

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380056

研究課題名（和文） 糖転移作用を支配する構造因子の分子解析と応用

研究課題名（英文） Analysis of structural elements controlling transglycosylation and its application

研究代表者

木村 淳夫（KIMURA ATSUO）

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：90186312

研究成果の概要（和文）：

多糖などの糖質を加水分解する糖質酵素は、オリゴ糖の製造に利用される（オリゴ糖をヒトが食すると生理機能が向上）。興味深いことに、糖質酵素の種類によりオリゴ糖の生産能が異なり、糖質酵素の構造に起因する現象である。本研究では我々が見出した3つの現象から「オリゴ糖生産性の向上」を目指した。本研究の成果は、1）オリゴ糖生成に関与する構造因子（酵素機能を発揮させる部分構造）を解明、2）オリゴ糖の生産量・種類を制御する理論を形成、3）将来において酵素的オリゴ糖生産のオーダーメイド化を実現可能にする結果取得、である。

研究成果の概要（英文）：

Glycosylases are enzymes, which are currently utilized for the production of oligosaccharides. Interestingly, production-ability is dependent on the kinds of glycosylases, meaning that their structural elements contribute to the reaction specificity. Our research aims at elucidating structural elements of glycosylase-catalyzed transglycosylation. Our research achieved i) elucidation of structural elements contributing to the oligosaccharide production; ii) establishment of the theoretical background of oligosaccharide production; iii) finding the ways to regulate the oligosaccharide production.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：糖転移、構造因子、分子解析

1. 研究開始当初の背景

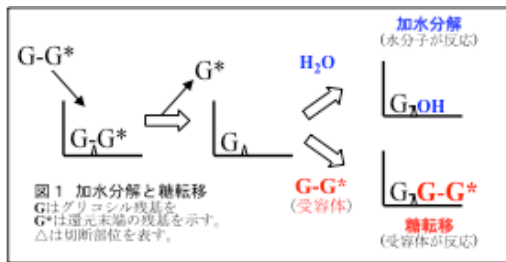
我々は、これまで糖質酵素の構造と機能の関係究明を行ってきた。研究開始当初において「糖転移作用を制御できる新しい現象」を3つ見出していた。すなわち（1）長鎖オリゴ糖を生産する新規な転移酵素、（2）触媒

水の結合部位、（3）受容体の結合部位、であった。以下に、この3つの現象を簡単に紹介する。

（1）長鎖オリゴ糖を生産する新規な転移酵素：短鎖オリゴ糖を基質にして転移を繰り返し、生成物として長鎖オリゴ糖を生産する新

規な酵素を見出した。既に遺伝子単離に成功していた。

(2) 触媒水の結合部位：加水分解作用と糖転移作用は、図1に示したように水分子と受容体の競争的な反応と捉えられる。我々は「加水分解に参加する水分子（触媒水）を結合部位から追い出すことで糖転移が優先」を着想し、触媒水の結合部位にアミノ酸置換を導入する予備的な実験を行った。加水分解の減少および糖転移の増加が観察された。



(3) 受容体の結合部位：転移反応の受容体が結合するサイトの改変も有効である。サイトの構造の変化が、受容体の結合様式に影響し「異なる転移生成物の産生」が期待される。糖質酵素の受容体結合部位を予想し、アミノ酸置換法を用いて変異酵素を作製した。転移反応を行うとプリミティブな結果であるが、異なる構造のオリゴ糖が生成された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、前項に示した3つの現象を解析し、転移作用の分子機構を知ることである。糖転移反応の改良・開発は産業界からの要求が強いため『応用研究への発展を図る』が将来的な到達目標である。具体的な目標は、(1) それぞれの現象から糖転移を支配する構造因子（蛋白質の部分構造）の決定、(2) その機能の機構究明と理論構築、(3) 構造因子や理論を他の酵素に付与・適応、(4) 有用な機能の利用、である。

3. 研究の方法

方法の他に計画も含めて説明することにする。以下に、方法と計画の概略を述べる。

(1) 長鎖オリゴ糖を産する新規な転移酵素

以下の4項目が方法と計画である。

① 計画に必要な基盤的な実験：酵素の遺伝子発現と精製・拮抗阻害剤の探索・自殺基質法による触媒残基の決定、を行う。

② 立体構造：親酵素の結晶を調製し、X線結晶解析から立体構造を決定する。前項で得られた阻害剤を用いた複合体および触媒残基置換酵素を用いた基質との複合体を解析する。これらの結果から長鎖オリゴ糖を生成する構造因子を予想する。

③ 構造因子の決定と機能：予想された構造因子に対しアミノ酸置換を行い、転移能の測

定から機能を推定し、構造因子を決定する。X線結晶解析が困難なケースに遭遇した場合は、類縁酵素から構造を予測する。

④ 構造因子の移植：構造が類似する糖質酵素に構造因子を付与した酵素を作製し、糖転移反応を観察する。

(2) 触媒水の結合部位

① 部位を形成するアミノ酸：触媒水の結合部位を形成するアミノ酸を置換した酵素を作製し、加水分解と転移の両活性を測定し、機能を調べる。

本実験は触媒サイトにある重要なアミノ酸の置換を行うため、dead enzyme（活性がない酵素）を作製する可能性が大きい。その場合は、次項②の手法を試みる。

② 小さな構造変化の導入：結合サイトを構築するアミノ酸に相互作用が予想されるアミノ酸残基に変異導入し、前項①と同様な活性測定を行い、機能を評価する。この実験は、前項においてdead enzymeが発生した際に行うが、①のアプローチが成功した場合にも試みたい。

③ 他の糖質酵素への応用：他の糖質酵素において触媒水サイトを予想し、変異の導入で転移酵素への変換を目指す。糖質酵素において「触媒水を結合する構造因子が存在」を実証し理論の構築を目指す。

(3) 受容体の結合部位

① 部位の改変：受容体の結合部位は、基質切断点の近傍と遠位で機能が異なると想定できる（図2）。すなわち、近傍ではグルコシド結合の生成能に寄与すると予測でき、遠位の部位は受容体基質のサイズ認識に貢献すると予想できる。これら2つの予想をアミノ酸置換で調べる。得られた結果を踏まえ、受容体結合サイトの変異が転移作用に与える影響に関し、理論の構築を行う。

② 応用研究への発展を意図した試み：前項で明らかにした構造因子や構築した理論を他の酵素に導入・適用させ、糖転移作用の改良および理論的基盤の強化を目指す。本項目においては、応用研究への発展を意識した作業も含む。

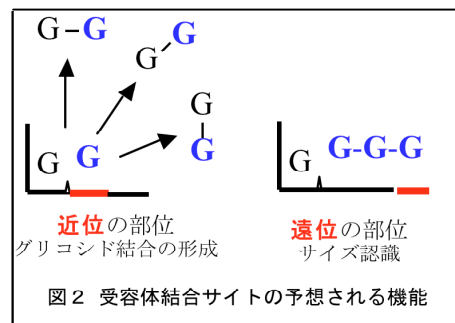


図2 受容体結合サイトの予想される機能

4. 研究成果

当該研究で計画した項目(すなわち「3. 研

究の方法」で示した項目)に対する研究は全て順調に進行し、次に示す成果を取得した。

(1) 長鎖オリゴ糖を産する新規な転移酵素

① 計画に必要な基盤的な実験：酵素遺伝子を大腸菌の系で発現させ、組換え酵素を精製した。阻害剤に関しては、幾つかの候補を本酵素に作用させ、拮抗阻害剤の取得に成功した。またエポキシ基を有する多価アルコール体が本酵素を非可逆的に失活させた。その活性低下機構の分析から自殺基質であることを確認した。さらに失活の動的解析から触媒残基を決定した。

② 立体構造：親酵素の結晶化および X 線結晶解析に成功した。得られた酵素結晶は、阻害剤や基質との複合体解析に適した解像度を与えなかったが、立体構造の全容を知ることができた。相同酵素の立体構造も用い、長鎖オリゴ糖を与える 2 つの構造因子を予想した。すなわち、1) 触媒サイトの近傍因子：活性部位にある芳香族残基；2) 触媒サイトの遠位因子：活性部位から離れた位置にあるループ、である。

③ 構造因子の決定と機能：前項で予測した 2 つの構造因子に対し変異を導入し、糖転位作用と加水分解作用を解析した。

1) 触媒サイトの近傍因子：活性部位にある芳香族残基の置換で糖転移活性が低下した。また親酵素で僅かであった加水分解反応が本変異酵素において上昇した。従って当該芳香族アミノ酸が構造因子の 1 つであると推定した。

2) 触媒サイトの遠位因子：活性部位から離れた位置にあるループに対して削除実験を行った。削除体の機能解析から当該ループが長鎖オリゴ糖生成に重要な機能を有することが認められた。

④ 構造因子の移植：前項で決定した構造因子（芳香族残基とループ）を通常の加水分解酵素に移植し、糖転移活性を測定した。両構造因子の付与において効果が認められた。特にループ付与の場合は顕著な転移能の上昇が観察された（数倍の上昇）。従って、当該目的である構造因子の付与に成功するとともに、2 つの因子が転移作用に対し重要であることが再確認された。すなわち、本研究における第 1 の構造因子が明らかになった。

(2) 触媒水の結合部位

① 部位を形成するアミノ酸：我々は既にデキストラン-グルコシダーゼ (DDase と略称) の立体構造を明らかにした。その構造から触媒水の結合サイトを構築するアミノ酸を調べ、変異を導入した。変異酵素の加水分解力は低下し、転移能力が増加した。この結果は、活性部位から触媒水を除去するような変異を発生させると、転移能力が向上することを意味する。

② 小さな構造変化の導入：前項において触

媒水結合サイトの機能解明に成功したが、さらに触媒水固定を行うアミノ酸に相互作用する残基に変異を与え、小さな構造変化を発生させた。まず、候補を DDase の立体構造から選択した。選んだ残基に変異導入したが、加水分解と転移の両活性が減少した。本置換は触媒サイト内の他の残基にも影響を及ぼすと考えられた。

③ 他の糖質酵素への応用：他の糖質加水分解酵素について触媒水結合サイトを予想し、変異導入・動的解析を行った。加水分解の減少と転移の増加が観察され、オリゴ糖生産において触媒水結合サイトの変異は有効であると考えられた。すなわち、本部位への構造変化は「転移作用の量的向上を促す」ことが判明し、本研究における第 2 の構造因子が明らかになった。

(3) 受容体の結合部位

① 部位の改変：本研究における第 3 の構造因子である「受容体の結合部位」を基質切断点の近傍と遠位の 2 つに分けて解析した結果を以下に述べる。

1) 基質切断点の近傍：DDase の基質切断点近傍にある受容体結合部位に対し、立体構造情報から置換アミノ酸の候補を決め、置換酵素を作製した。予想どおり親酵素と異なる転移特性を示した。また加水分解作用におけるグルコシド結合認識も変化した。

2) 基質切断点の遠位：同様に DDase の立体構造から受容体結合部位の遠位に位置する残基に変異を与え、転移作用を調べた。受容体特異性が広くなり、より多くの糖分子を受容体基質として受入れるようになった。

3) 理論の構築：以上の結果から、受容体結合サイトの変異は、異なる転移能を示す酵素の構築に繋がるということが判明した。すなわち当該部位の改変は「転移作用の質的向上を促す」ことが明らかになった。また加水分解作用におけるグルコシド結合認識も変化した。

② 応用研究への発展を意図した試み：前項①において明らかにした構造因子や理論を他の酵素に導入・適用させた。酵母酵素では、基質切断点近傍の改変で糖転移作用の特異性が変化し、異なる構造を持つ転移生成物を与えた。細菌酵素においては、基質切断点の遠位の改変によって受容体基質のサイズ認識が向上し、より広い受容体特異性を示した。

以上の結果から「受容体サイトの改変は、転移能の質的向上に寄与」の理論を再確認できた。さらに転移反応を自在にコントロールするタイプの応用研究（転移作用のオーダーメイド化）の確立を確信させる成果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

全ての雑誌論文は査読有り。

- ①Kang HK, Kimura A, Kim D: Bioengineered glucansucrase of *Leuconostoc mesenteroides* for preferred oligosaccharide synthesis using sucrose. **J Agric Food Chem**, in press, 2011. IF=2.469 (2009).
- ②Kim YM, Shimizu R, Nakai H, Mori H, Okuyama M, Kang MS, Fujimoto Z, Funane K, Kim D, Kimura A: Truncation of N- and C-terminal regions of *Streptococcus mutans* dextranase enhances catalytic activity. **Appl Microbiol Biotechnol**, in press, 2011. IF=2.896 (2009).
- ③Funane K, Kawabata Y, Kim YM, Kang HK, Fujimoto Z, Kimura A, Kobayashi M: Function of C-terminal region of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase from *Bacillus circulans* T-3040. **Biochim Biophys Acta** 1814:428-434, 2011. IF=2.480 (2009).
- ④Kang HK, Kim YM, Nakai H, Kang MS, Hakamada W, Okuyama M, Mori H, Nishio T, Kimura A: Suicide substrate-based inactivation of endodextranase by γ -epoxyalkyl β -D-glucopyranosides. **J Appl Glycosci** 57:111-117, 2010.
- ⑤Ryu HJ, Jin X, Lee JH, Woo HJ, Kim YM, Kim GJ, Seo ES, Kang HK, Kim J, Cho DL, Kimura A, Kim D: Optimal expression and characterization of a fusion enzyme having dextranase and dextranase activities. **Enzyme Microb Technol** 47:212-215, 2010. IF=2.638 (2009).
- ⑥Opassiri R, Maneesan J, Akiyama T, Pomthong B, Jin S, Kimura A, Ketudat-Cairns JR: Rice Os4BGlu12 is a wound-induced α -glucosidase that hydrolyzes cell-wall- α -glucan-derived oligosaccharides and glycosides. **Plant Sci** 179:273-280, 2010. IF=2.050 (2009).
- ⑦Mori H, Lee JH, Okuyama M, Nishimoto M, Oguchi M, Kim D, Kimura A, Chiba S: Catalytic reaction mechanism based on α -secondary deuterium isotope effects in hydrolysis of trehalose by European honeybee trehalase. **Biosci Biotechnol Biochem** 73: 2466-2473, 2009. IF=1.326 (2009).
- ⑧Kang MS, Okuyama M, Mori H, Kimura A: The first α -1,3-glucosidase from bacterial origin belonging to glycoside hydrolase family 31. **Biochimie** 91: 1434-1442, 2009. IF=3.897 (2009).
- ⑨Okuyama M, Kitamura M, Hondoh H, Kang MS, Mori H, Kimura A, Tanaka I, Yao M: Catalytic mechanism of retaining α -galactosidase belonging to glycoside hydrolase family 97. **J Mol Biol** 392: 1232-1241, 2009. IF=3.871 (2009).
- ⑩Hondoh H, Otsuka-Rachi H, Saburi W, Mori H, Okuyama M, Kimura A: Structural comparison of *Streptococcus mutans* dextran glucosidase with glucoside hydrolases in GH13. **J Appl Glycosci** 56(2):111-117, 2009.
- ⑪Kim YM, Seo MY, Kang HK, Kimura A, Kim D: Construction of a fusion enzyme of dextranase and dextranase: Application for one-step synthesis of isomaltooligosaccharides. **Enzyme Microb Technol** 44:159-164, 2009. IF=2.638 (2009).
- ⑫Kitamura M, Okuyama M, Tanzawa F, Mori H, Kitago Y, Watanabe N, Kimura A, Tanaka I, Yao M: Structural and functional analysis of a glycoside hydrolase family 97 enzyme from *Bacteroides thetaiotaomicron*. **J Biol Chem** 283: 36328-36337, 2008. IF=5.520 (2008).
- ⑬Funane K, Terasawa K, Mizuno Y, Ono H, Gibu S, Tokashiki T, Kawabata Y, Kim YM, Kimura A, Kobayashi M: Isolation of *Bacillus* and *Paenibacillus* bacterial strains that produce large molecular of cyclic isomaltooligosaccharides. **Biosci Biotechnol Biochem** 72:3277-3280, 2008. IF=1.390 (2008).
- ⑭Kim YM, Kim D, Kimura A: Enzymatic synthesis of α -2-deoxyglucosyl derivatives catalyzed by organic solvent-resistant α -glucosidase. **Biotechnol Bioprocess Eng** 13:639-645, 2008. IF=1.653 (2008).
- ⑮Saburi W, Hondoh H, Kim YM, Mori H, Okuyama M, Kimura A: Structure-function relationship of substrate length specificity of dextran glucosidase from *Streptococcus mutans*. **Biologia** 63:1000-1005, 2008. IF=0.406 (2008).
- ⑯Okuyama M, Kang MS, Yao K, Mitsuishi Y, Mori H, Kimura A: Substrate recognition of *Escherichia coli* YicI (α -xylosidase). **J Appl Glycosci** 55:111-118, 2008.
- ⑰Hondoh H, Saburi W, Mori H, Okuyama M, Nakada T, Matsuura Y, Kimura A: Substrate recognition of α -1,6-glucosidic linkage hydrolyzing enzyme, dextran glucosidase from *Streptococcus mutans*. **J Mol Biol** 378:911-920, 2008. IF=4.146 (2008).

[学会発表] (計 64 件)

- ①Kim YM, Kanegae M, Hondoh H, Nishimura T, Saburi W, Sadahiro J, Lang W, Shimizu R, Nakai H, Kang HK, Okuyama M, Mori H, Kang MS, Fujimoto Z, Funane K, Kim D, and Kimura A: Molecular Mechanism of novel enzymes degrading and forming α -1,6-glucosidic linkages, including megalosaccharide production. The 78th Annual Meeting and International Symposium in 2011 Annual Conference of Korean Society of Food Science and Tech-

- nology. June 9th, 2011, Daegu Exhibition Convention Center (Daegu, Korea).
- ② Tagami T, Okuyama M, Mori H, Kimura A: Structural element determining the diverse specificities for chain-length of substrate in glycoside hydrolase family 31 α -glucosidases. 9th Carbohydrate Bioengineering Meeting. May 15th to 18th, 2011, Calouste Gulbenkian Foundation (Lisbon, Portugal). (ポスター賞 1位を受賞)
- ③ Ngiwsara L, Iwai G, Mori H, Okuyama M, Kimura A: Putative role of Tyr227, Gln349 and Leu350 near catalytic amino acids of honeybee α -glucosidase III. 4th Symposium on the Alpha-Amylase Family, September 25th to 30th, 2010, Smolenice Cattle (Smolenice, Slovakia). (ポスター賞 3位を受賞)
- ④ 木村淳夫: 糖質酵素の基礎研究とその展開. 日本応用糖質科学会平成22年度大会 (第59回), 平成22年9月17日, グランシップ (静岡県).
- ⑤ Tagami T, Nishimura T, Okuyama M, Mori H, Kimura A: Shifting specificity of *Aspergillus niger* α -glucosidase from short chain substrates to long chain substrates. Plant Polysaccharide and Applied Glycoscience Workshop 2010, July 29th to 31st, 2010, Sasagawa Hall (Tokyo, Japan).
- ⑥ 奥山正幸: α -グリコシダーゼの機能と構造に関する研究. 日本農芸化学会 2010年度大会, 平成22年3月28日, 東京大学 (東京都). (日本農芸化学会奨励賞受賞講演)
- ⑦ Hondoh H, Otsuka-Rachi H, Saburi W, Mori H, Okuyama M, Kimura A: Transglucosylation pattern of wild-type and specificity-altered dextran glucosidase. 15th European Carbohydrate Symposium, July 19th to 24th, 2009, University of Vienna (Vienna, Austria).
- ⑧ Funane K, Ono H, Gibu S, Tokashiki T, Kawabata Y, Kim Y-M, Kimura A, Kobayashi M: Novel cycloisomaltooligosaccharides of large molecule found in culture supernatant of *Bacillus* and *Paenibacillus* strains. 24th International Carbohydrate Symposium, July 27th to August 1st, 2008, University of Oslo (Oslo, Norway).
- ⑨ Mori H, Saito S, Ogawa K, Maki M, Okuyama M, Kimura A: Identification of essential catalytic residues in an *Escherichia coli* trehalase and an inverting glycosynthase reaction catalyzed by the catalytic base-mutated enzyme. 24th International Carbohydrate Symposium, July 27th to August 1st, 2008, University of Oslo (Oslo, Norway).

[図書] (計1件)

- ① Okuyama M, Mori H, Hondoh H, Nakai H, Saburi W, Kang MS, Kim YM, Nishimoto M, Wongchawalit J, Yamamoto T, Son M, Lee JH, Mar SS, Fukuda K, Chiba S, Kimura A: Woodhead Publishing Ltd. (Cambridge, UK); Molecular mechanism of α -glucosidase. "Carbohydrate-active enzymes: structure, function, and applications (ed. by Park K-H)" pp.64-76, 2008.

[その他]

(1) アウトリーチ活動情報

- ① 奥山正幸、木村淳夫: 独立行政法人科学技術振興機構・平成22年度サイエンス・パートナーシップ・プロジェクト (SPP) 事業 (北海道札幌藻岩高校)
- ② 奥山正幸、木村淳夫: 独立行政法人科学技術振興機構・平成21年度サイエンス・パートナーシップ・プロジェクト (SPP) 事業 (北海道札幌藻岩高校)
- ③ 奥山正幸、木村淳夫: 独立行政法人科学技術振興機構・平成20年度サイエンス・パートナーシップ・プロジェクト (SPP) 事業 (北海道札幌藻岩高校)

(2) ホームページ等

<http://hecate.general.hokudai.ac.jp/welcome/top-page-jpn.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 淳夫 (KIMURA ATSUO)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 90186312

(2) 研究分担者

奥山 正幸 (OKUYAMA MASAYUKI)
北海道大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号: 00344490

(3) 連携研究者

なし