

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658089

研究課題名(和文)多糖合成酵素に関する新しい分子反応機構の構築と応用研究

研究課題名(英文) Construction of novel molecular mechanism on polysaccharide-forming enzyme and its application

研究代表者

木村 淳夫 (KIMURA, Atsuo)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90186312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：多糖合成酵素と中型オリゴ糖合成酵素を分子解析することにより、反応に関わる構造因子の決定が目的である。また、本因子の制御で新たなオリゴ糖の生成も目的であり、以下の結果を得た。(1)多糖合成酵素：触媒アミノ酸は2つのGluであった。C末端領域に多糖合成の因子が存在した。(2)中型オリゴ糖合成酵素：立体構造を解明し、触媒残基をAspおよびGluと決定した。活性部位から離れた2つの芳香族アミノ酸の役割を調べ、1つが酵素機能を向上させることが判明した。

研究成果の概要(英文)： Purpose of this research is the elucidation of structural elements of polysaccharide-producing enzyme and middle-size-oligosaccharide-producing enzyme. Furthermore, the formation of new oligosaccharide is also purpose of this study by controlling the structural element. The obtained results were as follows; (1) Polysaccharide-producing enzyme: Catalytic amino acids were two Glu. Polysaccharide-forming structural element was in the C-terminal region of enzyme. (2) Middle-size-oligosaccharide-producing enzyme: Three-dimensional structure was elucidated, and catalytic residues were Asp and Glu. Mutation analyses of two aromatic residues at sites distant from catalytic center revealed that one residue improved the enzyme function.

研究分野：酵素利用学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：多糖 ドメイン 合成

1. 研究開始当初の背景

多糖の酵素合成は、2つの反応系でなされる。すなわち、1)ヌクレオチド・単糖を基質にする系と 2)二糖や短鎖オリゴ糖を基質にする系である。本研究では後者の合成機構に焦点を当て、その反応機構が「転移と伸長」に分かれることを提唱したい。極く最近、我々は短鎖オリゴ糖を多糖に導く酵素(多糖合成酵素)のドメイン削除体を試験的に作製し、その削除体が伸長作用を低下させる予備的な結果を得た。さらにプリミティブなデータであるが、転移反応には変化がないことがわかり『転移と伸長は別個の構造因子(構造因子とは、1アミノ酸や配列などの小構造を指す科学用語)により制御される』を発想した。この発案は「転移と伸長を切り離して個別にコントロールできること」を意味する。すなわち、転移に関わる構造因子を制御することで、グリコシド結合の異なる多糖を生成し、多様な供与体の許容が実現でき、かつ伸長に関わる構造因子の制御で生成多糖のサイズ制御を具現できることを着想した。

2. 研究の目的

研究の目的は、1)多糖の合成酵素の転移と伸長の両作用を支配する構造因子を制御し、異なる構造の多糖や長鎖オリゴ糖の生産を目指すことである。また、2)合成反応の分子機構究明も目的に追加したい。また、本研究では、多糖合成酵素の他に新規な合成酵素(中型オリゴ糖合成酵素)も対象とする。当該酵素は、短鎖オリゴ糖を基質にした転移反応を繰返し、重合度12までの中型オリゴ糖を合成する。その伸長作用を調べ「長鎖型オリゴ糖の合成酵素に変換」させる。以下に具体的な研究目標を示す。

(1)両酵素の触媒部位と立体構造の決定:多糖合成酵素と中型オリゴ糖合成酵素の結晶を作製し、X線構造解析を検討する。さらに高解像度型の結晶を得ることで、触媒残基を解明する。

(2)変異による転移反応の制御:前項の立体構造を基に「基質認識に関わる構造因子」を推定し、変異作業から制御する。

(3)伸長反応を支配する構造因子の改良:立体構造から伸長作用に関わる構造因子を知り、因子に変異を発生させる。伸長反応をコントロールすることで、異なるサイズの多糖や長鎖オリゴ糖の生産を試みる。

(1)~(3)の結果から多糖合成反応の分子機構究明を行う。

3. 研究の方法

(1)酵素精製と遺伝子単離:2つの合成酵素の精製法は、我々が開発・報告した手法で行った。単離した酵素蛋白質の内部アミノ酸配列からDNAプライマーを構築し、PCR法で遺伝子を単離した。

(2)各変異酵素の構築:アミノ酸置換や各削除体の構築は基本的にPCR法を用いて行った。

(3)転移活性:多糖合成酵素では3糖を基質にし、生成する2糖と4糖をHPLCで測定した。中型オリゴ糖合成酵素ではイソマルトオリゴ糖を基質にし、転移作用をHPLCで丹念に調べた。

(4)多糖生成活性:多糖合成酵素の多糖生成は、基質に6糖と7糖を用いた。反応終了後にアルコールを加え、多糖を沈殿させ回収し、フェノール・硫酸法で全糖量として測定した。

(5)結晶構造解析:精製酵素に対し結晶化スクリーニングを用いて結晶条件を確立した。中型オリゴ糖合成酵素の場合、*Bacillus*属細菌由来 oligo-1,6-glucosidase の立体構造をもとに分子置換法から構造解析を行い、全体構造を決定した。

4. 研究成果

(1)本研究の主な成果:

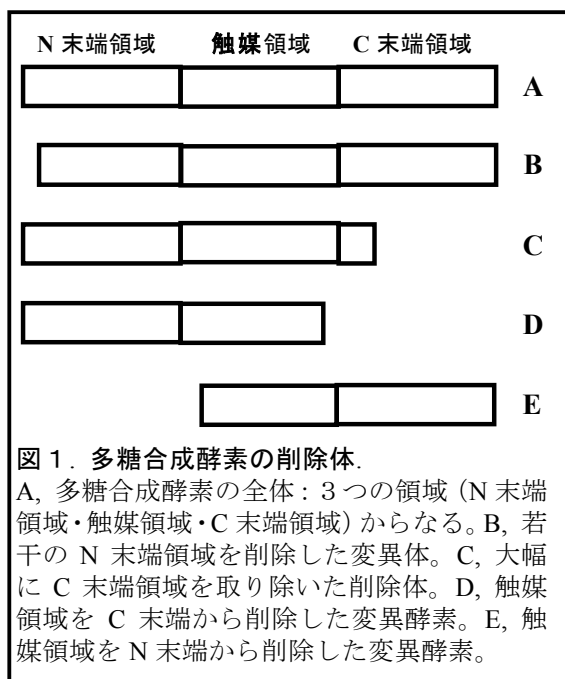
①多糖合成酵素:

1)X線構造解析:酵素試料を大量に精製し、X線構造解析を意図した結晶の調製を試みた。また、後述する削除体も結晶調製に供したが、両酵素ともX線回折像を与える結晶を得るに至らなかった。本酵素はユニークな多糖合成反応を触媒するため、立体構造解析の学術的価値は高い。しかしながら、当該酵素(非削除体;親酵素)は約1,300のアミノ酸からなり、その長いアミノ酸配列や複雑なドメイン構造などのため結晶化ができなかったと考えられた。一方、一次配列において低いながらも相同性がある糖質加水分解酵素が見出され、その情報をもとに触媒アミノ酸の検討を行った。その結果、2残基のGluを支持するデータが得られた。

2)酵素領域の検討:まず、多糖合成に貢献する領域の解析であるが、図1Aに示したように、本酵素は「N末端領域・触媒領域・C末端領域」からなると考えられる。それぞれの領域の多糖合成に及ぼす影響を調べるため、各領域の削除体を構築した。図1BはN末端領域を削除したものであり、末端から短鎖のアミノ酸配列を除いただけでも活性が低下した。一方、C末端領域からの削除体(図1C)は、本作業を許容し酵素活性が残存した。中央部分にある触媒領域は、C末端側からの削除(図1D;短鎖配列の除去も失活)やN末端側からの削除(図1E)で酵素活性を完全に失った。従って、C末端領域を中心に解析を行うことにした。

3)多糖合成の分子解析:C末端領域をほとんど削除した変異体を用いて糖転移反応を調べた。3糖を基質にした系で生じる4糖(転移生成物)を測定すると、生成量が親酵素とほぼ同じであるため、糖転移反応には変化がないことが認められた。一方、長鎖オリゴ糖を基質にし、伸長反応を解析した。C末端削除体は、多糖合成を低下させ、長鎖のオリゴ糖を生産した。このことは、伸長反応のみを低下させていることを意味する。すなわち、「転移反応と伸長反応が別個の構造因子で

制御されていること」を支持する結果が得られた。C末端領域に存在すると考えられた構造因子の決定は、さらなる削除作業により可能であるが、結果の解釈が難しく困難をきわめた。しかしながら、ようやく「C末端領域内の触媒領域の近く」に存在するデータが得られた。



② 中型オリゴ糖合成酵素：

1) X線構造解析：3ドメインの結晶構造を決定した。触媒ドメイン（ドメインA）には $(\beta/\alpha)_8$ バレルを、このC末端側に β グリークキーモチーフのドメインCがあり、触媒ドメインの途中のループが一部突出したドメインBを形成していた。触媒ドメインの構造は、 α -アミラーゼ・ファミリー酵素に一般的に見られるものであった。転移反応に重要と思われる構造因子も認められた。また、触媒アミノ酸はAspとGluであることが判明した。

2) 転移作用の分子解析：本酵素は転移反応を主に触媒し、中型の長鎖オリゴ糖を生産する。 α -アミラーゼ・ファミリー酵素に属すが、反応が極めてユニークである。X線構造解析の結果から、oligo-1,6-glucosidaseとの類似が観察されたため、当該酵素を用いた解析を行った。ドメインBにあるループをoligo-1,6-glucosidaseのものと同置換すると、活性が低下した。従って、転移作用に関わる構造因子が当該ループに存在することが判明した。ここには2つの芳香族アミノ酸があった。一方を他のアミノ酸に変異すると、ループ置換体の場合と同様な失活が観察されたことから、同アミノ酸が反応に関与すると考えられた。なお、存在部位は活性部位の遠位であることから「本残基は長鎖受容体基質の結合に重要な作用」を担っていると考えられた。また、他方の芳香族アミノ酸は興味深い結果を示し、置換するアミノ酸の種類に依存した作用が認められ、転移活性を変化させた。すなわち、

大きな側鎖を有する残基に変異させると活性低下を招いたが、小さな残基への置換は逆に著しい活性上昇を与えた。また、重合度14までの中型オリゴ糖も合成した。これらの結果は、活性増加と長鎖オリゴ糖生成に成功したことを意味する。本芳香族アミノ酸は、活性部位より離れた部位にあり「受容体基質と強く相互作用」していると考えられた。以上に述べた存在サイトが活性中心より遠位にある2つの芳香族アミノ酸の機能からも「転移反応と伸長反応が別個の構造因子で制御されていること」を支持する。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト：

① 酵素：本研究で用いた2つの酵素は、機能未知な転移反応を触媒する。そのため、国内外で研究している科学者は殆ど皆無であり、新規な知見を提供できた。

② 学術的な点：多糖合成酵素のC末端領域の削除体に多糖伸長反応の大幅低下を見出した点は学術的な価値が高い。これにより本作用の構造因子を究明できる手掛かりが得られ、基本原理の獲得・発展が可能になった。本研究が多糖合成において最も主張したいことは、既存原理（転移反応のみからの説明）ではなく、「新たな機構（伸長反応）を新原理として発展」させることである。この新たな原理の確立・発展を目指したい。

③ 高い応用性：構造が異なる新規な多糖や長鎖オリゴ糖が生産可能になり、産業界に提供できる道が切り拓かれた。構造が異なることは「物性変化」を意味し、新素材の候補になると考えられる。

④ 波及効果・社会貢献：2つの酵素における反応機構から新しい酵素阻害剤が構築可能である。特に歯垢を形成する多糖合成酵素の阻害・歯科治療などに貢献できる。

(3) 今後の展望：

① 多糖合成酵素：

1) X線構造解析：結晶化が難航したが、辛抱強く取り組み続けることで、結晶調製と構造解析が可能になると考えている。

2) C末端領域の構造因子：C末端領域にあることが判明した構造因子の推定は、細かな削除作業を必要とする。その際の検定実験と結果解釈が困難であったが、多糖・長鎖オリゴ糖・短鎖オリゴ糖の三者を精密に分離定量する手法を開発することで実現できる。

3) 長鎖オリゴ糖：長鎖オリゴ糖には短鎖オリゴ糖に見られない優れた機能が発見された。このように、多糖合成酵素のC末端削除体や中型オリゴ糖合成酵素を用いて作製する長鎖オリゴ糖に対し良好な機能を期待できる。

② 中型オリゴ糖合成酵素：

1) 長鎖オリゴ糖生産：明らかになった立体構造を活用し、本酵素にアミノ酸置換を発生させることで、さらに長鎖オリゴ糖を生産する変異を導入できると期待する。特に、前項3)

で述べたような優れた機能を発揮する長鎖オリゴ糖を製造・供給できる。

2) 生成物特異性：立体構造の活用で、転移反応の基質特異性（供与体基質や受容体基質）を制御可能と考えられる。これにより生成物をコントロールすることができ、新たな糖質を提供できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

- ① Nobuhiro Suzuki, Zui Fujimoto, Young-Min Kim, Mitsuru Momma, Naomi Kishine, Ryuichiro Suzuki, Shiho Suzuki, Shinsichi Kitamura, Mikihiko Kobayashi, Atsuo Kimura, Kazumi Funane: Structural elucidation of cyclization mechanism of α -1,6-glucan by *Bacillus circulans* T3040 cyclisomaltooligosaccharide glucanotransferase. **J Biol Chem** 288(26): in press, 2014. (査読有)
doi:10.1074/jbc.M114.547992
- ② Kazumi Funane, Hitomi Ichinose, Motomi Araki, Ryuichiro Suzuki, Keitarou Kimura, Zui Fujimoto, Mikihiko Kobayashi, Atsuo Kimura: Evidence for cyclisomaltooligosaccharide production from starch by *Bacillus circulans* T-3040. **Appl Microbiol Biotechnol** 98(9):3947-3954, 2014. (査読有)
doi:10.1007/s00253-014-5515-z
- ③ 木村淳夫: 糖質酵素の分子機構に関する研究. **応用糖質科学** 4(1):3-16, 2014. (査読有)
http://jsag.jp/index_j.html
- ④ Wataru Saburi, Momoko Kobayashi, Haruhide Mori, Masayuki Okuyama, Atsuo Kimura: Replacement of the catalytic nucleophile aspartyl residue of dextran glucosidase by cysteinesulfinate enhances transglycosylation activity. **J Biol Chem** 288(44):31670-31677, 2013. (査読有)
doi:10.1074/jbc.M113.491449
- ⑤ Nobuhiro Suzuki, Young-Min Kim, Mitsuru Momma, Zui Fujimoto, Mikihiko Kobayashi, Atsuo Kimura, Kazumi Funane: Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analyses of cyclisomaltooligosaccharide glucanotransferase from *Bacillus circulans* T-3040. **Acta Crystallogr F** 69:946-949, 2013. (査読有)
doi:10.1107/S174430911301991X
- ⑥ Takayoshi Tagami, Keitaro Yamashita, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Min Yao, Atsuo Kimura: Molecular basis for the recognition of long-chain substrates by plant α -glucosidase. **J Biol Chem** 288(26):19296-19303, 2013. (査読有)
doi:10.1074/jbc.M113.465211
- ⑦ Aki Shinoki, Weeranuch Lang, Charin Thawornkuno, Hee-Kwon Kang, Yuya Kumagai, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Atsuo Kimura, Satoshi Ishizuka, Hiroshi Hara: A novel mechanism for promotion of quercetin glycoside absorption by megallo α -1,6-glucosaccharide in the rat small intestine. **Food Chem** 136(2):293-296, 2013. (査読有)
doi:10.1016/j.foodchem.2012.08.028
- ⑧ Takayoshi Tagami, Masayuki Okuyama, Hiroyuki Nakai, Young-Min Kim, Haruhide Mori, Kazunori Taguchi, Birte Svensson, Atsuo Kimura: Key aromatic residue, possibly presenting at subsite +2 and +3, of glycoside hydrolase family 31 α -glucosidase regulates recognition on long-chain substrates. **Biochim Biophys Acta** 1834(1):329-335, 2013. (査読有)
doi:10.1016/j.bbapap.2012.08.007
- ⑨ Lukana Ngiwsara, Gaku Iwai, Takayoshi Tagami, Natsuko Sato, Hiroyuki Nakai, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Atsuo Kimura: 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. (査読有)
doi:10.1271/bbb.120473
- ⑩ Young-Min Kim, Eiji Yamamoto, Min-Sun Kang, Hiroyuki Nakai, Wataru Saburi, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Kazumi Funane, Doman Kim, Atsuo Kimura: *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 glycoside hydrolase family 66 homolog catalyzes dextranolytic and cyclization reactions. **FEBS J**, 279(17): 3185-3191, 2012. (査読有)
doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08698.x
- ⑪ Hitoshi Iwaya, Jae-Sung Lee, Shinya Yamagishi, Aki Shinoki, Weeranuch Lang, Hee-Kwon Kang, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Hiroshi Hara, Atsuo Kimura, Satoshi Ishizuka: Degree of polymerization in dietary α -1,6-glucosaccharides modulates symptom of experimental colitis in rats. **Plos One** 7(11):e50658, 2012. (査読有)
doi:10.1371/journal.pone.0050658
- ⑫ Ryuichiro Suzuki, Kazue Terasawa, Keitarou Kimura, Zui Fujimoto, Mitsuru Momma, Mikihiko Kobayashi, Atsuo Kimura, Kazumi Funane: Biochemical characterization of a cyclisomaltooligosaccharide glucanotransferase from *Paenibacillus* sp. 598K. **Biochim Biophys Acta** 1824(7), 919-924 2012. (査読有)
doi:10.1016/j.bbapap.2012.04.001
- ⑬ Young-Min Kim, Yoshiaki Kiso, Tomoe Muraki, Min-Sun Kang, Hiroyuki Nakai, Wataru Saburi, Weeranuch Lang, Hee-Kwon Kang, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Ryuichiro Suzuki, Kazumi Funane, Nobuhiro Suzuki, Mitsuru Momma, Zui Fujimoto, Tetsuya Oguma, Mikihiko Kobayashi, Doman Kim, Atsuo Kimura: Novel dextranase catalyzing cyclisomaltooligosaccharide-formation and its identification of catalytic amino acids and

their functions using chemical rescue approach. **J Biol Chem** 287(24): 19927-19935, 2012. (査読有)
doi:10.1074/jbc.M111.339036

- ⑮ Nobuhiro Suzuki, Young-Min Kim, Zui Fujimoto, Mitsuru Momma, Yasuyuki Okuyama, Haruhide Mori, Kazumi Funane, Atsuo Kimura: Structural elucidation of dextran degradation mechanism by *Streptococcus mutans* dextranase belonging to glycoside hydrolase family 66. **J Biol Chem** 287(24): 19916-19926, 2012. (査読有)
doi:10.1074/jbc.M112.342444

[学会発表] (計 1 1 件)

- ① Yuya Kumagai, Juri Sadahiro, Weeranuch Lang, Young-Min Kim, Michiyo Kanegae, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Kazumi Funane, Zui Fujimoto, Satoshi Ishizuka, Hiroshi Hara, Doman Kim, Atsuo Kimura: Molecular mechanism of novel enzymes forming megalosaccharides. Korean Society for Microbiology and Biotechnology, 2014年6月25日~2014年6月27日, BEXCO (Busan, 韓国): 招待講演.
- ② 熊谷 祐也, Lang Weeranuch, 貞廣 樹里, 奥山 正幸, 森春英, 木村 淳夫: *Gluconobacter oxydans* 由来 dextran dextrinase の直鎖イソマルトメガロ糖の効率的な合成に関わる領域の解析. 日本農芸化学会 2014年度大会, 2014年3月27日~2014年3月30日, 明治大学 (川崎市多摩区).
- ③ 木村 淳夫: 糖質酵素の分子機構に関する研究. 新規な糖質機能の発見と応用. 平成 25 年度日本応用糖質科学会北海道支部シンポジウム, 2013年2月3日, 北農ビル (札幌市中央区): 招待講演.
- ④ 熊谷 祐也, Weeranuch Lang, 貞廣 樹里, 奥山 正幸, 森 春英, 木村 淳夫: *Gluconobacter oxydans* 由来 dextran dextrinase の直鎖イソマルトメガロ糖の合成に関わる領域. 日本農芸化学会北海道支部講演会, 2013年11月29日~2013年11月30日, 北海道大学農学部 (札幌市北区).
- ⑤ 貞廣 樹里, 森 春英, 佐分利 亘, 奥山 正幸, 木村 淳夫: *Gluconobacter oxydans* が産生する2つのデキストラン合成酵素の同一性に関する解析. 日本農芸化学会北海道支部講演会, 2013年11月29日~2013年11月30日, 北海道大学農学部 (札幌市北区).
- ⑥ 木村 淳夫: 糖質酵素の分子機構に関する研究. 日本農芸化学会北海道支部講演会, 2013年11月29日~2013年11月30日, 北海道大学農学部 (札幌市北区): 招待講演.
- ⑦ 木村 淳夫: 糖質酵素の分子機構に関する研究. 応用糖質科学会平成 25 年度大会, 2013年9月25日~2013年9月27日, 城山観光ホテル (鹿児島市): 学会賞受賞講演.
- ⑧ 熊谷祐也, Weeranuch Lang, 貞廣樹里, 奥山正幸, 森春英, 木村 淳夫: *Gluco-*

nobacter oxydans 由来 dextran dextrinase による直鎖イソマルトメガロ糖の酵素合成. 応用糖質科学会平成 25 年度大会, 2013年9月25日~2013年9月27日, 鹿児島大学農学部 (鹿児島市): ポスター受賞.

[図書] (計 1 件)

- ① Atsuo Kimura, Kaiseisha Press, Molecular mechanism of carbohydrate-active enzymes and their application, 2012, pp.42-45.

[その他]

- (1) ホームページ等
<http://www.agr.hokudai.ac.jp/rfoa/abs/abs2-3.html>

(2) アウトリーチ活動情報

- ① 奥山正幸, 木村淳夫: 平成 2 4 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: 平成 2 5 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)

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