

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24年 5月30日現在

機関番号：10101

研究種目：戦略的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658032

研究課題名（和文） 糖質分解酵素の新しい反応機構の確立とその応用

研究課題名（英文） Establishment of novel reaction mechanism on glycosylase 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）：

糖質の加水分解酵素について2つの反応機構（オキシカルベニウムイオン中間体と共有結合中間体）が知られているが、最近は後者が圧倒的に支持されている。問題は、後者の機構が有機化学的理論に合致しないことである。本研究の目的は、オキシカルベニウムイオン中間体を經由する反応機構の実証である。糖質分解酵素はオリゴ糖を工業生産する重要な作用を示す。新機構により新たな応用研究を発想したが、その成立の可能性を探った。

研究成果の概要（英文）：

Two reaction mechanisms have been proposed: on glycosylases, i.e. oxo-carbenium ion-mediated mechanism and covalent linkage-formation mechanism. Recently, the latter one is supported by many glycosylase-scientists. However, there is a problem in the latter mechanism: this mechanism cannot be supported by organic chemistry-related knowledge. A purpose of this project is an experimental proof of the oxo-carbenium ion-mediated mechanism. Glycosylases catalyze the useful reaction of transglycosylation. This reaction mechanism may produce the novel application approach, the possibility of which is also investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

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：反応機構、糖質分解酵素、反応中間体

1. 研究開始当初の背景

糖質酵素の反応機構には、共有結合中間体（CBI と略、図1）とオキシカルベニウムイオン中間体（OCI と略、図2）を經由する2つの候補があるが、Withersらの研究でCBI機構が支持された（Nature, 412, 835, 2001）。当時において、我々はCBI機構で理解できない

現象を見出していた。i) トレハラーゼの反応において、CBI機構で説明不可能な大きな第二次アイソトープ効果を観察した。本現象はOCI機構でのみ理解できる（Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73, 2466, 2009）。ii) α -グルコシダーゼ変異酵素と基質分子の結晶構造において見出された基質分子の歪んだ構造は、OCI

機構の中間体に酷似した (J Mol Biol, 378, 911, 2008)。特に注目すべきは、CBI 機構が有機化学的に支持されない点にある。iii) CBI 機構の初発反応 (図 1 の A) は、6 員環を形成する酸素原子の不对電子雲が邪魔をし、触媒残基であるカルボキシル基の攻撃を阻止する。iv) 困難な初発反応が仮に進行しても、水分子が

アノメリック炭素を求核攻撃する素反応が生じない (図 1 の B)。有機化学的に妥当な反応は「プロトンが直接アセタール酸素を攻撃」であり (図 1-補足図)、プロトンを供与するアミノ酸が存在しない。従って CBI 機構に無理があり、合理性を欠いた原理が現在広く信じられている。

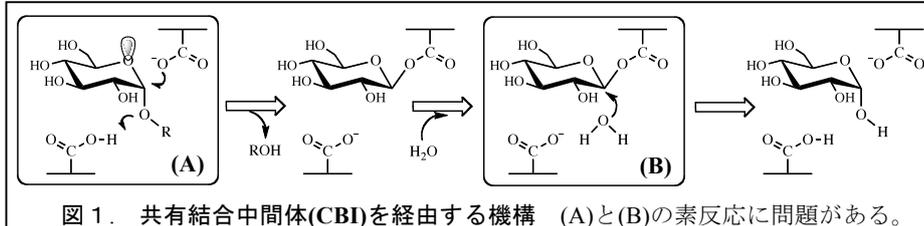


図 1. 共有結合中間体(CBI)を経由する機構 (A)と(B)の素反応に問題がある。

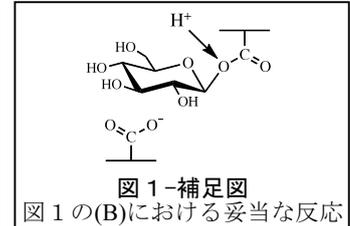


図 1-補足図
図 1 の(B)における妥当な反応

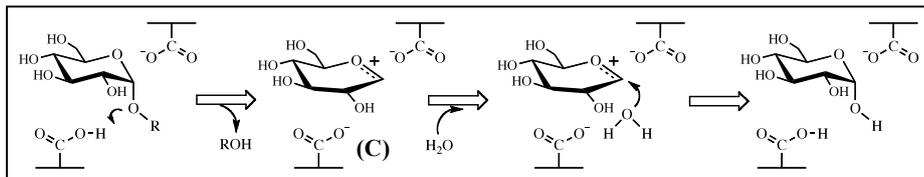


図 2. オキソカルベニウムイオン中間体(OCI)を経由する機構 (C)においてオキソカルベニウムイオンを形成。

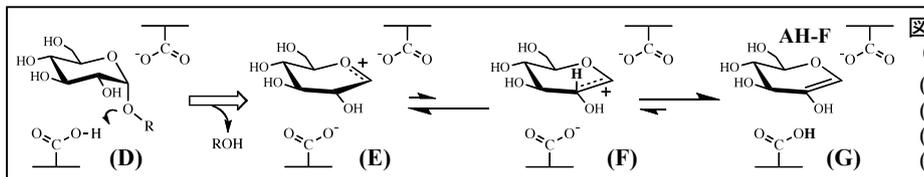


図 3. アンハイドロ-フラクトース (AH-F) の生成反応 (D)と(E)は図 2 と同一。(F)では 2 位の水素が脱離し易い。(E)と(F)間は逆反応が優先。(F)と(G)間は正反応が優先。

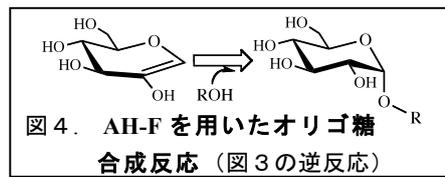


図 4. AH-F を用いたオリゴ糖合成反応 (図 3 の逆反応)

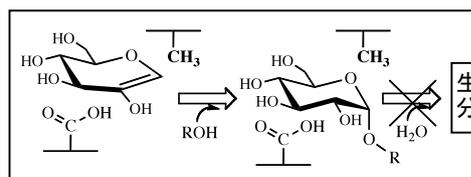


図 5. Ala 変異酵素を用いたオリゴ糖合成 触媒残基の Ala 変異のため、生成オリゴ糖は加水分解されない。

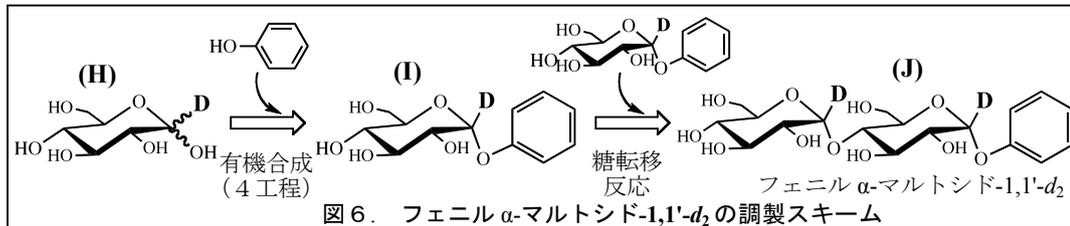


図 6. フェニル α -マルトシド-1,1'- d_2 の調製スキーム

2. 研究の目的

合理性を欠く CBI 機構であるが、酵素の触媒部位の特殊環境で生じる可能性も否定できない。また、上述した i) と ii) の知見は OCI 機構を示唆するが、さらに多くの実験的な証明が必要である。本研究の第一の目的は、OCI 機構を実証する決定的な実験データを示すことである。解明された反応機構から新反応を構築できるため、新たな応用研究が確立可能となる。目的の第二は、OCI 機構から確立できる新反応の応用である。具体的には、1) 第二次アイソトープ効果の観察：OCI 機構を支持する第二次アイソトープ効果を多くの糖質酵素で調べる。2) アンハイドロ-フラクトースの生成：OCI 機構であれば、アンハイドロ-フラクトース (AH-F と略、図 3) を副生成すると予想できる。AH-F 副生成は微かと考

えられるが、多くの糖質酵素を用いて確認したい。なお α -グルコシダーゼを用いた予備実験において AH-F 生成を確認した。3) AH-F を用いたオリゴ糖合成：図 3 の AH-F 生成反応が成立すると、その逆反応も進行できるため、AH-F を用いたオリゴ糖合成が可能になる。本研究では 2 つの新規な合成反応を調べる。1 つはオリゴ糖の生成収率が 100% になる可能性がある。

3. 研究の方法

新原理 (OCI 機構) の確立・展開とそれに基づく応用研究の開発のため、次の研究計画を行う。本研究に用いる酵素の調製：初年度において本研究に用いる酵素や組換え体の全てを調製する。

第二次アイソトープ効果の測定：i) 基質の

調製：本効果を調べるため、アノメリック水素を重水素に標識した基質（フェニル α -マルトシド-1,1'- d_2 、図6）を合成する。ii) 効果の測定：合成したフェニル α -マルトシド-1,1'- d_2 を共通基質とする4酵素（ α -アミラーゼ・ β -アミラーゼ・グルコアミラーゼ・ α -グルコシダーゼ）を用いて第二次アイソトープ効果を測定する。

AH-Fの生成：iii) 生成の確認：グルコアミラーゼ・ α -グルコシダーゼ・ β -グルコシダーゼの反応生成物からAH-Fを検出・定量する。 α -マンノシダーゼも対象とする。生成物のマンノースはグルコースのC2エピマーのため、AH-F生成が予想できるからである。iv) 触媒残基の変異酵素：我々は「触媒アミノ酸の変異酵素が反応中間体を蓄積する現象」を認めた (Biosci Biotechnol Biochem 66, 928, 2002)。その場合、AH-Fの生成量が高まる可能性がある。当該変異酵素を作製し調べる。

AH-Fを用いたオリゴ糖合成：v) オリゴ糖合成反応： α -グルコシダーゼ・グルコアミラーゼ・ β -グルコシダーゼ・ α -マンノシダーゼを用いて図4の反応を調べる。これはAH-Fを供与体とし、糖が受容体になる合成反応である。生成オリゴ糖の構造決定も行う。vi) 収率100%の合成反応：触媒アミノ酸の変異酵素を作製し、図5の合成反応を検討する。高収率であることを確認する。

4. 研究成果

本研究に用いる酵素の調製：植物の α -アミラーゼ・ β -アミラーゼ・ α -グルコシダーゼ、糸状菌のグルコアミラーゼ、細菌の β -グルコシダーゼ、海草のアンハイドロ-フラクトース生成酵素（AH-F生成酵素）、ミツバチ α -グルコシダーゼを調製した。

第二次アイソトープ効果の測定用基質の合成：重水素基質（フェニル α -マルトシド-1,1'- d_2 ）の合成に成功した（4工程の有機合成法とミツバチ α -グルコシダーゼの糖転移反応）。コントロールのため、軽水素基質も調製した。

AH-Fの酵素的生成： α -グルコシダーゼについてAH-F生成の生成実験を行った。手法は、基質に酵素を作用させ、反応液中に微量生成するAH-Fを定量することである。内部標準に必要な[U- 13 C] AH-Fは、AH-F生成酵素を市販の[U- 13 C]デンプンに作用させ調製した。酵素反応（ α -グルコシダーゼ）においてAH-Fが経時的に増加する結果を得た。現在さらなる確認を慎重に行っている。副生成物としてAH-Fを与える現象はオキソカルベニウムイオン中間体モデルのみによって説明できるため、同反応機構を支持する実験的な証拠となる。

AH-Fの生成：1) AH-F生成の確認：昨年度

に精製したグルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼおよび β -グルコシダーゼなどに対し、AH-F生成を確認実験した。これはOCの証拠である。

第二次アイソトープ効果の測定：2) 酵素反応における本効果の測定：昨年度に調製した重水素基質と軽水素基質に各酵素を作用させ、第二次アイソトープ効果を測定した。 k_0/K_m の比は1.1を上回り、OCが支持された。

触媒残基変異酵素が行うAH-F生成：3) 触媒残基の変異酵素によるAH-F生成：1) 項でAH-F生成が確認された酵素について、触媒残基の置換酵素を作製し、合成したフッ素基質に置換酵素を作用させ、AH-F生成を確かめた。

AH-Fを用いたオリゴ糖合成：4) オリゴ糖合成反応：AH-Fと単糖を用いたオリゴ糖合成反応条件（AH-Fの濃度、単糖の種類と濃度、酵素量など）を検討し、オリゴ糖大量合成・単離を行い、構造を決定した。5) 収率100%の合成反応：3) 項で作製した触媒アミノ酸の変異酵素を用いて4) 項の合成反応を行い、オリゴ糖合成収率を測定した。約90%の値を得た。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計14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。

- ① 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*, 2012, in press. **IF=5.328** (2010).
- ② 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*, 2012, in press. **IF=5.328** (2010).
- ③ 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*, 2012, in press. **IF=5.328** (2010).
- ④ Kim YM, Eiji Y, Kang MS, Nakai H, Saburi W, Okuyama M, Mori H, Funane K, Kim D, Kimura A: Glycoside hydrolase family 66

- enzyme homolog from *Bacteroides thetaiotomicrodon* VPI-5482 catalyzes endo-dextranolytic and cyclization activities. **FEBS J**, 2012, in press. **IF=3.129** (2010).
- ⑤ 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**, 2012, in press. **IF=2.773** (2010).
- ⑥ Kim YM, Kimura A, Kim D: Novel quantitative method for the degree of branching in dextran. **Food Sci Biotechnol** 20(2): 537-541, 2011. **IF=0.505** (2010).
- ⑦ Kang 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).
- ⑧ Kim 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).
- ⑨ Kobayashi M, Hondoh H, Mori H, Saburi W, Okuyama M, Kimura A: Calcium ion-dependent increase in thermostability of dextran glucosidase from *Streptococcus mutans*. **Biosci Biotechnol Biochem** 75(8):1557-1563, 2011. **IF=1.292** (2010).
- ⑩ 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** 67: 1542-1544, 2011. **IF=0.563** (2010).
- ⑪ Funane 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).
- ⑫ Kang HK, Kim YM, Nakai H, Kang MS, Hakamada W, Okuyama M, Mori H, Nishio T, Kimura A: Suicide substrate-based inactivation of endodextranase by ω -epoxyalkyl α -D-glucopyranosides. **J Appl Glycosci** 57:111-117, 2010.
- ⑬ 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 dextransucrase and dextranase activities. **Enzyme Microb Technol** 47:212-215, 2010. **IF=2.638** (2009).
- ⑭ 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** 179:273- 280, 2010. **IF=2.050** (2009).
- [雑誌論文] (計 1 件)
- ① 舟根和美, 川端康之, 鈴木龍一郎, 藤本瑞, 北岡本光, 木村淳夫, 小林幹彦: 環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼの分子解析と *Bacillus circulans* T-3040 株における環状イソマルトオリゴ糖の新規な生合成経路の発見 **応用糖質科学** 1: 179-185, 2011.
- [学会発表] (計 50 件)
- ① 木村淳夫: 糖質酵素の分子機構に関する研究. 日本応用糖質科学会平成 24 年度大会 (第 61 回), 平成 24 年 9 月 20 日, 東京農工大学 (東京都). (学会賞を受賞)
- ② Hitoshi Iwaya, Jae-Sung Lee, Shinya Yamagishi, Aki Shinoki, Weeranuch Lang, Hee-Kwon Kang, Hiroshi Hara, Atsuo Kimura, Satoshi Ishizuka: Dietary influence of linear α -1,6-polysaccharides on several parameters under experimental colitis depends on degree of the polymerization. November 14-17, 2011, Rolyton Sapporo Hotel (Sapporo, Japan). (ポスター賞 1 位を受賞)
- ③ 鈴木龍一郎, 鈴木喜大, 藤本瑞, 門間充, 木村啓太郎, 木村淳夫, 舟根和美: 環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼの合目的変異導入による生成物特異性の制御. 日本応用糖質科学会 平成 23 年度大会 (第 60 回) ポスター賞受賞, 2011 年 9 月 28 日, 北海道大学 (札幌)
- ④ Kim YM, Kanegae M, Hondoh H, Nishimura T, Saburi W, Sadahiro J, Lang W, Shimizu R, Nakai H, Okuyama M, Mori H, Kang MS, Fujimoto Z, Funane K, Kim D, A 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 Meeting of Korean Society of Food Science and Technology (KoSFoST). June 9th, 2011, Daegu Exhibition Convention Center (Daegu Metropolitan City, Kora). (招待講演)
- ⑤ Young-Min Kim, Michiyo Kanegae, Hironori Hondoh, Takashi Nishimura, Wataru Saburi, Juri Sadahiro, Weeranuch Lang, Ryoko Shimizu, Hiroyuki Nakai, Hee-Kwon Kang,

Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Min-Sun Kang, Zui Fujimoto, Kazumi Funane, Doman Kim, Kimura A: Molecular anatomy of α -1,6-glucoside(s)-forming and -hydrolyzing enzymes, comprising megalosaccharide-producing enzymes. 2011 CAB Agricultural Biotechnology Symposium on "Agricultural Biomaterials for Next Generation", August 25th, 2010, Seoul Natinal University (Seoul, Korea) (招待講演)

- ⑥ 木村淳夫: イソマルトメガロ糖とその生産酵素. メガロ糖・第2回シンポジウム「メガロ糖の製造と機能性ナノ材料: イソマルト型の新展開」2011年9月16日, 帯畜大(帯広市) (招待講演)
- ⑦ Mori H, Hondoh H, Saburi W, Otsuka-Rachi H, Nishimura T, Kanegae M, YM Kim, Okuyama M, Kimura A: Dextran glucosidase and isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyl transferase: mechanism of substrate recognition and transglucosylation. 4th Symposium of the α -Amylase Family, September 25th to 30th, 2010, Smolenice Castle, Slovakia. (招待講演)
- ⑧ 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 Castle (Smolenice, Slovakia). (ポスター賞3位を受賞)
- 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, グランシップ(静岡県). (招待講演)
- ⑩ 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)

[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)
- 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) ホームページ等

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

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

なし

(3) 連携研究者

なし