

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22263

研究課題名(和文)加リン酸分解酵素の飛躍的多様化に向けた分子加工法の開発

研究課題名(英文)Diversification of carbohydrate phosphorylases

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：加リン酸分解酵素に関し、新規活性の探索、機能構造相関解析、および糖質合成を実施した。新規酵素としてGlc 1-3Gal特異的な酵素を見出し、新たな代謝経路の可能性と実用的な同二糖合成法を示した。澱粉加水分解酵素群のマルトシドホスホリラーゼでは、基質特異性などの解析に加え、加リン酸分解と糖転移の反応機構に基づく評価、加水分解を加えた3活性の寄与残基の特定を実施した。変化により糖転移や加水分解に偏る残基の特定など、関連加水分解酵素等への加リン酸分解活性付与に向けた機能構造相関の基盤的知見が得られた。また本酵素の利用による分岐鎖の伸長した不溶性の $\beta$ -グルカン多糖が合成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖質には、食品素材として味やエネルギーに加え、各種健康調節機能をも示し、またバイオ素材等として利用されるなど、広範な機能性化合物がある。多種多様の糖質合成は、その構成糖や結合様式の改変により行われる。酵素利用による糖質合成は、安価で大量の生産に適しており、加リン酸分解酵素(加リン酸分解の逆反応)も利用される。本研究成果として、新規酵素が見いだされて特定2糖の効率的合成が可能となった。 $\beta$ -グルカンの新たな加工法も提唱された。加えて、得られた加リン酸分解酵素の活性寄与構造に関する情報は、類似構造を有する多様な加水分解酵素の加リン酸分解活性付与に向けた酵素分子加工の基盤的知見となる。

研究成果の概要(英文)：To develop the enzymatic production of carbohydrates, phosphorylases were investigated in this study. A new activity, solabiose phosphorylase, was found. A possible metabolism involving the enzyme and a practical enzymatic synthesis of solabiose using this enzyme were shown.

Maltoside phosphorylase, as a member of starch-hydrolyzing enzyme family, was analysed intensively. Kinetic analysis revealed that the reaction followed the two-steps reaction, and phosphorolysis, transglycosylation, and hydrolysis occurred through competitive binding of the second substrates on the glycosyl enzyme intermediate. Significant change of the proportion of the three activities caused by mutations in possible binding residues suggested appropriate residues for the activities. Using the enzyme activity, insoluble  $\beta$ -glucans were produced though extension of their branched chains.

研究分野：応用生物化学

キーワード：酵素機能 酵素利用 糖質生産

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖質には様々な機能があることが知られている。甘味に限らず様々な味覚を与え、また消化性・エネルギーの異なる様々な糖質がある。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もの、食品に限らず広くバイオ素材等への利用もあり、潜在的なものも含め多様な機能・有用性がある。多様な機能性は糖質の種類・構造の多様性に支えられている。糖質は、構成糖・結合様式・鎖長それぞれの種類の相乗により顕著な多様性を示す物質群であり、これらの利活用には、まずは個々の糖質の合成が必要である。農産加工品などの安価かつ豊富な糖質資源を出発物質として、簡便な方法を用いて多彩な糖質に変換する技術が求められている。糖質の結合様式・鎖長変化・構成単糖異性化を(ランダムでは無く)特異的に行うには、ツールとして酵素が利用される。各種生物のゲノム情報が次々に明らかにされて、糖質加工に利用可能な酵素の種類は確実に増えた。多彩な糖質の合成加工の進展には、新規酵素活性の探索とそれらの利用法開発とともに、酵素の構造活性相関の知見を広げ、既存酵素を糖質合成に適したものに改変して糖質合成利用を目指す必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、糖質合成手法の多様化として加リン酸分解酵素に注目した。新規加リン酸分解酵素活性の探索を行うとともに、加水分解酵素の分子加工により加リン酸分解活性を改変して加リン酸分解活性を多様化することを指向して、加水分解酵素群に含まれる加リン酸分解酵素に注目し改変を行った。加リン酸分解酵素は、加リン酸分解の逆反応により糖質合成に利用可能であるが、酵素の種類が加水分解酵素よりも圧倒的に少なく、従ってこれにより合成可能な糖質も限られている。これに対し、加水分解酵素には非常に多数の種類があり、また一般的に安定性も高い。更に、加水分解酵素群酵素には、加水分解とともに、糖転移や加リン酸分解活性を示すものもある。このような加水分解酵素群に注目して、活性決定に寄与する構造機能相関の解析を進めることを通して、多種多様な加水分解酵素をベースとした加リン酸分解酵素創出に向けた共通基盤が確立されて、合成可能な糖質種の飛躍的増加に資する。

### 3. 研究の方法

各種酵素はいずれも大腸菌組換え体により生産した。すべての試験には精製酵素標品を調製して用いた。基質特異性などすべての評価は反応初速度に基づき行った。各種条件下での初速度を求めた。初速度の測定においては各種生成物を比色法または HPLC により定量し、この値に基づき初速度を算出した。酵素タンパク質の予測構造としては、構造予測法による構造または配列同一性の高い既知構造を用いた。酵素を利用した糖質合成では、合成量の経時的変化等の条件検討を行った。生成糖質については、ゲルろ過による分子量測定、蛍光標識キャピラリー電気泳動 (FACE) による分岐鎖長解析、質量分析 ESI-MS・NMR 解析 (HMBC 等) による構造解析と決定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規加リン酸分解酵素

Paenibacillus 由来の糖質加水分解酵素群 GH94 タンパク質 PBOR\_28850 の機能解析を行い、本酵素がソラビオース (D-Glcp 1-3-D-Gal) に作用することを明らかにした。酵素は大腸菌組換え体により生産し、生成標品を用いて試験を行った。酵素群 GH94 の構成酵素は、主に  $\beta$ -グルコシドに作用する加リン酸分解酵素である。そこで  $\beta$ -Glc1P をグルコシル供与体として用いて、加リン酸分解の逆反応により基質を探索した。すなわち、単糖 10 種、二糖 3 種と反応させ、D-Gal が唯一基質となることを見出した。この生成物がソラビオースであることを、単離標品の質量分析 (ESI-MS) および NMR 分析 (HMBC) により明らかにした。実際に本酵素のソラビオース加リン酸分解活性を確認した。この反応は逐次 bi-bi 反応機構に従い、つまりソラビオース、無機リン酸の両者が酵素に結合する 3 者複合体を経由した反応であり、最大速度 (kcat) は  $9.14 \text{ s}^{-1}$  であった。Glc1P と Gal からの逆反応も同様に逐次 bi-bi 反応であり、kcat は  $14.5 \text{ s}^{-1}$  であった。本酵素の基質特異性は、サブサイト+1 における特徴的アミノ酸残基によるものと考えられる。また本酵素の生理的な機能については、本酵素遺伝子の周辺遺伝子の既知および推定機能も含めて、Oxalobacteraceae の菌体外多糖の分解酵素系のひとつとして、該当ユニットに作用する可能性を提案した。

#### (2) 糖質加水分解酵素群酵素の機能構造相関

澱粉分解酵素  $\alpha$ -アミラーゼの関連酵素として、マルトシドホスホリラーゼに注目した。本組換え酵素は、マルトオリゴ糖などの 1-4 グルカンに作用し二糖単位で加リン酸分解を触媒し、

-マルトース 1-リン酸(Ma1P)を生成した。無機リン酸非存在下では二糖単位で転移反応を触媒し、加リン酸分解と転移の反応速度比は無機リン酸の濃度に応じて変化した。加水分解活性は確認されなかった。加リン酸分解の逆反応(以下逆反応)の反応速度は、10 mM<sup>-</sup>Ma1P 存在下で、マルトオリゴ糖 2 糖(Glc2)、3 糖(Glc3)では顕著に低く、しかし Glc4 以上や可溶性澱粉、グリコーゲンなどで高値を示した。マルトオリゴ糖に対して、解析した Glc7 までは鎖長に伴い速度(みかけの kcat/Km)は増加した。以上より、本マルトシドホスホリラーゼは、1-4 結合したグルカン(マルトオリゴ糖など)の非還元末端から二糖ユニット(マルトシル基)を切り出して加リン酸分解および糖転移するエキソ型反応を触媒すると確認された。基質結合に関わるサブサイト構造として、グリコン側結合部位にはサブサイト-2 および-1 を、アグライコン側の基質結合部位にはサブサイト+1 から少なくともサブサイト+7 までを有し、特にサブサイト+4 への結合が重要であると判断された。

本酵素の加リン酸分解反応(Ma1P 生成)と二糖転移反応について速度論的解析を行い、いずれも一般的な加水分解酵素・転移酵素と同様の反応スキームにより反応が進行する事を明らかにした。すなわち、本酵素はマルトオリゴ糖との反応において、まずは基質の非還元末端から 2 糖マルトシル基を切り出して、マルトシル酵素中間体を形成し、続いて中間体が、加リン酸分解ではリン酸と、糖転移では受容体糖質と結合してそれぞれの Michaelis 複合体中間体を經由して生成物を生成することが確認された。4-ニトロフェニルマルトペンタオシド (PNP-Glc5)を基質とした反応において、中間体からの加リン酸分解、糖転移の速度比(kcat/Km に相当するパラメータの比率)を求めた。糖転移反応が加リン酸分解よりも数倍高かった。以上より、本酵素の加リン酸分解は、マルトシル中間体が無機リン酸に結合した Michaelis 複合体形成を經由する事、無機リン酸との結合は基質糖質と競合的であり、実際、無機リン酸の結合は糖転移反応の受容体糖質の結合よりも数倍程度低いことが明らかとなった。

他のマルトシド加リン酸分解酵素の立体構造情報と本酵素の一次構造に基づき、ドメイン B の 2 残基と触媒残基に近接する 1 残基の計 3 残基がリン酸結合に関わると推定される。これらはサブサイト+1~+2 の形成残基でもあり、加リン酸分解等の基質糖質や転移反応における受容体糖質の結合への寄与も想定された。これら 3 残基の変異酵素 18 種を作出して、反応特異性の評価を行った。糖質基質には PNP-Glc5 を用い、加リン酸分解、糖転移および加水分解の各初速度を測定した。速度の合計値およびこれに対する 3 反応の各速度比により評価した。野生型では速度合計値は 0.87 s<sup>-1</sup>、速度比率は加リン酸分解 42%、転移 58%、加水分解は検出限界以下であった。変異酵素 18 種の速度合計値は野生型の 0.4-73%であった。速度比は大きく変動し、加リン酸分解 0-76%、糖転移 4-93%、水解 0-87%の範囲にあった。加リン酸分解の速度比は多くの変異体で野生型と同程度に維持される傾向が強かったが、酸性残基の導入により大きく低下する傾向が見られた。3 番目の Asn 残基では酸性残基に加え親水性残基導入でもこれに伴い加リン酸分解、転移ともに低下し、加水分解活性の比率が高くなった。1 残基変異に伴い、全速度は野生型の 40%を保ちながら加水分解の速度比 87%を占める変異体も作出された。一方、加リン酸分解の比率増加は、正電荷を導入する 1 残基変異によって 76%まで増加した。ただしこの時の全速度は大きく低下した。更に、嵩高い残基の導入(1 残基置換)により野生型比 5%の全速度を保ちながら、転移が 93%に達した変異体も得られた。3 残基のうち比率変動の大きかった 3 番目の残基は触媒残基に近く、関連酵素間で立体構造における位置の保存性は高い。この点でも、加リン酸分解酵素の多様化に向けて変異導入候補として適している。

### (3)加リン酸分解酵素による糖質合成

マルトシドホスホリラーゼを用いた多糖の鎖長延伸反応：

各種多糖と<sup>-</sup>Man1P を反応させた条件下では<sup>-</sup>Man1P の約 30%が消費してプラトーに達した。この時までには不溶性多糖が沈澱として生じ反応液は白濁した。不溶性多糖の分析を行った。青価の大きな増加(ヨウ素呈色の増加)、分子質量の増加(増分は最大 225 kDa)が確認された。不溶性多糖の分岐鎖長解析(分岐の加水分解および FACE 解析)により、基質多糖の重合度 10 程度の分岐鎖が減少し、重合度 30-40 の分岐鎖の増加が確認された。すなわち、本酵素の加リン酸分解逆反応により、<sup>-</sup>グルカン系の水溶性多糖の鎖長を大きく伸長した糖質が合成された。

ソラビオース加リン酸分解酵素を用いたソラビオースの酵素合成：

ソラビオースは加リン酸分解の逆反応により、<sup>-</sup>Glc1P と Gal から合成された。更に実用的合成法として、スクロースとラクトースを出発材料とした。ラクトースは予め酵素の加水分解により Gal、Glc 混液にして、これを用いた。スクロースは加リン酸分解により<sup>-</sup>Glc1P となり、ソラビオース合成の基質として使用される。スクロース分解とソラビオース合成をワンポットで行うことにより、ソラビオース合成に伴い副生成物として生じる無機リン酸は、スクロースの加リン酸分解の基質として消費されるため低濃度に保たれる。このワンポット反応により、ラクトース加水分解物(ワンポット反応液での濃度 263 mM の Gal を含む)と 350 mM スクロースから、ソラビオース 259 mM が合成された。収率は 99%にのぼる。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saburi Wataru, Nihira Takanori, Nakai Hiroyuki, Kitaoka Motomitsu, Mori Haruhide	4. 巻 12
2. 論文標題 Discovery of solabiose phosphorylase and its application for enzymatic synthesis of solabiose from sucrose and lactose	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-04421-2	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 -

1. 著者名 Fukui Kensuke, Saburi Wataru, Ibuki Masahisa, Tsumura Kazunobu, Mori Haruhide	4. 巻 27
2. 論文標題 Preliminary evaluation of colorimetric and HPLC-based methods for quantifying $\alpha$ -D-glucopyranosylmannobiose in a crude material	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Science and Technology Research	6. 最初と最後の頁 249 ~ 257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/fstr.27.249	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 -

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 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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 保科佑樹, 小谷真由, 佐分利亘, 森春英
2. 発表標題 Bifidobacterium longum ssp. infantis由来GH13マルチドホスホリラーゼの反応特異性の改変
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 温 宇ちゅう, 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 Functional analysis of the residues in subsite +1 of <i>Bacillus</i> sp. AHU2001 maltose phosphorylase
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三井智子, 佐分利亘, 于健, 姚関, 森春英
2. 発表標題 GH130 -1,3-マンノシドホスホリラーゼの構造と機能
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 <i>Paenibacillus borealis</i> 由来GH94タンパク質PB0R_28850の機能とソラビオースの酵素合成
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小谷 真由, 佐分利 亘, 鈴木 龍一郎, 森 春英
2. 発表標題 <i>Bifidobacterium longum</i> 由来 -1,4-グルカン：マルトース1-リン酸マルトシルトランスフェラーゼBlon_0282による -1,4-グルカン合成反応の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会北海道支部第2回講演会, 札幌
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大会（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

〔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

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