様式Ｃ－１９

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　8 月　26 日現在

機関番号：23303
研究種目：若手研究（Ｂ）
研究期間：2010 ～ 2013
課題番号：２２７８００９５
研究課題名（和文）ユニークな基質特異性を持つグリコシダーゼの機能解明から有用糖鎖合成酵素への変換
研究課題名（英文）　Conversion of an inverting exo-D-glucosaminidase into a golycosynthase
研究代表者
本多裕司（HONDA YUJI）
石川県立大学生物資源環境学部・准教授
研究者番号：40399382

研究成果の概要(和文):*Photobacterium profundum* SS9 から得られた GH9 に属する PBPRA0520 蛋白質が、アノマー反転型のエキソβ-D-グルコサミニダーゼである事を明らかにした。本酵素の糖鎖合成酵素化に最適なアミノ酸残基を探索するために、D139 に対して saturation mutagenesis 法と部位特異的変異導入法を導入し、19 種の変異型酵素(D139X)を得た。これらの変異体の糖鎖合成能について調べてみると、D139E, D139A,および D139S が良好な糖鎖合成能を示す事が判明した。

研究成果の概要（英文）：We elucidated an inverting exo-β-D-glucosaminidase activity of the GH9 protein from *Photobacterium profundum* SS9. Kinetic analysis of the hydrolytic activities toward cellooligosaccharides and chitooligosaccharides indicated the enzyme is an exo-β-D-glucosaminidase (EC 3.2.1.165) rather than an exo-β-1,4-glucosidase.

Based on the modelled three-dimensional structure, we targeted D139, D143, and E555 as candidates of the important amino acid residues in the hydrolytic reaction. D139A, D143A and E555A mutants displayed trace hydrolytic activities. The D139A displayed glycosynthase activity with α-GlcN-F as a substrate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
22 年度	1,500,000	450,000	1950,000
23 年度	500,000	150,000	650,000
24 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総　計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：エキソβ-D-グルコサミニダーゼ

１．研究開始当初の背景

近年、500 以上の微生物のゲノム配列が明らかにされており、多くの糖質関連酵素遺伝子が同定されてきている。それらの糖質関連酵素は、酵素委員会による EC 番号の分類だけではなく、アミノ酸配列の類似性やその反

応性によって様々なファミリーに分類されている。そのファミリーの分類はCazy(http://www.cazy.org/) というデータベースで参照することができ、これは糖質関連酵素遺伝子の機能性を予測するうえで強力なツールとなっている。

地球上には、生物資源として様々な多糖類が広く存在しており、多糖類を資化するために微生物は多種多様な糖質関連酵素を持っている。また、特殊（極端な温度、pH および圧力など）な環境において生育する生物は、その環境に適応した酵素を有することが報告されている。そのような酵素は通常の酵素とは異なる反応性や安定性を持っており、産業的に利用されている酵素も数多く存在する。特殊な環境下で生育する生物のゲノムには、全く新しい基質特異性を発揮する GH 蛋白質遺伝子が存在する事発見されてきている。

本研究で対象とした *Photobacterium profundum* SS9 は、2500m の深海において発見され、低温かつ高圧条件で生育する深海性細菌である。*P. profundum* SS9 は 2005 年にゲノム配列が解読され、80 種類以上の糖質関連酵素遺伝子が存在することが判明している。*P. profundum* SS9 のゲノムに存在する様々な GH 遺伝子を既知の GH 遺伝子の推定アミノ酸配列と詳細に比較してみると、Cazy による分類では同じ GH ファミリーに分類されているにも関わらず、アミノ酸配列の類似性が低い GH 蛋白質遺伝子がいくつか存在している。したがって、*P. profundum* SS9 のゲノムについても既存の GH 蛋白質に見られない新しい基質特異性を有する GH 遺伝子が秘められていると考えられた。

２．研究の目的

P. profundum SS9 のゲノム上に存在する PBPRA0520 遺伝子は GH ファミリー9 に属したセロオリゴ糖を加水分解するβ-グリコシダーゼと同定されているが、オペロン上の PBPRA0520 遺伝子配置から考えるとキチンあるいはキトサンを加水分解する可能性も考えられた。キトサンオリゴ糖に PBPRA0520 蛋白質を作用させると、セロオリゴ糖なみの加水分解活性を示す事を見出した。本酵素は少なくともβ-グリコシダーゼ活性とβ-グルコサミニダーゼ活性を持っており、様々な基質を認識するユニークな基質特異性を持っていると考えられた。

本研究では、β-グリコシダーゼと同定されている PBPRA0520 蛋白質の基質特異性を中心に解析するとともに、その基質特異性を活用したグライコシンターゼを作製し様々なオリゴ糖を酵素合成する事を目的とした。

３．研究の方法

PBPRA0520 蛋白質の基質特異性を調べるために、α-グリコシド結合およびβ-グリコシド結合した様々なオリゴ糖に対する加水分解産物を薄層クロマトグラフィー（TLC）や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて分析した。さらに、酵素活性を速度論的に解析することにより、様々な基質に対する結合性や触媒能を速度論的パラメーターで評価する。本酵素の最適な反応条件を決定するために、酵素反応の至適 pH および至適温度を検証した。

また、グライコシンターゼによる糖鎖合成法を確立するためには、フッ化グリコシドを安定して供給するシステムが必要となる。本酵素の基質特異性を考慮して、様々な *O*-アセチル化糖を合成した。次に得られた *O*-アセチル化糖をフッ化水素・ピリジン錯体を用いたフッ素化および脱 *O*-アセチル化を経ることで、様々なフッ化グリコシドを合成した。得られた様々なフッ化グリコシドに対する野生型酵素の反応性を評価するために、フッ素電極を用いて酵素反応液中のフッ化物イオンを定量した。

糖鎖合成に特化したグライコシンターゼを作製するために、様々な変異型酵素の活性を解析して本酵素の触媒基を検索した。

また、本酵素の活性部位中のアミノ酸残基と水分子の相互作用しているアミノ酸残基

を検索するとともに、そのようなアミノ酸残基に部位特異的変異を導入した酵素を作製する。以上の変異型酵素と前年度で得られた様々なフッ化グリコシドを糖供与体として、グライコシンターゼ反応を TLC および HPLC を用いて検証した。

４．研究成果

様々なグリコシド結合した二糖類に酵素を作用させ、TLC および HPLC によって生成物を調べた結果、キトサンオリゴ糖類、セロオリゴ糖類、*p*-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド(Glc-PNP)そして *p*-ニトロフェニルグルコサミニド(GlcN-PNP) に対して加水分解活性があった。

多糖類であるアビセル(セルロース)、カルボキシメチルセルロースおよびキトサンに対する酵素活性の有無を還元糖の増加量によって測定した。その結果、キトサンに若干の加水分解活性が見られた。

Glc-PNP を用いて酵素の至適温度および pH を検討した結果、至適温度は 50℃、至適 pH は 6.7 であった。

キトサンオリゴ糖類とセロオリゴ糖類に対する加水分解様式および酵素活性を HPLC によって調べた。その結果、キトサンオリゴ糖類、セロオリゴ糖類のいずれに反応させた場合も反応初期に単量体を生成した。また、速度論的解析の結果、キトサンオリゴ糖類の k_{cat}/K_m はセロオリゴ糖類の 10 倍以上であった。

また、キトサンオリゴ糖の加水分解生成物のアノマー型を調べてみると、本酵素はα型のキトサンを生成する事がわかった。このことから、本酵素はアノマー反転型の反応機構を有することを明らかにした。

PBPRA0520 蛋白質はセロオリゴ糖類よりもむしろキトサンオリゴ糖類を加水分解する働きがあり、非還元末端からグリコシド結合を加水分解するエキソ型の酵素であることが判明した。

また、当初は深海性細菌由来の酵素だけを研究対象にしていたが、食虫植物の消化液という特殊な環境下で作用するユニークな基質特異性を持つキチン質分解酵素を発見する事ができた。

次に PBPRA0520 蛋白質をグライコシンターゼ化するために、触媒に寄与していると考えられた D139、D143 および E555 をアラニンに置換した変異型酵素を作製した。

D139A、D143A および E555A の糖鎖合成活性を調べてみると、D139A のみが糖鎖合成能を示した。次に、糖鎖合成に最適なアミノ酸残基を検討するために、D139 に Saturation mutagenesis を導入し、糖鎖合成活性を分析した。これらの変異体の糖鎖合成能について調べてみると、D139E, D139A, および D139S が良好な糖鎖合成能を示す事が判明した。

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 2 件）

Kana Ishisaki, Yuji Honda, Hajime Taniguchi, Naoya Hatano, and Tatsuro Hamada 、 Heterogonous expression and characterization of a plant class IV chitinase from the pitcher of the carnivorous plant *Nepenthes alata* 、 *Glycobiology*、 査読有、 vol.22 2012、 345-351

Yuji Honda, Nozomi Shimaya, Kana Ishisaki, Mitsuru Ebihara, and Hajime Taniguchi 、 Elucidation of exo-β-D-glucosaminidase activity of a family 9 glycoside hydrolase (PBPRA0520) from *Photobacterium profundum* SS9 、 *Glycobiology*、 査読有、 vol.21、 2011、 503-511

〔学会発表〕（計 7 件）

本多裕司、GH ファミリー9 に属するエキソβ-D-グルコサミニダーゼの糖鎖合成酵素化 日本農芸化学会2013年度大会2013年03月24日～2013年03月28日宮城県

新井祥子(本多裕司)、*Photobacterium*

profundum SS9由来エキソβ-D-グルコサミニダーゼの糖鎖合成酵素化 日本応用糖質科学会平成24年度大会 2012年09月19日～2012年09月21日 東京都

Yuji Honda、 Reaction mechanism of an inverting exo-β-D-glucosaminidase from Photobacterium profundum SS9 the 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering 2012年05月28日～2012年05月31日 石川県

新井祥子（本多裕司）、*Photobacterium profundum* SS9 由来エキソ型 β-D-グルコサミニダーゼの変異型酵素の機能解析. 2011年度日本農芸化学会関西・中部支部合同大会 2011年10月2日京都

石崎佳奈（本多裕司)、食虫植物ウツボカズラ消化液キチン質分解酵素の機能解析 2011年度日本農芸化学会関西・中部支部合同大会 2011年10月2日京都

Yuji HONDA、 The GH9 protein from *Photobacterium profundum* SS9 is an exo-β-D-glucosaminidase (EC 3.2.1.165). 16th European Carbohydrate Symposium 2011年7月4日 Sorrento, Italy

本多裕司 *Photobacterium profundum* SS9 由来GH9酵素の機能解析、日本農芸化学会関西支部大会 2010年10月3日 奈良

６．研究組織
(1)研究代表者

本多裕司（HONDA YUJI）
石川県立大学生物資源環境学部・准教授
研究者番号：40399382