

平成21年5月20日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19380062  
 研究課題名（和文）アノマー反転型酵素のグライコシターゼ化の新展開  
 と精密オリゴ糖合成  
 研究課題名（英文）Conversion of inverting glycosidases to glycosynthases  
 and its application to regio- and stereospecific synthesis of  
 oligosaccharide  
 研究代表者  
 熊谷 英彦（KUMAGAI HIDEHIKO）  
 石川県立大学・生物資源環境学部・教授  
 研究者番号：70027192

研究成果の概要：糖質加水分解酵素は、その反応機構の違いから「アノマー保持型」と「アノマー反転型」の2種に大別されるが、オリゴ糖合成に使用できるのは「アノマー保持型酵素」に限られるとされてきた。もし「アノマー反転型酵素」をオリゴ糖合成のツールとして利用できるようになれば、その応用範囲は飛躍的に広がることとなる。本課題においては、1,2- $\alpha$ -L-フコシダーゼ、還元末端オリゴキシラーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼなどの「アノマー反転型酵素」を材料にして、その機能改変に取り組み、新規なオリゴ糖合成酵素へと変換することに成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：オリゴ糖・グライコシターゼ・アノマー反転型酵素

## 1. 研究開始当初の背景

近年、タンパク質や脂質などに結合した糖鎖が細胞の分化や発生、また病原微生物の宿主への感染など生理的に重要なステップに関わることが明らかとなってきており、

「糖鎖生物学」といわれる学問領域がポストゲノム時代の大きなテーマとなっている。これら糖鎖の生理機能や機序を詳細に解明するためには、その糖鎖構造（オリゴ糖）を精密に合成することが不可欠である。

オリゴ糖は、生理機能の解明のみならず、ガンの浸潤やインフルエンザウイルス感染防御など医薬品として、また、有用腸内細菌を増やすプレバイオティクスなどの食品としても非常に付加価値が高い。そのため従来より、化学合成法に加えて酵素を利用したオリゴ糖合成技術の開発が盛んに行われてきた。酵素合成法は、その正確な基質特異性を利用することで、化学合成法に比べて極めて精密にオリゴ糖を合成することが可能であり、また環境に対する負荷が少ないという利点もある。

オリゴ糖合成に使用される酵素として、「アノマー保持型」の糖加水分解酵素が挙げられる。糖加水分解酵素は、その反応機構の違いから「アノマー保持型」と「アノマー反転型」の2種に大別されるが、糖転移反応を触媒するのは「アノマー保持型酵素」に限られたものであるとされていた。

1998年に Withers らは「アノマー保持型酵素」の2つの触媒残基の中の求核基を他のアミノ酸残基に置換することにより、この酵素を糖合成酵素（グリコシターゼ）へと特化できる（加水分解反応が起こらない）ことを見出し、これはオリゴ糖合成の新たな強力なツールとなってきている。

一方、糖転移反応を触媒することは不可能とされてきた「アノマー反転型酵素」は、これまでオリゴ糖合成のツールの枠外にあったが、2006年に本課題の研究分担者の一人である本多がアノマー反転型酵素である還元末端オリゴキシラーゼをグリコシターゼ化することに世界で初めて成功した。

## 2. 研究の目的

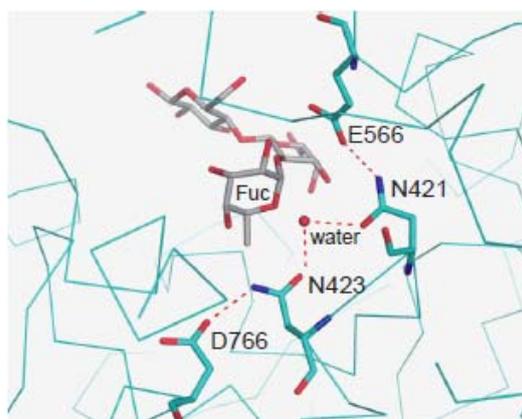
還元末端オリゴキシラーゼのグリコシターゼ化に成功したという事実は、オリゴ糖合成のツールとして、これまで枠外にあった「アノマー反転型酵素」を、新たなオリゴ糖合成のツールとして組み入れることが出来ることを示唆していた。糖加水分解酵素は、そのアミノ酸配列の相同性から約110種類のファミリーに分類されているが、「アノマー反転型酵素」は、その約

30%程度を占めている。本研究では、「アノマー反転型酵素のグリコシターゼ化」を普遍化・改良するとともに、これまで合成が困難であった有用オリゴ糖合成を可能にすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

「アノマー反転型酵素」のうち、本研究では別々の糖質分解酵素ファミリーに分類されている（1）1,2- $\alpha$ -L-フコシダーゼ、（2）還元末端オリゴキシラーゼ、（3）キシロシダーゼを取り上げて、グリコシターゼ活性の上昇をはかると共に、有用オリゴ糖の合成に取り組んだ。

（1）1,2- $\alpha$ -L-フコシダーゼは、ミルクオリゴ糖や血液型抗原決定基の非還元末端側に存在する Fuc $\alpha$ 1-2Gal 結合を特異的に認識して加水分解し、フコースを遊離する酵素である。フコシル化されたミルクオリゴ糖は、病原性細菌の感染阻害機能や有用腸内細菌を増殖させるプレバイオティクス機能を有する極めて価値の高いオリゴ糖であるが、その有効な合成法は確立されていない。X線結晶構造解析の結果、本酵素はユニークな反応機構を有するアノマー反転型酵素であることが明らかとなった（下図）。活性中心を構成する3つのアミノ酸残基に変異を導入し、フッ化フコースおよびラクトースから2'-フコシルラクトースの合成を試みた。



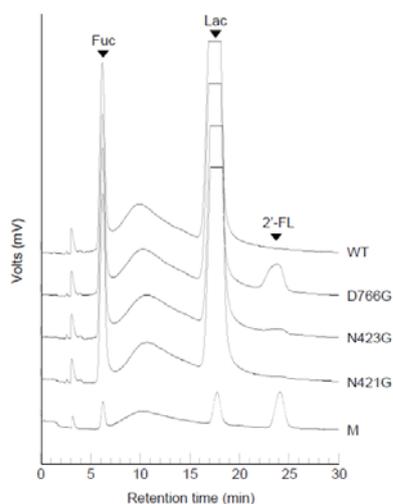
（2）還元末端オリゴキシラーゼは、キシロオリゴ糖の還元末端側に作用しキシロースを遊離する酵素である。X線結晶構造解析の結果から推定される触媒残基はアスパラ

ギン酸 263 であり、本残基に変異を導入することでグライコシターゼ化が可能であるが、その合成効率は 20%程度にとどまる。そこで、活性中心を構成するアミノ酸残基のうち、アノマー炭素を攻撃する水分子の保持に重要な役割を有することが推定されるチロシン 198 に注目した。チロシン 198 をフェニルアラニンに変換した変異型酵素を作製し、フッ化キシロビオースとキシロースを基質に用いて酵素反応を行い、キシロトリオース合成活性を測定した。

(3)  $\beta$ -キシロシダーゼは、(1) の還元末端オリゴキシラナーゼとは異なりキシロオリゴ糖を非還元末端から加水分解する酵素である。本酵素は還元末端認識性が緩いため、様々な糖を糖受容体として用いることができ、新規なオリゴ糖の合成が期待できた。

#### 4. 研究成果

(1) 1,2- $\alpha$ -L-フコシダーゼ：アノマー炭素を攻撃する水を保持するアスパラギン 421 およびアスパラギン 423、また、アスパラギン 423 の活性化に重要なアスパラギン酸 766 のグリシン置換体を作製し、グライコシターゼ活性を測定した。その結果、すべての置換体においてグライコシターゼ活性が検出されたが、アスパラギン酸 766 の変異体が最も高い活性を示した（下図）。得られた生成物を単離精製し、質量分析装置および核磁気共鳴装置による分析をおこなったところ、2'- $\alpha$ -フコシルラクトースであることが確認された。本酵素により立体選択的・位置選択



的にフコシル基を導入できることが明らかとなった。合成活性を上昇させる目的で、アスパラギン酸 766 を他のすべてのアミノ酸に置換した変異体を作製したが、大幅な改善は見られなかった。現時点での収率は 6%程度と極めて低く、今後の検討が必要である。

(2) 還元末端オリゴキシラナーゼ：チロシン 198 をフェニルアラニンに置換した変異型酵素では、加水分解活性が大幅に減少し、フッ素遊離活性がわずかに上昇していた。その結果、触媒基（アスパラギン酸 263）そのものに変異を導入した変異型酵素よりも高いグライコシターゼ活性を示すことが明らかとなった。このことは、「アノマー反転型酵素」では、触媒残基そのものを変換するよりも近傍の他の残基を変換することが重要であることを示唆していた。また、「アノマー保持型酵素」とは違う戦略で酵素変換を行わねばならないことも示唆していた。現在、他の近傍アミノ酸にも順次変異を導入しており、さらに高いグライコシターゼの創出にも成功している。本酵素を「アノマー反転型酵素」のモデルケースとすることで、本手法を普遍化することが可能であると考えられる。

(3)  $\beta$ -キシロシダーゼの塩基触媒に変異を導入した置換体において、グライコシターゼ活性が検出された。現在、反応速度や反応産物について詳細な解明を行っている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Kitaoka M, Honda Y, Fushinobu S, Hidaka M, Katayama T, and Yamamoto K. Conversion of inverting glycoside hydrolases into catalysts for synthesizing glycosides employing a glycosynthase technology. Trends in Glycoscience and Glycotechnology. peer-reviewed. 21.

(2009). 23-39.

② Wada J, Honda Y, Nagae M, Kato R, Wakatsuki S, Katayama T, Taniguchi H, Kumagai H, Kitaoka M, and Yamamoto K. 1,2- $\alpha$ -L-Fucosynthase: a glycosynthase derived from an inverting  $\alpha$ -glycosidase with an unusual reaction mechanism. FEBS Letters. peer-reviewed. 12. (2008). 3739-3743.

③ Honda Y, Fushinobu S, Hidaka M, Wakagi T, Shoun H, Taniguchi H, and Kitaoka M. Alternative strategy for converting an inverting glycoside hydrolase into a glycosynthase. Glycobiology. peer-reviewed. 18. (2008). 325-330.

④ Nagae M, Tsuchiya A, Katayama T, Yamamoto K, Wakatsuki S, and Kato R. Structural basis on the catalytic reaction mechanism of novel 1,2- $\alpha$ -L-fucosidase (AfcA) from *Bifidobacterium bifidum*. Journal of Biological Chemistry. peer-reviewed. 282. (2007). 18497-18509.

[学会発表] (計5件)

① 片山 高嶺・ビフィズス菌由来 1,2- $\alpha$ -L-フコシダーゼを用いたヒトミルクオリゴ糖 2'-フコシルラクトースの合成・2009年度乳酸菌腸内細菌工学研究会講演会・2009年5月15日・加賀観光ホテル

② 和田 潤・1,2- $\alpha$ -L-フコシダーゼのグライコシターゼ化による 2'-フコシルラクトースの合成・2009年度日本農芸化学会大会・2009年3月28日・マリンメッセ福岡

③ 本多 裕司・アノマー反転型  $\beta$ -キシロシダーゼのグライコシターゼ化・2009年度日本農芸化学会大会・2009年3月28日・マリンメッセ福岡

④ Wada J. 1,2- $\alpha$ -L-Fucosynthase: A glycosynthase derived from an inverting

$\alpha$ -glycosidase with an unusual reaction mechanism. The 23<sup>rd</sup> International carbohydrate symposium. July, 28, 2008. Oslo, Norway,

⑤ Honda Y. A Strategic concept to create a glycosynthase from an inverting glycoside hydrolase. The 23<sup>rd</sup> International carbohydrate symposium. July, 27, 2008. Oslo, Norway,

[図書] (計1件)

熊谷英彦、加藤暢夫、村田幸作、阪井康能・朝倉書店・遺伝子から見た応用微生物学・2008年・232ページ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熊谷 英彦 (KUMAGAI HIDEHIKO)  
石川県立大学・生物資源環境学部・教授  
研究者番号：70027192

### (2) 研究分担者

片山 高嶺 (KATAYAMA TAKANE)  
石川県立大学・生物資源環境学部・准教授  
研究者番号：70346104

谷口 肇 (TANIGUCHI HAJIME)  
石川県立大学・生物資源環境学部・教授  
研究者番号：60011946

本多 裕司 (HONDA YUJI)  
石川県立大学・生物資源環境学部・准教授  
研究者番号：40399382

### (3) 連携研究者

山本 憲二 (YAMAMOTO KENJI)  
京都大学大学院・生命科学研究所・教授  
研究者番号：70109049  
(2007年度のみ)