

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19070

研究課題名(和文)水酸基の酸化反応を鍵とした多糖の新規酵素分解経路の探索

研究課題名(英文) Investigation for unrevealed lytic pathway of polysaccharides initiated with oxidation of a hydroxyl group

研究代表者

北岡 本光 (Kitaoka, Motomitsu)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：60353984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：セロビオースを出発原料として触媒量のリン酸存在下に10℃にてセロビオースホスホリラーゼおよびピラノースオキシダーゼを作用させることにより還元末端2位の酸化された2-ケトセロビオースの効率的な合成に成功した。2-ケトセロビオースは、pH 7.0, 30℃において半減期103時間で脱離反応により分解された。セルロースの中間グルコース残基の酸化されたモデル化合物である1-デオキシ-2-ケトセロビオースは同じ条件下において半減期17時間で分解することが示されているため、セルロースの2位が酸化されると、一般的に常温中性pH下で脱離反応を起こすことにより結合が切断されることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

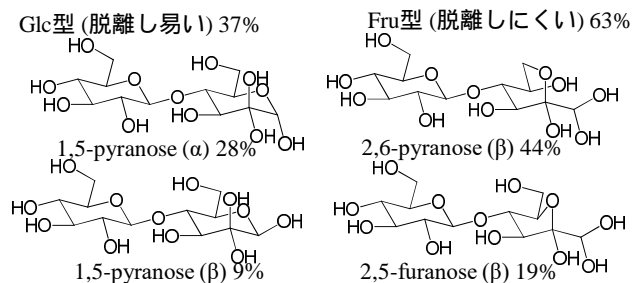
本研究により、セルロースなどの多糖類の水酸基が酸化されることにより結合が自動的に分解されることが証明された。このことから水酸基酸化酵素による未知の多糖分解経路の存在する可能性が示されたことになる。この成果をもとに、特に難分解性の結晶性多糖の新規な分解経路の発見が期待される。

研究成果の概要(英文)：2-Keto-cellobiose, a model compound representing oxidized cellulose at the position 2 of the reducing-end glucose residue, has successfully been synthesized from cellobiose by the concerted actions of cellobiose phosphorylase and pyranose oxidase at 10 °C in the presence of a catalytic amount of phosphate. It was degraded by β -elimination reaction at pH 7.0 and 30 °C with a half-life of 103 hours. Because 1-deoxy-2-ketocellobiose, a model compound representing oxidized cellulose at the position 2 of the internal glucose residue of cellulose, has already been shown to degrade with a half-life of 17 hours under the same conditions, it was proved that when the hydroxy group at position 2 of cellulose is oxidized, the bond is generally eliminated even at room temperature under neutral pH.

研究分野：酵素科学

キーワード：水酸基の酸化 多糖分解 酵素反応 新規分解経路

功した。合成した 2-ケトセロピオースの構造を NMR により確認したところ、還元末端の 2-ケトグルコース残基の環化物として、グルコース構造としての環化物である α -および β -ピラノースに加えて、フラクトース構造による環化物として、 α -フラノース、 β -フラノースの 4 種の平衡混合物として存在することが示された (図 3)。



フラクトース型は 1 位がヘミアセタールでない未修飾のアルデヒドであり、タンパク質のリジン残基と反応することにより酵素の失活剤として作用することが示唆された。

図 3. 2-ケトセロピオースの環構造

2-ケトセロピオースは、中性常温下においてグルコースを遊離して分解した。還元末端側残基はギ酸と考えられる有機酸を遊離してさらに分解が進行しており、六炭糖誘導体は単離できなかった。pH 7.0, 30 における半減期は 103 時間であり、1-デオキシ-2-ケトセロピオースの約 1/6 程度の速度で脱離により分解した。pH および温度依存性は 1-デオキシ-2-ケトセロピオースと同じ傾向を示した (表 1)。両者の分解速度の違いは、1-デオキシ-2-ケトセロピオースには見られない 2,6-環状化合物および 2,5-環状化合物の存在による 2 位のヘミアセタール化により説明可能であり、2 位の未修飾カルボニル基の存在により 4 位の脱離反応が促進されていることが証明された。

表 1. 各条件における半減期 (h)

pH		50	40	30	20
8.0	2-ケトセロピオース	6.2	18	56	172
	1d2kCG ₂	0.66	2.2	8.6	39
7.0	2-ケトセロピオース	12	35	103	slow
	1d2kCG ₂	1.5	4.9	17	74
6.0	2-ケトセロピオース	50	128	slow	slow
	1d2kCG ₂	6.6	21	80	slow

非還元末端グルコース残基の酸化された 2'-ケトセロピオースの合成を検討した。まず合成の糖受容体基質となる 2-ケト- α -グルコース 1-リン酸の N-アセチルヘキソサミン 1-キナーゼによる調製を試みた。反応中に酵素が比較的短時間で失活する現象を確認したため、その原因及びこれを回避する条件を検討した。基質である 2-ケトグルコースの溶液中の構造を NMR で解析したところ、全体の 30%以上がフラクトース型で環を巻いており、1 位がヘミアセタールではないアルデヒド基になっていた。そのため、基質のアルデヒド基が酵素のリジン残基のアミノ基と反応することにより酵素の失活を促進することが考えられた。基質濃度と反応温度の最適化を行ったところ、2-ケトグルコース濃度 100 mM, pH 8.0, 10 にて酵素反応を行うことにより目的の 2-ケト- α -グルコース 1-リン酸を効率液に調製できた。さらに、マンノシルグルコースホスホリラーゼを用いることにより 2'-ケトセロピオースの生成を確認した。生成物の中性常温条件下での不安定性は確認されなかった。

全体の研究成果として、セルロースの 2 位が酸化されると酸化されたグルコース残基の 4 位が脱離反応を起こすことまでは証明できた。今後、水酸化酵素を含む新たな多糖分解経路が発見されることが期待される。研究期間中に達成できなかった非還元末端グルコース残基の酸化されたモデルの分解速度評価が残された課題となる。

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 Kitaoka Motomitsu	4. 巻 70
2. 論文標題 Automatic Calculation of the Kinetic Parameters of Enzymatic Reactions with Their Standard Errors Using Microsoft Excel	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Applied Glycoscience	6. 最初と最後の頁 33 ~ 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5458/jag.jag.JAG-2022_0012	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 Kitaoka Motomitsu, Takano Ayu, Takahashi Mei, Yamakawa Yoshiki, Fushinobu Shinya, Yoshida Nobuyuki	4. 巻 71
2. 論文標題 Molecular Basis of Absorption at 340 nm of 3-Ketoglucosides under Alkaline Conditions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Applied Glycoscience	6. 最初と最後の頁 9 ~ 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5458/jag.jag.JAG-2023_0014	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0件

〔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
---------	---------