

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 1日現在

機関番号： 10101
 研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2009 ~ 2012
 課題番号： 21405020
 研究課題名 (和文) アジア熱帯域、特にタイにおける「スクロース・ワールド」構成メンバーの調査研究
 研究課題名 (英文) Survey on members of sucrose-world in Asian tropical reef, namely in Thailand
 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)： 植物が光合成で作る同化澱粉は、ショ糖に転換される。植物はショ糖を色々な組織から分泌し、微生物や昆虫など (環境生物) とクロストークするが、最近、その量が膨大であることが分った (この系を「スクロース・ワールド」と仮称)。本研究の目的は、花や根を対象にスクロース・ワールドのメンバー (環境生物と酵素) を調査することであり、特に糖質に着眼した研究を光量の大きなタイで行った。その結果、根から放出されたショ糖に関し「ショ糖→多糖→二次・三次転換体」に関わる菌株や酵素を明らかにできた。花バチやミツアリについては「ショ糖→蜜・オリゴ糖」の生成酵素を調べた。

研究成果の概要 (英文)： Plants synthesize the starch in the leaves by photosynthesis. Leaf-starch is converted to sucrose, and transported to storage organ (e.g., tubers and fruit-bodies), followed by re-formation of starch (storage-starch). From many sites of bodies, plants secrete sucrose, by which plants perform the cross-talk with environmental organisms (e.g., microorganisms and insects). Recently, it was found that huge amount of sucrose was secreted (this system is call as sucrose-world). The purpose of this research is survey of sucrose-world-members (environmental organisms and their enzymes) in Thailand, where high sunshine is available. As a result, the system of "sucrose -> polysaccharide -> secondary or ternary sugar" was investigated at sucrose secreted from roots. About flower bee, the enzyme converting sucrose to oligosaccharide was also investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：生物化学

科研費の分科・細目：農学 A・応用生物化学

キーワード：ショ糖、分泌、生物間相互作用

1. 研究開始当初の背景

葉中で光合成された同化澱粉は、ショ糖に変換される。その一部は直接的に外部に放出される。例えば、花や茎での分泌は多くの昆虫を集め、受粉や防御に利用される。一方「ショ糖は根からも土壤に分泌」されるが、最近、

大量であることが判明した。すなわち、1日の光合成で生産される同化澱粉の10~20%が土壤中に放出される (植物種により30%もある)。この事実は、地球を被う緑地にショ糖の大量供給がなされる世界があることを意味する。まさに「スクロース・ワールド」である。

この現象は、多様な切り口を持つ研究者のアプローチを可能とし、多彩な基礎・応用研究の対象となる。我々は、糖質に根ざした研究課題を提案したい。以下に詳細を述べる。

(1) 根からのショ糖放出：ショ糖は、ブドウ糖と果糖から成る非還元性2糖である。生化学的にはブドウ糖と果糖の結合エネルギーは大きく、UDP-グルコースなどの糖ヌクレオチドに匹敵する。従って、ショ糖のブドウ糖や果糖部分から α -グルカン（デキストランなど）やフラクタン（レバンなど）を合成する土壤細菌が存在する。ショ糖を菌体内でUDP-グルコースやUDP-ガラクトースなどに転換し、多糖合成する例もある。第1の課題は、ショ糖を多糖に変換する土壤微生物や酵素の調査を行う、である。注目すべきは、多糖合成が菌体外で行われる点にある。すなわち、多糖を他の糖質（二次転換体と仮称）に変換し、二次転換体をさらに三次転換体に通ずる微生物群の存在が示唆される。第2の課題は、合成された多糖を他の糖質に転換する微生物や酵素の調査、である。気温が高いタイにおける調査に、耐熱性に優れた転移酵素の取得を求めたい。このように、植物が生息する土壤が、微生物を介した糖質転換系の場合（ショ糖を起点）と捉えられる点は興味深く、太陽光量の点でショ糖供給が大きいタイで糖質転換系の把握を図りたい。

(2) 花からのショ糖分泌：蜜腺のショ糖を利用する昆虫は多いが、花バチを対象としたい。その理由は、花バチは花蜜（主成分はショ糖）を炭素源・花粉を窒素源とする「花に依存し進化」した点にある。すなわち、10~20%の高濃度ショ糖を含む花蜜に、自らの加水分解酵素を加えブドウ糖と果糖にする生化学反応で蜂蜜を完成する（ミツバチの例）。最近、針ナシバチの蜂蜜にショ糖からオリゴ糖を生成する酵素が見出された。タイには日本にいない花バチが多数生息する。第3の課題は、花蜜ショ糖をオリゴ糖に変換する花バチやその蜂蜜の酵素を取得するための調査を行う、である。タイには、集めた花蜜を体内に貯蔵するアリ（ミツアリ）が存在するため、ミツアリの蜜や酵素も調査対象に加える。

2. 研究の目的

本申請の目的は、太陽光量の点で光合成量が大きいタイで「ショ糖→多糖→二次・三次転換体」を調査し、応用研究への基盤形成を図ることである。以下に具体的な目的を示す。

(1) 「ショ糖→多糖」の系：① 調査植物・微生物取得：ショ糖を組織に蓄積するサトウキビとウチワヤシを対象に根の表面・周辺土壤を採取する。ショ糖のみを炭素源とした培地で多糖合成菌を取得し、菌種を決定する。② 多糖の構造：多糖を大量精製・構造決定を行う。③ 多糖合成酵素：多糖の合成酵素を

精製・性質解析する。④ 季節変動：タイの乾季と雨季に調査を行う。

(2) 「多糖→二次・三次転換体」の系 ① 微生物取得：得られた多糖を炭素源とした培地を用い、その変換菌（「多糖→二次転換体」の変換）を前項の土壤から取得する。② 二次転換体：変換菌が生産する二次転換体であるオリゴ糖を精製・構造決定する。③ 二次転換体の生成酵素：オリゴ糖を与える酵素の精製・性質解析する。④ 三次転換体：三次転換体（オリゴ糖）を与える微生物や酵素を取得する。オリゴ糖の精製と構造決定を行い、酵素精製と性質解析を試みる。

(3) 花バチとミツアリ ① 昆虫と蜜の採集：タイの花バチとミツアリの成虫と蜜を採取する。② 蜜のオリゴ糖：蜜からオリゴ糖を精製・構造決定する。③ オリゴ糖の生成酵素：蜜と成虫からオリゴ糖の生成酵素を精製し性質解析する。

3. 研究の方法

計画の概要は、植物の光合成量が大きいタイにおいて、スクロース・ワールドを調査することである。

(1) 土壤試料：

① 調査植物からの土壤採取：サトウキビとウチワヤシを選び、根の表面土壤や周辺土壤を採取する。地上部近傍の根・根の先端・その中間地点、の3部分の土壤を対象とする。

② 季節変動：タイの雨季と乾季を調査時期に選ぶ。雨季（降雨で土壤のショ糖・微生物叢の移動が大きい）は、多糖で根に強く固着する細菌を調査でき、乾季（降雨による移動が少ない）は「多糖→二次・三次転換体」を行う細菌を採取できる可能性が高い。

(2) 「ショ糖→多糖」の転換系：

① 多糖合成細菌：根自体や土壤を滅菌水に懸濁し、ショ糖を唯一の炭素源とした寒天培地（無機窒素、ミネラル、酵母エキスを含む）で培養し、多糖を生産する土壤細菌を単離する。次に16S rRNA配列などから菌種を決定する。ヒトに有害な土壤細菌を取得する危険性があり、菌種同定は重要である。

② 多糖の精製と構造：液体培養で多糖を生産させ、精製する。単糖分析・メチル化分析・NMRなどで構造を推定する。

③ 多糖合成酵素：多糖の合成酵素活性を菌体外と菌体内で調べ、精製を行う。精製標品については性質を解析する。

(3) 「多糖→二次・三次転換体」の系：

① 微生物の取得：前項と同じスクリーニング法を用いるが、大量に調製した多糖を寒天培地の炭素源とする。ハロー形成を「多糖→二次転換体（オリゴ糖）」の指標とする。

② 二次転換体とその生成酵素：取得した微生物が産するオリゴ糖を精製し、構造を決定する。オリゴ糖の生成酵素を精製し、性質を

調べる。

③ 三次転換体：二次転換体を唯一の炭素源とした(2)①項の操作で、三次転換体を与える微生物を取得する(二次転換体の資化能力の有無を指標)。三次転換体を単離し構造を決定する。二次転換体に対する活性を基に酵素単離を行い、性質を調べる。特に、耐熱性が高い長鎖オリゴ糖生成酵素(転移酵素)については、2糖を基質としたTLCを行い、丹念に存在を確認する。

(4) 花バチとミツアリ：

① 試料採集：タイ研究者の協力で、花バチとミツアリの成虫と蜜を採集する。

② オリゴ糖と生成酵素：蜜からオリゴ糖を精製し、構造を決定する。蜜と成虫からオリゴ糖の生成酵素を単離し、性質を解明する。

4. 研究成果

(1) 土壌試料の採集：

① 採集部位と採集時期：サトウキビに関し採集部位の影響はなかった。ウチワヤシは根長が大きく水平分布の調査としたが、大きな変化は認められなかった。乾期と雨期における調査を行った。雨期は乾期に比べ、多数の多糖合成菌が得られる傾向が認められた。雨期期間の降雨により土壌のショ糖・微生物叢の移動が大きいことが理由と思われた。

(2) 「ショ糖→多糖」合成：

① 合成細菌の取得・同定：炭素源をショ糖にした寒天培地(他は無機塩)を用いて多数の多糖合成菌を得た。特に合成能力の強い菌種の同定を行い、2株の *Rhizobium* sp.と *Leuconostoc* sp.が得られた。

② 多糖の精製と構造：それぞれの株で多糖生成の至適条件(培地組成)を決定し、大量生産を行った。構造解析に供したところ、*Rhizobium* sp.の1株が産した多糖はβ-グルカンであり、他方の *Rhizobium* sp.株のそれはガラクトグルカンであった。また、*Leuconostoc* sp.はデキストラン様のα-グルカンを生産することが判明した。

③ 多糖合成酵素：*Rhizobium* sp. 2株の合成酵素は菌体表面に存在するので、菌体破砕液から精製を行い、部分精製酵素を得た後、性質を調べた。*Leuconostoc* sp.は培地上清を酵素源として精製を行った。部分精製標品を得たので、性質を調べた。*Leuconostoc* sp.の酵素はショ糖を基質に多糖を生産した。

(3) 「多糖→二次・三次転換体」の系：

① 微生物の取得：本プロジェクトの比較的早い時期に得られた *Leuconostoc* sp.について検討を行った。本菌が産するデキストラン様多糖を炭素源とし、ハロー形成を指標に菌株のスクリーニングを行った。単コロニー分離後に *Bacillus* sp.と同定した。

② 二次転換体とその生成酵素：デキストラン様多糖からイソマルトオリゴ糖が生成さ

れた。本酵素を精製し性質を調べ、デキストラナーゼであることが判明した。

③ 三次転換体：イソマルトオリゴ糖(二次転換体)から三次転換体を与える微生物を取得し *Bacillus* sp.と同定した。三次転換体は二次転換体より鎖長が長く、不均一化反応を触媒する新規な酵素と考えられたため、単離を行った。その結果、予想通り不均一化酵素が得られた。

(4) 花バチとミツアリ：

① 試料採集：花バチ・ミツアリの生息地に行き、成虫と蜜を採集した。ミツアリの蜜は微量であったが、一定量確保できた。

② オリゴ糖と生成酵素：それぞれの蜜からエルコースと推定できるオリゴ糖が得られた。成虫からはα-グルコシダーゼが得られたため、本酵素がオリゴ糖生成を行うと推察した。

③耐熱性が高い新規な転移酵素：サトウキビやウチワヤシの根周辺土壌の懸濁液を熱処理したサンプルをスクリーニングの対象とし、候補となる菌株を得た。

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17件)

全ての雑誌論文は査読有り。

① Tagami T, Tanaka Y, Okuyama M, Mori H, Kimura A: Enzymatic synthesis of acarviosyl-maltoooligosaccharides using disproportionating enzyme 1. **Biosci Biotechnol Biochem** 77(2): 312-319, 2013.
doi.org/10.1271/bbb.120473

② Kaewmuangmoon J, Kilaso M, Leartsakulpachich U, Kimura K, Kimura A, Chanchao C: Expression of a secretory α-glucosidase II from *Apis cerana indica* in *Pichia pastoris* and its characterization. **BMC Biotechnol** 13:16, 2013.
doi: 10.1186/1472-6750-13-16.

③ Shinoki A, Lang W, Thawornkuno C, Kang HK, Kumagai Y, Okuyama M, Mori H, Kimura A, Ishizuka S, Hara H: A novel mechanism for promotion of quercetin glycoside absorption by megalo α-1,6-glucosaccharide in the rat small intestine. **Food Chem** 136(2):293-296, 2013.
doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.028

④ Kaewmuangmoon J, Yoshiyama M, Kimura K, Okuyama M, Mori H, Kimura A, Chanchao C: Characterization of some enzymatic properties of recombinant α-glucosidase III from the Thai honeybee, *Apis cerana indica* Fabricus. **Afr J Biotechnol** 11(96):16220-16232, 2012.
doi: 10.5897/AJB12.2402

- ⑤ Ngiwsara L, Iwai G, Tagami T, Sato N, Nakai H, Okuyama M, Mori H, Kimura A: Amino acids in conserved region II are crucial for substrate specificity, reaction velocity, and regioselectivity in transglucosylation of honeybee GH-13 α -glucosidases. **Biosci Biotechnol Biochem** 76(10) 1967-1974, 2012. doi.org/10.1271/bbb.120473
- ⑥ Kim YM, Eiji Y, Kang MS, Nakai H, Saburi W, Okuyama M, Mori H, Funane K, Kim D, Kimura A: *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI- 5482 glycoside hydrolase family 66 homolog catalyzes dextranolytic and cyclization reactions. **FEBS J** 279(17): 3185-3191, 2012. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08698.x
- ⑦ Suzuki R, Terasawa K, Kimura K, Fujimoto Z, Momma M, Kobayashi M, Kimura A, Funane K: Biochemical characterization of a cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase from *Paenibacillus* sp. 598K. **Biochim Biophys Acta** 1824(7), 919-924 2012. doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.04.001
- ⑧ Kim YM, Saburi W, Yu S, Nakai H, Maneesan J, Kang MS, Chiba S, Kim D, Okuyama M, Mori H, Kimura A: α -Glucosidase-catalyzed novel reaction on 1,5-anhydrofructose, suggesting new metabolic pathway for production of glucose from starch. **J Biol Chem** 287(27): 22441-22444 2012. doi: 10.1074/jbc.C112.360909
- ⑨ Kim YM, Kiso Y, Muraki T, Kang MS, Nakai H, Saburi W, Lang W, Kang HK, Okuyama M, Mori H, Suzuki R, Funane K, Suzuki N, Momma M, Fujimoto Z, Oguma T, Kobayashi M, Kim D, Kimura A: Novel dextranase catalyzing cycloisomaltooligosaccharide-formation and its identification of catalytic amino acids and their functions using chemical rescue approach. **J Biol Chem** 287(24): 19927-19935, 2012. doi: 10.1074/jbc.M111.339036
- ⑩ Suzuki N, Kim YM, Fujimoto Z, Momma M, Okuyama M, Mori H, Funane K, Kimura A: Structural elucidation of dextran degradation mechanism by *Streptococcus mutans* dextranase belonging to glycoside hydrolase family 66. **J Biol Chem** 287(24): 19916-19926, 2012. doi: 10.1074/jbc.M112.342444
- ⑪ Chantarudee A, Phuwapraisirisan P, Kimura K, Okuyama M, Mori H, Kimura A, Chanchao C: Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. **BMC Complem Altern Med**, 12: 45-45, 2012. doi:10.1186/1472-6882-12-45
- ⑫ Suzuki N, Kim YM, Fujimoto Z, Momma M, Kang HK, Funane K, Okuyama M, Mori H, Kimura A: Crystallization and preliminary crystallographic analysis of dextranase from *Streptococcus mutans*. **Acta Crystallogr F** F67: 1542-1544, 2011. doi:10.1107/S1744309111038425
- ⑬ Kang HK, Kimura A, Kim D: Bioengineering of *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrases that gives selected bond formation for glucan synthesis and/or acceptor-product synthesis. **J Agric Food Chem** 59(8): 4148-4155, 2011. doi.org/10.1021/jf104629g
- ⑭ Kim YM, Kimura A, Kim D: Novel quantitative method for the degree of branching in dextran. **Food Sci Biotechnol** 20(2): 537-541, 2011. doi:10.1007/s10068-011-0075-9
- ⑮ Ryu 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(5):212-215, 2010. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.07.006
- ⑯ Opassiri R, Maneesan J, Akiyama T, Pomthong B, Jin S, Kimura A, Ketudat-Cairns JR: Rice Os4BGlu12 is a wound-induced β -glucosidase that hydrolyzes cell-wall- β -glucan-derived oligosaccharides and glycosides. **Plant Sci** 179(3):273-280, 2010. doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.05.013
- ⑰ Kang MS, Okuyama M, Mori H, Kimura A: The first α -1,3-glucosidase from bacterial origin belonging to glycoside hydrolase family 31. **Biochimie** 91(11-12): 1434-1442, 2009. doi.org/10.1016/j.biochi.2009.07.018
- [学会発表] (計 10 件)
- ① Tagami T, Tanaka Y, Mori H, Okuyama M, Kimura A: Enzymatic synthesis of acarviosyl-maltooligosaccharides and their inhibitory effects on α -glucosidase. 26th Internal Carbohydrate Symposium. July 22-27, 2012, Madrid City Centre (Madrid, Spain).
- ② Ngiwsara L, Iwai G, Mori H, Okuyama M, Kimura A: Amino acid residues in conserved region II involved in specific function of European honeybee (*Apis mellifera*) α -glucosidase isozymes. 26th Internal Carbohydrate Symposium. July 22-27, 2012, Madrid City Centre (Madrid, Spain).
- ③ Mori H, Kim D, and Kimura A (他 15 名 18 番 目) : Molecular mechanism of glycosylases catalyzing megalosaccharide production. BIT's

- 3rd Inaugural Symposium on Enzymes & Biocatalysis-2012, Xian Qujiang International Conference Center (Xian, China), April 28, 2012. (招待講演)
- ④ Kim YM, Mori H, Kimura A (他 14 名 17 番目) : Molecular anatomy of α -1,6-glucoside-forming and -hydrolyzing enzymes, comprising megalosaccharide-producing enzyme. 2011 CAB Agricultural Biotechnology Symposium on Agricultural Biomaterials for Next Generation, August 25th 2011, Seoul National University (Seoul, Korea). (招待講演).
- ⑤ Kimura A: Molecular Mechanism of novel enzymes degrading and forming α -1,6-glycosidic linkages, including megalosaccharide production. The 78th Annual Meeting and International Symposium in 2011 Annual Conference of Korean Society of Food Science and Technology. June 9th, 2011, Daegu Exhibition Convention Center (Daegu, Korea).
- ⑥ Mori H, Nakai H, Kimura A (他 7 名 10 番目): Enhancement of GH66 dextranase activity by truncation of N- and C-terminal variable regions, suggesting proenzyme-like activation. 9th Carbohydrate Bioengineering Meeting. May 15-18, 2011, Calouste Gulbenkian Foundation (Lisbon, Portugal).
- ⑦ Mori H, Kimura A (他 4 名 6 番目) : 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)
- ⑧ Suzuki R, Kimura A (他 4 名 5 番目) : Biochemical characterization of a novel cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase (CITase) from *Paenibacillus* sp. 598K. Plant Polysaccharide and Applied Glycoscience Workshop 2010, July 29-31, 2010, Sasagawa Hall (Tokyo, Japan).
- ⑨ 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, 静岡県立コンベンションアーツセンターグランシップ (静岡).
- ⑩ Wongchawalit J, Hashidoko Y, Okuyama M, Mori H, Chiba S, Kimura A: Preliminary structure determination of water insoluble polysaccharide extracted from soil bacteria. 8th Carbohydrate Bioengineering Meeting, May 10-13th, 2009 Hotel Continental Terme and Congress Hall (Naples, Italy).

[その他]

(1) アウトリーチ活動情報

- ① 森 春英, 木村 淳夫: 独立行政法人科学技術振興機構・平成 24 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 森 春英, 木村 淳夫: 独立行政法人科学技術振興機構・平成 23 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 森 春英, 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)
- ④ 森 春英, 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)

(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

森 春英 (MORI HARUHIDE)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 80241363