

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19380064  
 研究課題名（和文） 多糖－endo型グリコシダーゼ複合体解析に基づく反応機構解明研究  
 研究課題名（英文） A reaction mechanism elucidation study based on many sugar－endo Type glycosidase complex analysi  
 研究代表者  
 橋本 勝 (HASHIMOTO MASARU)  
 弘前大学・農学生命科学部・教授  
 研究者番号：19380064

## 研究成果の概要：

本研究課題では、endo型グリコシダーゼの反応の詳細を解明する目的で、アナログを分子動力学手法を用い設計したいくつかの基質を合成し、それらと対象酵素との複合体形成について熱化学分析により測定、また、共結晶化などを試みた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学（6104）

キーワード：endo型グリコシダーゼ、反応機構、基質ミミック、複合体形成

## 1. 研究開始当初の背景

多糖は生体の構造やエネルギー生産・備蓄に大きく関与しており、その分解酵素であるグリコシダーゼも生命現象において重要な役割を担っている。従って詳細なグリコシダーゼ機構解明は、糖代謝関連疾患の医薬品、或いは農薬開発に多くの知見を与えると期待される。グリコシダーゼは、その機能から exo 型グリコシダーゼと endo 型グリコシダーゼに分類される。exo 型グリコシダーゼは糖鎖

の末端から一定数糖鎖ごと加水分解する。この場合、認識部位が糖鎖末端にあるため、その阻害剤の設計も比較的容易で機構も詳細に理解されつつある。一方、endo 型グリコシダーゼは、糖鎖内部グリコシドを加水分解する。したがって、endo 型の場合、糖鎖配列のみを認識するため、基質内に複数の反応可能部位が存在、酵素が糖鎖をスライドすることが可能である。以上の理由から適当な対応する阻害剤が少なく、均一な状態で反応直前の

基質-酵素複合体の詳細を観察することが難しく、その機構研究も遅れていた。

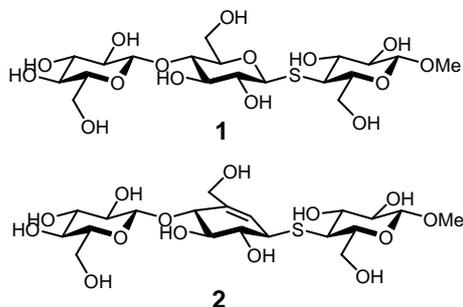
## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの知見を踏まえ、endo-PG1を中心にendo型グリコシダーゼの反応機構の詳細、特に反応部位の反応中間体におけるグリコシド結合、ピラノース部分の立体配座の変化、エネルギー変化を中心に検討した。

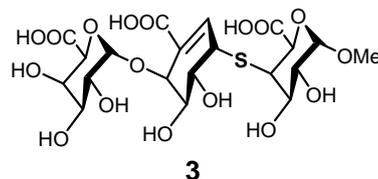
一般に酵素-基質複合体の-1サブサイトでは、基質は歪んだ半いす型配座をとり、この歪みエネルギーが反応のドライビングフォースとなると考えられている。報告者が先に報告した硫黄置糖鎖アナログの場合、酵素との複合体での基質配座ではなく、遊離状態における安定配座のミミックを目指しており、ソーキング実験でグリコシダーゼ-糖鎖反応中間体を再現するに至らなかったものと推定できる。アカルボースに倣い、シクロヘキセン構造を糖鎖の中央に導入したオリゴ糖の合成を行い、それを評価した。

## 3. 研究の方法

セルラーゼを標的としたセルロース誘導体として、基質アナログ1、および推定遷移状態アナログ2の合成を行い、これらの酵素との反応について検討した。



また、endo型ポリガラクトナーゼを標的とした、推定反応遷移状態基質アナログ3の合成を行った。



一方、糖鎖-酵素複合体を考察する目的として、動力学的計算法(COSMOS90)の最適化を行った。

さらに、エンド型ポリガラクトナーゼのシグナルペプチドと思われる配列の役割を検討した。

## 4. 研究成果

合成した1と天然型三量体基質とをNMRにおいてNOEを測定比較したところの結果、硫黄置換アナログ1は天然基質を類似した安定配座を取っていることを明らかにした。カロリメトリー実験により酵素との複合体形成を測定したが、1は全くその能力を持たなかった。しかし2はエンドグルカナーゼVと複合体形成(平衡定数は50 L/mol)をすることを明らかにした。しかしその結合は酵素反応を説明するには弱いものであり、反応部位から離れたサブサイトの重要性が明らかになった。

## 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19件)

1. T. Murakami, N. Takada, M. Hashimoto, "Biosynthetic studies of spiroleptosphol", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, ., 19, 1 122-1125 (2009) (査読有)
2. T. Murakami, T. Tsushima, N. Takada, K. Tanaka, K. Nihei, T. Miura, M. Hashimoto, "Four Analogues of Spiroleptosphol isolated from *Leptosphaeria doliolum*", *Bioorg. Med. Chem.* 19, 492-495 (2009) (査

- 読有)
3. Kudo, S., Murakami, T., Miyanishi, J., Tanaka, K., Takada, N., Hashimoto, M., "Isolation and absolute stereochemistry of optically active sydonic acid from from *Glonium* sp. (Hysteriales, Ascomycota)", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 73, 203-204 (2009) (査読有)
  4. S. Ogawa, T. Shimizu, H. Ohki, T. Araya, T. Okuno, K. Miyairi, "Expression, purify- cation and analyses of glycosylation and disulfide bonds of *Stereum purpureum* endopolygalacturonase I in *Pichia pastoris*" *Protein Expression and Purification*, 65 15-22 (2009) (査読有)
  5. Minoru Saito, Isao Okazaki, "Force-Field Parameters of the C and F Around Glycosidic Bonds to Oxygen and Sulfur Atoms", *J. Comput. Chem.* 2009 in press.
  6. Murakami, T.; Takada, N.; Hehre, W.; Hashimoto, M., "Structure and Biosynthesis of Norneolambertellin Produced by *Lambertella* sp.1346", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 16, 4547-4549 (2008) (査読有)
  7. 橋本勝, "Spartan Essentialを導入して～演習講義「コンピュータ分子設計学」への展開～", *日本化学会情報化学部会誌* 26, 106-112 (2008) (査読有)
  8. Hashimoto, M.; Tsushima, T.; Murakami T.; Nomiya, M.; Takada, N.; Tanaka, K., "Spiroleptosphol isolated from *Leptosphaeria doliolum*", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 14, 4228-4231(2008)
  9. Nomiya, M., Murakami, T., Takada, N., Okuno, T., Harada, Y., Hashimoto, M., "Syntheses of Lambertellols and Their Stable Analogues; Investigation of the Real Active Species in the Mycoparasitism by *Lambertella* Species", *J. Org. Chem.*, 73, 5039-5047(2008) (査読有)
  10. Yamamoto, K., Sato, Y., Ishimori, A., Miyairi, K., Okuno, T., Nemoto, N., Shimizu, H., Kidokoro, S., Hashimoto, M., "Synthesis of D-trigalacturonic acid methylglycoside", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 71, 1230-1235 (2008) (査読有)
  11. Schuetz, A.; Murakami, T.; Takada, N.; Junker, J.; Hashimoto, M.; Griesinger, C "Rdc-enhanced NMR spectroscopy in structure elucidation of natural products/- small molecules: Sucro-neolambertellin as a testcase", *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 2032-2034 (2008) (査読有)
  12. Nagashima I., Shimizu H. et al. "Chemical and enzymatic synthesis of neoglycolipids in the presence of cyclodextrins", *Tetrahedron Letters*, 49, 3413-3418 (2008) (査読有)
  13. H. Shimizu et al, "New glycosylation method Part III: Study of microwave effects at low temperatures to control reaction pathways and reduce byproducts", *Tetrahedron*, 64, 10091-10096 (2008) (査読有)
  14. 清水弘樹, "結合の角度から分子の立体構造を決める、液晶NMR法", *化学と生物*, 46, 648-652 (2008) (査読有).

スペースの都合上、その他は省略した。

[学会発表] (計 68 件)

1. **橋本勝**、村上貴宣、奥野智旦、  
“Speiroleptosholの生合成”, 日本農  
芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3 月 29  
日 福岡)
2. 高田晃、須藤彩、山下一夫、山崎賀久、**橋  
本勝**, “メチインのイモグサレセンチュウ  
誘引活性”, 日本農芸化学会 2009 年度大  
会 (2009 年 3 月 29 日 福岡)
3. 山崎絵麻、脇田江里子、**橋本勝**、幸田泰則、  
高田晃, “ジャスモン酸を基盤とした抽  
だい抑制剤開発”, 日本農芸化学会 2009  
年度大会 (2009 年 3 月 29 日 福岡)
4. 山本和範、**宮入一夫**、奥野智旦、**橋本勝**,  
“endo-PG反応機構解明を目指した二環性  
遷移状態基質アナログの合成研究”, 日  
本農芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3 月  
29 日 福岡)
5. 石森歩、山本和範、工藤慎士、**宮入一夫**、  
**橋本勝**, endo-PG反応機構解明を目指した  
シクロヘキセン基を有する基質アナログ  
の合成研究”, 日本農芸化学会 2009 年度  
大会 (2009 年 3 月 29 日 福岡)
6. **清水弘樹** 他, “マイクロ波固相合成装置  
の開発と、ペプチド合成研究”, 日本農芸  
化学会 2009 年度, (2009 年 3 月 29 日 福岡)
7. **清水弘樹** 他, “難溶性糖脂質に対する糖  
転移酵素反応のシクロデキストリン効果  
Part 2”, 日本農芸化学会 2009 年度,  
(2009 年 3 月 29 日 福岡).
8. 工藤慎士、大濱千志帆、村上貴宣、高田晃、  
**橋本勝**, “抗菌物質lambertellin生産菌  
Lambertella sp. 1346 による代謝分解とマ  
イコパラサイト現象”, 日本農芸化学会  
2009 年度大会 (2009 年 3 月 28 日 福岡)
9. Wilanfranco C. Tayone, Saori Shindo,  
Kazuaki, Tanaka, **Masaru Hashimoto**,  
Noboru Takada, “Absolute  
Stereochemistry of Fugii Metabolites”,  
日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3  
月 28 日 福岡)
10. 小川俊、宇藤憲則、大木肇、**清水哲哉**、奥  
野智旦、**宮入一夫**, “リング銀葉病菌由来  
エンドポリガラクトノナーゼ I の C 末端  
領域は自己の活性を阻害する”, 日本農  
芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3 月 28 日  
福岡)
11. 大野真理、殿内暁夫、小川俊、福沢琢磨、  
**宮入一夫**, “Streptomyces thermocarbo  
xidus 由来新規エキソ型ペクテートリア  
ーゼ遺伝子のクローニング、発現、解析”,  
日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3  
月 28 日 福岡)
12. 伊藤真理子, 小川俊、秋月貴光、**宮入一  
夫**, “Sclerotium rolfsii由来耐酸性エン  
ドポリガラクトノナーゼの精製、性質およ  
びクローニングと発現”, 日本農芸化学会  
2009 年度大会 (2009 年 3 月 28 日 福岡)
13. 柴田泰成, 星吉伸, 工藤絢子, **宮入一夫**,  
“スギヒラタケの細胞溶解毒素、ヘモリシ  
ンの単離と性質”, 日本農芸化学会 2009  
年度大会 (2009 年 3 月 28 日 福岡)
14. 工藤絢子, 柴田泰成, 神巧一, 七島直樹,  
**宮入一夫**, “ブナシメジの細胞溶解毒素ヘ  
モリシンの単離と性質”, 日本農芸化学  
会 2009 年度大会 (2009 年 3 月 28 日 福岡)
15. 秋月貴光、殿内暁夫、吉田孝、奥野 智旦、  
橋本 貴美子、**宮入 一夫**, “毒キノコ、オ  
オシロカラカサタケの毒性メタロエンド  
ペプチダーゼのAspergillus oryzaeでの発  
現とその解析 2, 日本農芸化学会 2009 年度  
大会 (2009 年 3 月 28 日 福岡)
16. 原雄一、梅原亮介、讃岐保、福澤琢磨、  
小笠原愛、**宮入一夫**、殿内暁夫, “Strepto-  
myces thermocarboxydus 由来の低分子エ

- ンド型ペクテートリアーゼ遺伝子のクローニング”, 日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3 月 28 日 福岡)
17. 清水弘樹 他, “環状不凍糖タンパク質の合成および不凍活性”, 第 43 回高分子学会北海道支部研究発表会, (2009 年 2 月 3 日 札幌)
18. 清水弘樹 他, “ペプチド固相反応適応の合成および不凍活性”, 第 43 回高分子学会北海道支部研究発表会, (2009 年 2 月 3 日 札幌)
19. 清水弘樹 他, “ペプチド固相合成に特化させたマイクロ波利用合成装置の開発とその利用研究”, 平成 20 年度第二回合同学術講演会, (2008 年 11 月 9 日 帯広)
20. 村上貴宣、対馬太郎、橋本勝, “Leptosphaeria doliolumの代謝する新規 leptosphol類の単離と構造決定”, 日本農芸化学会東北支部 143 大会 (2008 年 10 月 11 日 弘前)
21. 山本和範、工藤慎士、斎藤稔、橋本勝, “endo-PG反応機構解明を目指した二環性遷移状態基質アナログの合成研究”, 日本農芸化学会東北支部 143 大会 (2008 年 10 月 11 日 弘前)
22. 野口翔悟、山本和範、橋本勝, “エンド型セルラーゼ反応機構解明を目指した基質アナログの合成研究”, 日本農芸化学会東北支部 143 大会 (2008 年 10 月 11 日 弘前)
23. 橋本勝、対馬太郎、村上貴宣、田中和明、高田晃、根平達夫, “新規二量体アントラキノンalterporriol F, Gの構造”, 日本農芸化学会東北支部 143 大会 (2008 年 10 月 11 日 弘前)
24. 工藤慎士、宮西淳介、村上貴宣、高田晃、橋本勝, “Glonium sp (Hysteriales, Ascomycota) から単離した光学活性 sydonic acid”, 日本農芸化学会東北支部 143 大会 (2008 年 10 月 11 日 弘前)
25. 阿部美穂子、松野純子、橋本勝、幸田泰則、高田晃, “ジャスモン酸類の新し生理活性”, 日本農芸化学会東北支部 143 大会 (2008 年 10 月 11 日 弘前)
26. 須藤彩、山下一夫、山崎賀久、橋本勝、高田晃, “ニンニクに含まれるイモグサレセンチュウ誘引物質に関する研究”, 日本農芸化学会東北支部 143 大会 (2008 年 10 月 11 日 弘前)
27. 工藤絢子、柴田泰成、神巧一、宮入一夫, “ブナシメジ由来ヘモリシンの単離と性質”, 日本農芸化学会東北支部大会 (2008 年 10 月 11 日 弘前)
28. 清水弘樹 他, “マイクロ波を活用した糖鎖・糖ペプチド合成研究”, 第 50 回天然有機化合物討論会, (2008 年 10 月 1 日 福岡)
29. 小川俊、大木肇、清水哲哉、奥野智旦、宮入一夫, “リンゴ銀葉病菌由来Endopolygalacturonase I の欠失 C 末端 44 残基の機能解析”, 日本応用糖質科学会 2008 年度大会 (9 月 18 日 沖縄)
30. 横川和幸、福士奈々子、山本忠志、宮入一夫, “ナガイモ腐敗病菌Pythium sylvaticumのマンナーゼの精製とクローニング”, 日本応用糖質科学会 2009 年度大会 (9 月 18 日 沖縄)
31. 清水弘樹 他, “機能性食品開発や創薬を指向した糖鎖の応用—マイクロ波を利用した効率的合成法の開発を背景に—”, HiNTセミナー2008-5, (2008 年 8 月 26 日 札幌)
32. 清水哲哉, “Ultra-high resolution structure of endopolygalacturonase determined by X-ray and neutron

diffraction”, 第 21 回国際結晶学会議,  
(2008 年 8 月 24-25 日 大阪)

33. Tetsuya Shimizu, Toru Nakatsu, Nobutaka Shimizu, Mamoru Sato, Kazuo Kurihara, Kazuo Miyairi, Toshikatsu Okuno, Nobuo Niimura and Hiroaki Kato  
“Ultra-high resolution structure of endopolygalacturonase determined by X-ray and neutron diffraction” 第 21 回国際結晶学会議 (IUCr 2008) (2008 年 8 月 23-31 日 大阪)

34. Kazuya Hasegawa, Kunio Hirata, Tetsuya Shimizu, Takashi Kumasaka, and Masaki Yamamoto  
“Shutter-less continuous rotation data collection from protein crystals with the X-ray CMOS detector” 第 21 回国際結晶学会議 (IUCr 2008) (2008 年 8 月 23-31 日 大阪)

35. Takaaki Hikima, Tetsuya Shimizu and Masaki Yamamoto  
“Manipulating protein microcrystal with optical tweezers based on lensed fiber probes” 第 21 回国際結晶学会議 (IUCr 2008) (2008 年 8 月 23-31 日 大阪)

スペースの都合上、その他は省略した。

[図書] (計 1 件)

宮入一夫, “ペクチナーゼとその利用」バイオテクノロジーシリーズ産業用酵素の応用技術と最新動向”, シーエムシー出版、48-57 (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 橋本勝、田中和明、三浦、新規スピロ型抗腫瘍性抗生物質、その類縁体およびその取得方法, 特願 2008-286162.

2. 高田晃、橋本勝、山下一夫、山崎賀久、イモグサレセンチュウ誘引剤およびイモグサレセンチュウ駆除方法、特願 2008-273959.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 勝 (HASHIMOTO MASARU)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号: 40212138

### (2) 研究分担者

宮入 一夫 (MIYAIRI KAZUO)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号: 10003526

齋藤 稔 (SAITO MINORU)

弘前大学・理工学研究科・教授

研究者番号: 60196011

城所 俊一 (KIDOKORO SYUNICHI)

長岡技術科学大学工学部・准教授

研究者番号: 80195320

清水 弘樹 (SHIMIZU HIROKI)

独立法人産業技術総合研究所・

創薬シーズ探索ラボ・研究員

研究者番号: 30344716

清水 哲哉 (SHIMIZU TETSUYA)

独立法人理化学研究所・研究技術開発室

研究者番号: 80435651