

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05388

研究課題名(和文) 糖質の効率的変換に有用な糖質異性化酵素の構造基盤の解明と機能強化

研究課題名(英文) Molecular basis and functional modulation of carbohydrate epimerases and isomerases useful for carbohydrate conversion

研究代表者

佐分利 亘 (Wataru, Saburi)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00598089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖質異性化酵素は糖質の酵素合成の多様化・高度化に欠かせない。本研究ではセロビオース2-エピメラーゼ(CE)の反応特異性の分子基盤の解明とマンノース2-エピメラーゼ(ME)の構造と機能の関係ならびに高活性化による実用的酵素の開発を目的とした。CEでは、触媒ドメインのN末端側の4本の $\alpha$ -ヘリックスからなる領域にイソメラーゼ活性に重要な構造が含まれること、還元末端の糖との相互作用残基Asnの小さなアミノ酸への置換がイソメラーゼへの特異性を飛躍的に高めることを明らかにした。MEについては高活性変異酵素の取得には至らなかったが、結晶構造を決定して、基質特異性に重要な構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では糖質の合成の多様化に貢献する糖質異性化酵素が示す反応特異性や基質特異性に関する分子機構の一端を解き明かすことができた。マンノース2-エピメラーゼの構造は本研究により初めて明らかにされたものであり、本酵素の基質特異性の分子基盤が解明されたことの学術的意義は大きい。また本研究で得られた知見は糖質のより高効率な合成酵素の開発や、合成される糖質の大量合成・機能解析へとつながるものと考えられ、機能性糖質の開発など応用に関する波及効果も大きく、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Carbohydrate epimerase/isomerases are essential for the diversification and sophistication of enzymatic synthesis of carbohydrates. In this study, two carbohydrate epimerases, cellobiose 2-epimerase (CE) and mannose 2-epimerase (ME) were studied: CE, the molecular basis of the reaction specificity; ME, the structure-function relationship and the development of practical enzymes with high specific activity. In CE, the four  $\alpha$ -helices at the N-terminal end of the catalytic domain were shown to contain structures important for isomerase activity. Additionally, the substitution of a small amino acid for Asn, involved in the formation of a hydrogen bond with sugar at reducing end, was shown to drastically enhance the reaction specificity for isomerization. Although a highly active mutant enzyme of ME was not obtained, the crystal structure of ME was successfully determined and structures important for substrate specificity was clarified.

研究分野：生物化学

キーワード：cellobiose 2-epimerase mannose 2-epimerase AGE superfamily carbohydrate mannose cellobiose

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。

## 1. 研究開始当初の背景

糖質は、構成単糖、結合様式、重合度などにより無限の構造多様性を持ち、様々な物理化学的、生物学的機能を示すことから、食品、医薬品、化成品に至る様々な産業で幅広く利用される。産業利用される糖質は、想定される膨大な分子種のごく一部に限られ、糖質の利用拡大に効率的合成法の開発が不可欠である。酵素を利用した糖質の合成は大規模化が容易である一方、「目的の糖質の合成に適した酵素」が絶対的に必要であり、適用範囲が限定的なことが問題である。農産物を含む自然界から大量に取得可能な糖質は、デンプン、セルロース、スクロース、ラクトースにはほぼ限定されるが、これらはいずれも Glc を含む。すなわち、豊富な Glc などの単糖骨格を希少単糖骨格へと変換することは糖質の多様化に有効であり、単糖のエピマー間やアルドース-ケトース間の変換を触媒する異性化酵素の利用が望まれる。

我々は、微生物の糖質代謝の多様性を支える代謝酵素に関する研究の中で、セロピオース 2-エピメラーゼ(セロピオースなど 1-4 二糖の還元末端 Glc 残基と Man 残基間のエピメリ化.; 以下 CE)、マンノース 2-エピメラーゼ(Glc-Man 間の新規エピメラーゼ; 以下 ME)、マンノースイソメラーゼ (Man-Fru 間の異性化; 以下 MI) などの糖質異性化酵素を様々な細菌より見出し、機能と構造に関する解析を進めてきた。これらの酵素は明確に異なる基質・反応特異性を示すが、類似した触媒ドメイン構造、活性中心構造を持ち、ファミリー (CE ファミリー) を形成する。このことは、“本ファミリー酵素が基本的構造を共有しながら局所的構造の多様化により機能的多様性を獲得”を意味し、局所的構造の改変による機能改変が可能と期待されるが、これらの酵素における明確な反応特異性の違い (イソメラーゼとエピメラーゼ) は、活性中心構造の高度な保存性のため、分子構造からの理解に至っていない。また、異性化酵素に限定されるわけではないが、酵素の利用において比活性が低いことは実用化の障壁となる。ME に関しては、触媒する反応は魅力的なものの、比活性が低いことが問題であり、高活性化が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖質合成技術の多様化・高度化により糖質の利活用をより一層充実させることを目的とし、CE ファミリー酵素を利用した糖質変換技術の発展・高度化を目指した。CE ファミリーメンバーについては、我々が、ME など新規酵素の発見から各種酵素の構造・機能相関研究に至る一連の研究を推進し、酵素の構造・機能に関する知見を集積してきた。本研究で注目したエピメラーゼとイソメラーゼの触媒機能を支える分子構造の理解・応用ならびに ME の高機能化を進める研究は、我々のこれまでの研究により蓄積された基盤的知見に立脚している。

## 3. 研究の方法

### (1) 組換えタンパク質の調製

目的タンパク質を pET-23a プラスミド由来発現プラスミドを用いて大腸菌 BL21(DE3)株を宿主として組換えタンパク質として生産した。組換えタンパク質を IPTG 存在下で生産し、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより電気泳動的に単一に組換えタンパク質を精製して解析に用いた。ただし、*Rhodothermus marinus* 由来 CE については、イオン交換カラムクロマトグラフィーと疎水性カラムクロマトグラフィーにより精製した。変異酵素遺伝子の調製は PCR により行った。

### (2) 酵素活性の測定

CE の活性測定では Glc -4Man と Glc -4Fru を基質とし、それぞれ生成した Glc -4Glc と Glc -4Glc+Glc -4Man を比色定量法により求めた。すなわち、Glc -4Glc の定量ではセロピオースホスホリラーゼ存在下でグルコース定量試薬を作用させ、Glc -4Glc+Glc -4Man の定量ではこれにさらに CE を添加した。ME の活性測定では、マンノースに対するエピメラーゼ活性により生じるグルコースをヘキソキナーゼ法により定量した。

### (3) ME の結晶構造の解析

ME の結晶を 4 M sodium formate 存在下で調製した。この結晶を 20%グリセロールを含む結晶化緩衝液中で凍結させ、SPring-8 BL45XU にて X 線回折強度のデータ収集を行なった。得られた回折データを用い、*Ruminococcus albus* CE の構造を用いた分子置換法により構造を決定した。グルシトールとの複合体の解析では 486 mM グルシトールを結晶化緩衝液に添加することで共結晶を調製して解析に用いた。

#### (4) 部位特異的飽和変異酵素の解析

部位特異的変異を導入した変異酵素を 0.25 mL スケールで大腸菌により生産させ、溶菌試薬により抽出した無細胞抽出液中の Glc -4Fru に対するイソメラーゼ活性を評価した。活性を示したクローンからプラスミド DNA を調製し、変異点の配列を解析した。決定された各変異酵素を精製して解析に用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) CE の反応特異性に重要な構造の解析

CE の中にはエピメラーゼ活性のみを示す酵素 (1 機能 CE) とエピメラーゼ活性に加えてわずかなイソメラーゼ活性を示す酵素 (2 機能 CE) が存在する。そこで、1 機能 CE である *Ruminococcus albus* 由来 CE と 2 機能 CE である *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 由来 CE の間で構造領域を入れ換えた一連のキメラ酵素を作製した。具体的には、( / )<sub>6</sub> パレルの触媒ドメインを構成する -ヘリックス 1 と 2, 3 と 4, 5 と 6, 7 と 8, 9 と 10, 11 と 12 について、*R. albus* 由来 CE の構造を *C. saccharolyticus* 由来 CE に移植した。これら 6 つのキメラ酵素のうち、最初の 3 つの変異酵素は活性型酵素として得られた。Glc -4Man (エピメラーゼ反応基質) と Glc -4Fru (イソメラーゼ反応基質) に対する初速度に基づき、*C. saccharolyticus* 由来 CE に *R. albus* 由来 CE の -ヘリックス 1 と 2, 3 と 4 を導入したキメラ酵素は *C. saccharolyticus* 由来 CE 野生型酵素よりも低いイソメラーゼ特異性を示した。すなわち、-ヘリックス 1 から 4 に至る領域にイソメラーゼ反応に重要な構造が含まれることが示唆された。

#### (2) CE の基質結合アミノ酸残基の反応特異性への寄与の解析

CE の基質結合部位の反応特異性への寄与の評価のため、還元末端糖残基の 2-OH 基と水素結合可能な位置に存在するアミノ酸残基に部位特異的飽和変異を導入し、反応特異性の変化を調べた。親酵素として *Rhodothermus marinus* 由来耐熱性 CE 酵素を用いた。各変異酵素のエピメラーゼ反応速度とイソメラーゼ反応速度をそれぞれ Glc -4Man と Glc -4Fru に対する初速度に基づき評価した。各変異酵素はいずれも野生型酵素よりも著しく低いエピメラーゼ反応速度を示したが、Asn196 変異酵素は、Ala をはじめとする Asn と同程度かより小さな側鎖を持つアミノ酸への置換によりイソメラーゼ反応速度は大きく低下せず、野生型酵素より著しく高いイソメラーゼ反応への特異性を示した。His200 変異酵素では Lys 置換体のみが活性型酵素として取得され、本変異酵素も高いイソメラーゼ反応への特異性を示した。Tyr124 に関しては活性型の変異酵素が得られなかった。

#### (3) ME の結晶構造の解析

*Runella slythyformis* 由来 ME の結晶化条件の探索を進め、得られた結晶を用いた X 線回折実験により高分解能での結晶構造の決定に至った。基質フリー構造に加えて基質アナログであるグルシトールとの複合体構造を決定した。これらの構造解析の結果、ME の基質結合ならびに触媒残基は CE を含む他の類縁酵素と多くが空間的にも保存されているものの、単糖特異性に重要と予測されていた -ヘリックス 7 と 8 をつなぐ長いループ構造が基質との結合に際して大きく動き、誘導適合により単糖基質を捕捉する機能を持つことが明らかになった。

#### (4) 高活性 ME 変異酵素のスクリーニング

ME の高活性変異酵素の取得のため、ハイスループットスクリーニング系を検討した。本スクリーニング系では、マンノーストランスポーター遺伝子を欠失させることでマンノース資化性を失われた大腸菌を用い、この細胞表層に ME 酵素を発現させることでマンノース資化性の回復、また、活性に応じた生育速度の増加により高活性変異酵素をスクリーニングすることを計画した。マンノーストランスポーターを構成する 3 タンパク質全ての遺伝子を欠失させることでマンノース資化性を完全に失わせることができた。この大腸菌変異株をホストとし、氷核タンパク質の N ドメインを付加した ME を発現させると、ME 酵素は外膜画分に生産され、マンノース資化性の回復が確認された。この ME 発現大腸菌については、細胞懸濁液中での Man の減少を確認した。すなわち、マンノースは菌体外 ME 酵素によるグルコースへの異性化を介して菌体に取り込まれたと理解された。またこの大腸菌形質転換体はマンノースを唯一の炭素源として生育した。組換え ME の C 末端側に GFP タンパク質を融合し、菌体表層中の ME 酵素の簡便な定量方法を構築した。ランダム変異を導入した ME 変異酵素ライブラリーをグルコースとマンノースを唯一の炭素源とする培地で生育させるとマンノース培地でのコロニー数はグルコース培地でのコロニー数の 5%程度であり、低活性変異酵素はマンノース培地で生育できず除外されることが示唆された。このマンノース培地での生育が確認された形質転換体について、小規模培養により生産した変異酵素の比活性を活性/蛍光強度に基づき評価した。1500 ほどの変異酵素について比活性を測定したが、野生型酵素を大きく超える比活性を持つ変異酵素の取得には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wang Hang, Sun Xiaomei, Saburi Wataru, Hashiguchi Saki, Yu Jian, Ose Toyoyuki, Mori Haruhide, Yao Min	4. 巻 79
2. 論文標題 Structural insights into the substrate specificity and activity of a novel mannose 2-epimerase from <i>Runella slithyformis</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 585 ~ 595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S205979832300390X	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5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 セロピオース2-エピメラーゼが持つイソメラーゼ活性に重要な構造の解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内山 昌典, 橋口 早紀, 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 <i>Runella slithyformis</i> 由来マンノース2-エピメラーゼ (RsME) の高活性化を指向したスクリーニング
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wataru Saburi
2. 発表標題 Expansion of enzymatic synthesis of carbohydrates using novel carbohydrate-active enzymes
3. 学会等名 The 17th International Symposium of the Protein Society of Thailand (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐分利 亘, 森 春英
2. 発表標題 Rhodothermus marinus由来セロピオース2-エビメラゼにおける還元末端糖残基の2-OH基との相互作用残基の反応特異性への寄与の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Wataru Saburi
2. 発表標題 Development of functional foodstuffs produced using carbohydrate-metabolizing enzymes
3. 学会等名 The 7th Sino-Japan Joint Symposium on Enzyme Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院農学研究院生物化学研究室ホームページ <a href="http://lab.agr.hokudai.ac.jp/biochem/">http://lab.agr.hokudai.ac.jp/biochem/</a>
---

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
---------	---------