decaturensis由来GH15マルトオリゴ糖4(6)グルコシルトランスフェラーゼ様タンパク質の機能解析
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 竹田 夏美, 三島 英莉, 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 Thermoanaerobacter siderophilus由来マルチドメインタンパク質TsGH15Aの各ドメインの機能解析と環状イソマルトオリゴ糖の合成活性
3. 学会等名 日本農芸化学会北海道支部第2回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤岡 郁美, 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 Bacteroides fragilis由来グリコーゲンシンターゼの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会北海道支部第2回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 春英
2. 発表標題 各種糖質加水分解酵素・加リン酸分解酵素・異性化酵素の機能と応用に関する研究
3. 学会等名 日本応用糖質科学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 春英
2. 発表標題 多様な糖質に作用する各種酵素の機能と応用
3. 学会等名 日本応用糖質科学会北海道支部 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小谷真由, 佐分利巨, 森春英
2. 発表標題 Bifidobacterium longum ssp. infantis由来GH13_3タンパク質Blon_0282の機能
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成30年度大会（第67回）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤岡郁美, 佐分利巨, 森春英
2. 発表標題 Bacillus sp. AAH-31株由来 -アミラーゼAmyLの糖転移能および ループ8の機能
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成30年度大会（第67回）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 -1,6-グルコシル転移活性を有する酵素	発明者 森春英, 佐分利巨, 金井研太, 相沢健 太, 他3名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/006111	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	佐分利 亘 (SABURI Wataru) (00598089)	北海道大学・農学研究院・准教授 (10101)	

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