様 式 C－19、F－19－1、Z－19 （共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　5 年　5 月　2 日現在

機関番号：３２６６０
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０５８３０

研究課題名（和文）新規な酵素群β-1,2-グルカン関連酵素の機能構造解析と基質調製への利用

研究課題名（英文）Structural and functional analyses of novel beta-1,2-glucan associated enzymes and application for substrate preparation

研究代表者
中島　将博（Nakajima, Masahiro）

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・准教授

研究者番号：６０５８０７２７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Glycoside hydrolase (GH)ファミリー35のホモログよりβ-1,2-グルコシド結合に作用してグルコース単位を転移する新規活性を有する酵素を発見し、新規EC番号が付与された。また、この酵素の立体構造解析により結合位置特異性や加水分解反応が全くなく糖転移活性のみが生じる構造的要因を明らかにした。また、本研究対象であるGH1ホモログの機能構造解析によりこの酵素がβ-1,2-グルコオリゴ糖を本来の基質とする酵素であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
糖鎖の合成分解は糖鎖の代謝の理解や利用を進める上で必須である。本研究による新規な反応を触媒する糖転移酵素の発見はそれ自体が高い学術的意義を示すものであり、また、β-1,2-グルカン、β-1,2-グルコオリゴ糖に関連する新たな糖鎖の合成が可能になったことで、糖鎖の利用可能性を拡大したと言える。本研究ではGH1という最も主要なβ-グルコシダーゼのグループにβ-1,2-グルカン関連酵素が存在することを示した。学術的には糖質関連酵素の多様性を理解する確かな一歩であると言える。

研究成果の概要（英文）：A glycoside hydrolase (GH) family 35 homolog used in this study was found to be a novel enzyme that acts on β-1,2-glucosidic bond and transfers glucose units. This enzyme was given a new EC number. Structural analysis of this enzyme revealed structural factors that contribute to linkage position specificity and why only transglycosylation was catalyzed without hydrolysis. In addition, structural and functional analyses of the GH1 homolog, an enzyme used in this study, revealed that this enzyme is an β-glucosidase preferring β-1,2-gluco-oligosaccharide as natural substrates.

研究分野：酵素学、構造生物学、糖鎖工学

キーワード：β-1,2-glucan　β-1,2-glucanase　transglycosidase　β-glucosidase

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景
　糖鎖の構造は非常に多様性に富んでおり、エネルギー源としてだけでなく、細胞壁、細胞骨格、感染や免疫応答などの生物間の相互作用といった生命現象に重要な様々な役割を担っている。そして、その糖鎖構造の複雑さに応じて糖鎖の合成や分解を行う酵素群も多種多様に存在している。しかし、糖鎖の希少さや調製の困難さゆえにこの酵素群は現在でも一部しか知り得ていないと考えられる。β-1,2-グルカンも希少な糖鎖の一つであり、この糖鎖に作用する酵素群については 10 年ほど前まで分解酵素として同定された遺伝子はなかった。β-1,2-グルカンをエンド型で分解する細菌由来β-1,2-グルカナーゼ（SGL）が同定されたことにより、β-1,2-グルカン関連酵素群という未知領域が広く存在する可能性が示唆された。

２．研究の目的
　β-1,2-グルカンは自然界では環状糖として主に存在しており、セルロースなどの同じくグルコースから構成される糖鎖と違って高い水溶性を示すなど大きく異なる物性を有しており、有用な機能を有する可能性がある。しかし、この環状糖を定量するための比色法は開発されていないために、この環状糖の合成能や合成量を簡便に評価することができず、この環状糖の利用開発の妨げの一因となっている。そこで、本研究ではβ-1,2-グルカン関連酵素の候補から、環状β-1,2-グルカンの比色定量用基質の合成に資する可能性の高い酵素 2 種を本研究対象とした。
　一つは糖質加水分解酵素ファミリー（GH）35 に属するホモログである。GH35 は主にβ-ガラクトシダーゼが含まれるファミリーであるが、温泉より単離された *Ignavibacterium album* 由来の SGL ホモログをコードする遺伝子の遺伝子クラスターに GH35 ホモログ（IgSGT）をコードする遺伝子が含まれることを見出した。そのため、このホモログが新規な酵素機能を有することが期待され、予備的な実験ではβ-1,2-グルコオリゴ糖に対して糖転移活性を示す結果を得ており、糖鎖伸長へ利用できる可能性が期待された。
　もう一つは GH1 に属するホモログである。GH1 はβ-グルコシダーゼを含む最大のファミリーであるが、β-1,2-グルカンやβ-1,2-グルコオリゴ糖の代謝に関わるとされるβ-グルコシダーゼの報告は皆無である。しかし、放線菌 *Streptomyces griseus* 由来 GH1 ホモログ（SgBGL）をコードする遺伝子はβ-1,2-グルコオリゴ糖結合サブユニットのホモログを含む ABC トランスポーターをコードする遺伝子と遺伝子クラスターを形成していることを見出した。そのため、このホモログはβ-1,2-グルカンやβ-1,2-グルコオリゴ糖に作用することが期待される。また、GH1 に属するβ-グルコシダーゼは比較的基質特異性が緩く、β-グルコシド以外のグリコシドに作用することが多いため、非還元末端側にβ-グルコシダーゼで分解されないブロックの付加に利用できることが期待された。
　これら２個のホモログの機能構造解析を行うことで、機能構造相関を明らかにするとともに、これらの酵素を用いて還元末端側に発色団、還元末端側にβ-グルコシダーゼで分解されないブロックが付加された環状糖合成酵素の定量用基質の合成を試みることを本研究の目的とした。

３．研究の方法
　IgSGT，SgBGL の両方について大腸菌株 BL21(DE3)を宿主として組換え酵素の生産を行った。生産した組換え酵素はニッケルアフィニティーカラムにより精製を行い、X 線結晶構造解析のための結晶化や機能解析に使用した。

（X 線結晶構造解析）結晶化条件の一次スクリーニングは一次スクリーニング用キットを用いて行い、結晶が得られる条件を抽出した。この得られた条件を基に二次スクリーニングを行い結晶化条件の最適化を行った。高エネルギー加速器研究機構にて結晶は X 線を照射して回折データを取得した。IgSGT の場合、メチオニンをセレノメチオニンに置換した結晶用い、SAD 法によって初期位相を決定した。SgBGL では配列相同性の高いホモログの既知構造をモデルとした分子置換法によって初期位相を決定した。CCP4 の各種プログラムをモデル構築、自動または手動での構造の精密化に用いた。各種基質との複合体構造は基質を含むクライオプロテクタント溶液へ結晶を浸すソーキング法を用いることによって取得した。

（機能解析）IgSGT については、薄層クロマトグラフィー（TLC）により各種グルコオリゴ糖を中心とした基質に対する基質特異性、反応様式を調べた。顕著な転移反応が見られたβ-1,2-グルコオリゴ糖に対しては、生成物を単離精製し、NMR により生成物の化学構造を同定した。活性が見られた基質を中心に比色定量法によってこの酵素の活性を定量した。IgSGT は糖転移酵素であったため、糖転移反応産物の片方を定量する方法を各基質に対して検討し、それらの方法を用いて糖転移活性の測定を行った。また、配糖体をアクセプターとして糖転移反応を行った際の生成物については ESI-MS を用いて分子量の測定も行った。SgBGL については、*p*-ニトロフェニル

(pNP)糖やβ-結合を有するグルコオリゴ糖を用いてカイネティック解析を行い、基質特異性の評価を行った。さらに、求核触媒残基の変異体を作成し、グライコシンターゼ反応を用いた糖鎖合成を試みた。

４．研究成果

（１）GH35 ホモログ IgSGT の機能構造解析

IgSGT については大腸菌 BL21(DE3)株を宿主とした発現系の構築に成功し、ニッケルアフィニティーカラムによる精製に成功した。ソホロース（β-1,2-グルコ二糖）に対して IgSGT を作用させたところ、TLC により糖転移産物が検出された。他の重合度のβ-1,2-グルコオリゴ糖に対しても糖転移活性を示し、長時間反応によって全体的な重合度の低下が目視では確認できないため、IgSGT は加水分解活性がなく糖転移活性のみを示す酵素であることが予想された。β-1,2-結合のグルコオリゴ糖以外では活性は見られず、IgSGT はβ-1,2-グルコオリゴ糖に特異的であった。そこで、ソホロトリオース（β-1,2-グルコ三糖）を基質として用いて酵素反応を行い、生成した 4 糖を精製して ^{1}H-NMR を行ったところ、標準のβ-1,2-グルコ四糖と同じケミカルシフトであったため、IgSGT は糖転移によりβ-1,2-結合を生成することが示された。

次に、IgSGT の活性を比色法により定量的に決定することとした。ソホロトリオースに対する IgSGT の加水分解活性をグルコース定量法により調べたところ活性が検出されなかったことから IgSGT は加水分解活性を全く示さないことが明らかとなった。また、本研究により確立した糖転移活性の比色定量法によりβ-1,2-グルコオリゴ糖に対する糖転移活性のカイネティックパラメーターを調べたところ、明確な糖転移活性を示すデータは得られたものの GH 酵素群の酵素としては特に K_m 値が非常に大きく、ドナーとアクセプターの少なくともどちらか一方としては本来の基質でないことが示唆された。そこで、ドナーをソホロースとして固定し、各種オリゴ糖、配糖体をアクセプターとして探索したところ、様々なグルコシド配糖体に対して明確な糖転移活性を示すことが TLC により明らかとなった。興味深いことにα-アノマー、β-アノマーのどちらのアノマーのグルコシドの配糖体も十分な活性を示すアクセプターに含まれていた。そこで、各種グルコシド配糖体をアクセプターとしてカイネティックパラメーターを調べたところ、GH 酵素として一般的な範囲のパラメーターとなったため、グルコシド配糖体が IgSGT の本来のアクセプターであることが示された。また、ドナーとしてソホロース、ソホロトリオースに対するカイネティックパラメーターを調べたところ、明らかにソホロースに対して高い活性を示した。

IgSGT の立体構造は 2.0 Å 以上の高分解能でリガンドフリー構造、各種基質との複合体構造を取得した。これにより、IgSGT が上記の基質特異性を示す構造的要因を説明することができた。IgSGT のリガンドフリー構造では Arg349 がサブサイト+1 と離れた位置に存在していたが、ソホロースとの複合体においてソホロースはサブサイト+1 と−1 に結合し、Arg349 はサブサイト+1 のグルコース部分と 3 箇所のヒドロキシ基と水素結合していた。このことから、IgSGT はサブサイト+1 にグルコシドが結合しないと反応が起こらない、つまり、加水分解活性が生じないものと考えられた。また、サブサイト+1 は全てのヒドロキシ基が IgSGT によって認識されており、β-1,2-グルコシドに対して特異的であることと対応していた。一方で、IgSGT の E343Q 変異体とソホロースとの複合体ではソホロースはサブサイト+1 と+2 に結合していた。IgSGT の野生型とソホロースとの複合体ではサブサイト−1 に結合しているグルコース部分は E102 によって認識されていたが、E343Q 変異体との複合体の場合、E102 の側鎖の向きが大きく異なっていた。E102 の側鎖の位置が IgSGT の野生型とソホロースとの複合体の状態の場合、サブサイト+2 のグルコース部分の 3 位ヒドロキシ基が E102 の側鎖とやや立体障害となる位置関係となる。そのため、β-1,2-グルコオリゴ糖がアクセプターとして IgSGT に結合する場合、必ずサブサイト+2 に結合する必要がある。これは、β-1,2-グルコオリゴ糖に対する K_m 値が非常に大きくなることと合致しており、β-1,2-グルコオリゴ糖は本来のアクセプター基質ではないものと言える。一方、IgSGT と各種グルコシド配糖体との複合体構造を取得したところ、グルコース部分はサブサイト+1 に結合していたが、アグリコン部分はサブサイト+2 ではなく、その近傍の疎水的な空間に結合していた。また、この疎水的な空間を形成する領域は各種配糖体によって 3 種類の構造に分かれており、アグリコン部分の大きさなどによってこの領域が柔軟に動くことで様々な配糖体をアクセプターとして受け入れることが可能になっていると考えられた。

IgSGT を用い、pNP-α-グルコピラノシドをアクセプター、ソホロースをドナーとして酵素反応を行ったところ、pNP にソホロース以上が結合した生成物が ESI-MS により検出された。1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼはソホロースをアクセプターとした伸長反応を行うことができるため、pNP が還元末端側に付加したβ-1,2-グルコオリゴ糖やβ-グルカンの合成は可能であると考えられる。

（２）GH1 ホモログ SgBGL の機能構造解析

SgBGL についても IgSGT と同様に大腸菌 BL21(DE3)株を宿主とした発現系の構築に成功し、ニッケルアフィニティーカラムによる精製に成功した。この精製酵素を用いて pNP 糖を基質としてカイネティックパラメーターを調べたところ、SgBGL は pNP-β-グルコピラノシドに対して最も高い活性を示し、pNP-β-D-フコピラノシド、pNP-β-ガラクトピラノシドに対しても十分な活性を示した。そこで、β-結合のグルコ二糖に対する活性を調べたところ、ソホロースに対して

最も高い活性を示し、ラミナリビオースに対しても高い活性を示したが、セロビオースとゲンチオビオースに対してはかなり低い活性しか示さなかった。また、ラミナリトリオースに対する活性を調べたところ、ほとんど活性を示さなかったことから、β-1,2-グルコオリゴ糖に対するカイネティックパラメーターを調べた。その結果、二糖から四糖までは同程度の活性を示し、五糖に対しては基質阻害が見られたために V_{max} 値は他の３つの基質よりも小さかったものの V_{max}/K_m 値は他の３つの基質と同程度の値を示した。また、ラミナリビオースに対するカイネティックパラメーターも調べたたが、非常に大きい K_m 値を示した。以上より、SgBGL はβ-1,2-グルコオリゴ糖に特異的な酵素であることが明らかとなった。

SgBGL については 2.0 Å 程度の分解能でリガンドフリー構造とソホロースとの複合体構造の取得に成功した。ソホロースはサブサイト+1 と−1 に結合していた。複合体構造では非対称単位に４分子の SgBGL が観察されたが、基質ポケット部分の温度因子が各分子によって大きく異なっていた。この領域の温度因子が一番小さい分子ではサブサイト−1 のグルコース部分のコンフォメーションは chair 型となっていた。一方で、これよりも大きい温度因子を示す分子では同じ部分のコンフォメーションは skew boat 型となっており、基質の形状からこの分子はミカエリス複合体となっていることが示唆された。一番温度因子の大きい分子ではこの部分は同じく skew boat 型であったが、基質のサブサイト+1 の部分の電子密度はほぼ観察することができなかった。以上より複合体構造中の分子は、基質が結合した直後から分解に至るまでのいくつかの状態を表しているものと考えられる。

SgBGL の求核触媒残基をグリシンに置換した変異体を用いてフッ化グルコシドをドナーとしてグルコースに対する活性を調べたところ、二糖の生成が確認された。しかし、フッ化グルコシドの加水分解活性、フッ化グルコシドがアクセプターとなる転移反応が検出され、目的とする活性の効率は低かった。この理由としては、サブサイト+1 のグルコース部分の水素結合による認識が少ないために糖転移活性の際にアクセプターが適切な位置に結合しづらいからと考えられた。今後はグライコシンターゼによりガラクトシドを付加可能な条件や変異体の探索と検討を行う予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2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 Kaito Kobayashi, Hisaka Shimizu, Nobukiyo Tanaka, Kouji Kuramochi, Hiroyuki Nakai, Masahiro Nakajima, Hayao Taguchi	４．巻 298
２．論文標題 Characterization and structural analyses of a novel glycosyltransferase acting on the β-1,2-glucosidic linkages	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Journal of Biological Chemistry	６．最初と最後の頁 101606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.101606	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 Nakajima Masahiro	４．巻 Special Issue
２．論文標題 β-1,2-Glucans and associated enzymes	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Biologia	６．最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11756-022-01205-5	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3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 小林海渡、清水久佳、中島将博、田中信清、倉持幸司、中井博之、田口速男
２．発表標題 グルコシド配糖体をアクセプターとする新規糖転移酵素の機能構造相関
３．学会等名 日本蛋白質科学会
４．発表年 2022年

１．発表者名 小林海渡、田口速男、中井博之、中島将博
２．発表標題 糖転移反応を触媒するglycoside hydrolase family 35酵素の機能構造解析
３．学会等名 PF量子フェスタ
４．発表年 2021年

１．発表者名 熊倉 悠人, 中井 博之, 中島 将博
２．発表標題 放線菌Streptomyces griseus由来GH1 β-グルコシダーゼホモログの機能構造解析
３．学会等名 日本応用糖質科学会2022年度大会（第71回）
４．発表年 2022年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

プレスリリース グルコースが連なったオリゴ糖に作用する新規な糖転移酵素の発見 https://www.tus.ac.jp/today/archive/20220303_4114.html

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