

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780091

研究課題名(和文) 2つの新規な糖質ホスホリラーゼの分子解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of two novel carbohydrate phosphorylases

研究代表者

佐分利 亘 (Saburi, Wataru)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00598089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：反芻動物の第一胃ルーメンに共生する偏性嫌気性細菌Ruminococcus albusは二つのマンノシルグルコースホスホリラーゼ(I型酵素とII型酵素)を持つ。基質特異性を検討したところ、I型酵素はマンノシルグルコースに特異的な酵素であり、II型酵素はマンノオリゴ糖に高い活性を示す酵素であることが判明した。合成反応では、I型酵素のみ6-OHグルコース誘導体をアクセプタ基質とした。アミノ酸配列の比較から推定したアミノ酸残基の変異酵素の解析から、I型酵素のAsp129が触媒残基と考えられた。また、I型酵素のIle212がグルコース6位誘導体への合成活性に重要な残基であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：A ruminal anaerobic bacterium, Ruminococcus albus, has two mannosylglucose phosphorylase isozymes (Type-I and Type-II), phosphorylating mannosylglucose to alpha-mannose 1-phosphate and glucose. Analysis of substrate specificity revealed that Type-I was specific to mannosylglucose, but Type-II had higher activity to manno-oligosaccharide than mannosylglucose. These enzymes showed different acceptor substrate specificity in the synthetic reaction: Type-I enzyme showed synthetic activity to 6-OH glucose derivatives unlike in contrast to Type-II, which was completely inert to these substrates. Asp129 of Type-I enzyme was determined to be catalytic amino acid residue based on sequence comparison and site-directed mutagenesis analysis. Ile212 of Type-I enzyme was important for recognition of 6-OH glucose derivatives as acceptor substrates in the synthetic reaction (reverse reaction).

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：マンノシルグルコースホスホリラーゼ マンナン 基質特異性 Ruminococcus albus 活性中心

1. 研究開始当初の背景

偏性嫌気性細菌 *R. albus* や *Bacteroides fragilis* は、セロピオース(-1,4-グルコシル-グルコース)の還元末端側のグルコース残基をエピメリ化して -1,4-グルコシル-マンノースを生成するセロピオース 2-エピメラーゼを生産する。1967年に Tyler らが本酵素を発見して以来、このユニークな酵素の生理学的意義は謎であったが、本酵素がセロピオースよりマンノピオース(-1,4-マンノシル-マンノース)に高い活性を示すこと、反応の平衡がマンノピオースからの反応生成物である -1,4-マンノシル-グルコースに偏っていることから、セロピオース 2-エピメラーゼの生体内での役割は、マンノピオースからの -1,4-マンノシル-グルコース (Man-Glc) の生成であると考えられた。

我々は Man-Glc を分解して解糖系へと導く酵素の存在を予想し、*R. albus* および *B. fragilis* の無細胞抽出液から Man-Glc をリン酸緩衝液中で -マンノース 1-リン酸 (Man1P) とグルコースに分解する酵素 (MGP) の存在を認めた。我々は、*R. albus* の無細胞抽出液から酵素の精製を行い、二つの MGP (I 型と II 型) を単離し、コードする遺伝子を決定することでこれらがアイソザイムであることを確認した。得られた推定アミノ酸配列は既知酵素のいずれとも配列類似性を示さず、触媒する反応だけでなく、構造的にも新規な酵素であることが明らかになった。また、得られた二つの酵素間のアミノ酸配列の一致度も約 30% と低く、アイソザイム間の機能的な相違点も期待された。

2. 研究の目的

本研究では、*R. albus* 由来の 2 つの MGP を対象とし、大腸菌組換え酵素を用いて生化学的諸性質を詳細に検討することで“マンノシドを加リン酸分解する”初めての酵素の機能を解明する。また、本酵素は既知の糖質ホスホリラーゼとは全く異なる構造を有することから、活性中心やユニークな基質認識に関する構造因子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 組換え酵素の生産

R. albus 由来 I 型 MGP (Rumal_0852) と II 型 MGP 遺伝子 (Rumal_0099) をそれぞれ大腸菌発現用ベクター pET23a に連結し、大腸菌 BL21 (DE3) に導入した。得られた形質転換体を LB 培地 (I 型酵素では 0.5 L, II 型酵素では 1.5 L) に植菌し、0.1 mM イソプロピル-β-D-ガラクトピラノシド存在下、18 にて 16 時間組換えタンパク質の誘導培養を行った。得られた形質転換体より組換え酵素を電気泳動的に単一になるまで精製し、以下の解析に用いた。

(2) 部位特異的変異酵素の作製

部位特異的変異酵素の発現プラスミドの

作製には、Primestar Mutagenesis Basal Kit (タカラバイオ) を使用した。変異酵素は、野生型酵素と同様に精製し、解析に用いた。

(3) 酵素活性の測定

Man-Glc 加リン酸分解活性の測定では 2 mM Man-Glc と 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を基質として 37 にて 10 分間酵素を作用させ、遊離グルコース量を求めた。反応は、3 分間煮沸して停止した。グルコース量は、グルコースオキシダーゼ-ペルオキシダーゼ法により定量した。Man-Glc に対する速度パラメータの測定では、種々の濃度の Man-Glc およびリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) に対する反応速度を測定し、sequential 反応の速度式 ($v = k_{cat}[A][B]/(K_{iA}K_{mB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B])$) にフィッティングさせることで速度パラメータを算出した。II 型 MGP によるマンノオリゴ糖に対する加リン酸分解活性の解析では、種々の濃度のマンノオリゴ糖と 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) に作用させ、重合度が 1 減少したマンノオリゴ糖を HPLC により定量し、反応速度を算出した。得られた反応速度をミカエリスメンテンの速度式に回帰させることで見かけの速度パラメータを算出した。

逆反応 (合成反応) の反応速度の測定では、10 mM Man1P を糖供与体とし、10 mM グルコースを糖受容体として反応に用いた。酵素反応後、遊離した無機リン酸を常法に従って定量して反応速度を求めた。受容体特異性の解析では、種々の糖を受容体として用いて合成活性を測定した。種々の糖受容体濃度における合成反応速度を測定し、上記と同様に見かけの速度パラメータを算出した。

(4) タンパク質濃度の測定

精製酵素を塩酸により完全に加水分解して得られる生成したアミノ酸濃度に基づき、酵素濃度を算出した。

4. 研究成果

(1) 組換え I 型 MGP と II 型 MGP の調製と一般的な諸性質

I 型 MGP と II 型 MGP 遺伝子を大腸菌に導入し、組換えタンパク質を生産して電気泳動的に単一に精製した。I 型 MGP の Man-Glc に対する比活性は 55.2 U/mg であり、II 型酵素は 2.03 U/mg であった。両酵素の分子質量は SDS-PAGE でそれぞれ 45 kDa と 38 kDa と見積もられたが、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーではそれぞれ 80 kDa と 209 kDa と見積もられた。このことから、I 型 MGP は 2 量体、II 型 MGP は 6 量体であると考えられた。両酵素共に pH 6.5 で最大活性を示した。I 型酵素は pH 4.5~10.5 (4, 24 h), 45 以下 (pH 6.5, 20 分間) で安定であり、II 型酵素は pH 3.5-9.5, 40 以下で安定であった。

(2) Man-Glc 合成反応と分解反応の速度論的解析

種々の濃度の無機リン酸および Man-Glc における I 型 MGP と II 型 MGP の加リン酸分解速度を測定した。その結果、各無機リン酸濃度における $1/[v]-1/[\text{ManGlc}]$ プロットから得られた直線群は 1 点で交わったことから、両酵素は共に Man-Glc の加リン酸分解を sequential bi bi 機構により触媒することが明らかになった。得られた速度パラメータを表 1 にまとめた。I 型酵素の Man-Glc 加リン酸分解の k_{cat} 値は II 型酵素の 4.8 倍高く、Man-Glc に対する K_m 値は II 型酵素の 1/91 であった。すなわち、I 型酵素の方が II 型酵素より Man-Glc に対して著しく高い親和性を持つことが明らかになった。リン酸に対する K_m 値は II 型酵素の方が低く、I 型酵素の 1/12 であった。Man1P とグルコースを基質とした逆反応についても加リン酸分解と同様に速度パラメータを求めた。その結果、I 型 MGP の k_{cat} 値は II 型 MGP より 6.6 倍高く、グルコースに対する K_m は II 型酵素の 1/4 程度であった。このことは、I 型 MGP の方が II 型 MGP よりもグルコースに対して高い特異性を持つアクセプタ結合部位を持つことを意味する。Man1P に対する K_m は II 型酵素の値が I 型酵素より低く、I 型酵素の 1/18 であった。このことは、II 型 MGP が無機リン酸に対して高い親和性を示したことと一致した。

表 1. ManGlc 加リン酸分解と合成の速度パラメータ

		I型MGP	II型MGP
Phosphorolysis	k_{cat} (s^{-1})	83.3 ± 5.8	17.5 ± 1.3
	$K_{\text{mMan-Glc}}$ (mM)	0.304 ± 0.070	27.7 ± 2.7
	K_{mPi} (mM)	5.34 ± 0.47	0.444 ± 0.1
	$K_{\text{sMan-Glc}}$ (mM)	7.70 ± 0.24	30.3 ± 6.0
Synthesis	k_{cat} (s^{-1})	204 ± 20	30.9 ± 1.9
	K_{mGlc} (mM)	38.2 ± 5.2	142 ± 12
	K_{mMan1P} (mM)	5.80 ± 0.93	0.324 ± 0.1
	K_{sGlc} (mM)	7.65 ± 1.45	51.5 ± 25.7

(3) 基質特異性の比較

まず加リン酸分解の特異性を検討するため、セロビオースおよびラクトースに対する加リン酸分解活性を調べたが、いずれのアイソザイムも加リン酸分解活性を示さなかった。すなわち、これらの酵素はいずれも非還元性末端のマンノシル基を厳密に認識していることが明らかになった。

次に、逆反応における受容体基質に様々な糖質を用い、各アイソザイムの受容体特異性を評価した (図 1)。その結果、I 型酵素はキシロースに対しても若干合成活性を示したが、グルコースにのみ高い合成活性を示した。グルコースとキシロースをアクセプタとした反応で生成したオリゴ糖は、単離後、質量分析と NMR 分析を行い、それぞれ Man-Glc と α -D-マンノシル-(1-4)-キシロースであることを確認した。一方、II 型酵素は、グルコース以外の糖にも合成活性を示し、オリゴ糖、特にマンノオリゴ糖に対する合成活性がグルコースに対する活性よりも著しく高いこ

とが明らかになった。セロビオース、マンノビオースおよびジアセチルキトビオースを受容体とした反応で生成した 3 糖は、いずれも非還元性末端にマンノシル基が付加されたオリゴ糖であった。本酵素は、I 型酵素が受容体としたキシロースに対する合成活性を示さず、I 型酵素が受容体としなかったマンノースやアロースに合成活性を示した。このことから、I 型酵素は Man-Glc に特異的な加リン酸分解酵素、II 型酵素は Man-Glc よりマンノオリゴ糖に高い活性を示す新規な加リン酸分解酵素であることが示唆された。

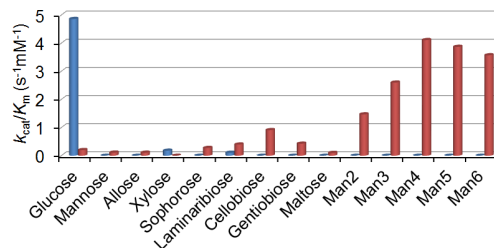


図 1. I 型 MGP と II 型 MGP の受容体特異性。それぞれの受容体に対する反応効率を図示した。青色のバーは I 型 MGP、赤色のバーは II 型 MGP を示す。Man2~6 はそれぞれ重合度 2~6 のマンノオリゴ糖を示す。

次に、II 型 MGP の各種マンノオリゴ糖に対する加リン酸分解の速度パラメータを求めた (表 2)。その結果、本酵素はマンノテトラオースを最も良い基質とし、Man-Glc に対する反応効率の 14.1 倍の反応効率を示した。本酵素のマンノビオースに対する加リン酸分解活性は低く、反応効率は Man-Glc の 1/5 程であった。以上のことから、II 型 MGP は 3 糖以上のマンノオリゴ糖を加リン酸分解する新規酵素であることが明らかになった。本酵素については α -1,4-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼと命名し、EC 2.4.1.319 として登録された。

表 2. II 型 MGP によるマンノオリゴ糖に対する加リン酸分解の速度パラメータ

	k_{catapp} (s^{-1})	K_{mapp} (mM)	$k_{\text{catapp}}/K_{\text{mapp}}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	relative $k_{\text{catapp}}/K_{\text{mapp}}$ (-fold)
Man-Glc	20.7 ± 0.7	28.4 ± 1.6	0.729	1
β -1,4-mannobiose	7.06 ± 1.52	44.5 ± 11.0	0.159	0.218
β -1,4-mannotriose	27.5 ± 6.1	7.94 ± 3.30	3.46	4.75
β -1,4-mannotetraose	33.1 ± 10.3	3.21 ± 1.66	10.3	14.1
β -1,4-mannopentaose	31.9 ± 12.4	4.55 ± 2.76	7.01	9.62

R. albus におけるマンナンの代謝経路を推定した (図 2)。マンナンはまず、菌体外マンナーゼにより分解されてマンノオリゴ糖となる。このうち、3 糖以上のものは II 型 MGP により加リン酸分解を受けマンノビオースまで分解される。マンノビオースはセロビオース 2-エピメラーゼにより異性化されて Man-Glc となったのち、I 型 MGP により Man1P とグルコースに代謝される。

(4) MGP における触媒残基の決定

MGP の発見から、種々の微生物のゲノム情報に基づき、類縁タンパク質群がファミリーを形成することが明らかになり、糖質加水分

解酵素ファミリー130 (GH130)として分類された。MGPのような基質の立体配座の反転を伴う(1-4結合を切断して-Man1Pを生成)加リン酸分解酵素は立体配座の反転を伴う糖質加水分解酵素と構造的に類似していることが多く、反応機構も類似していると考えられている。反転型加リン酸分解酵素の加リン酸分解反応では、無機リン酸が基質非還元末端残基のアノメリック炭素を求核触媒し、酸性アミノ酸残基がグリコシド酸素にプロトンを与える一般酸塩基触媒として働くと考えられている(図3)。

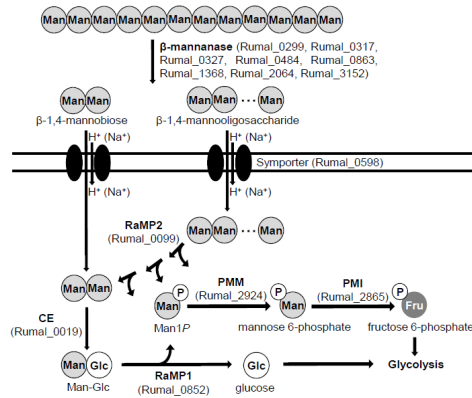


図2. *R. albus*におけるマンナン代謝経路

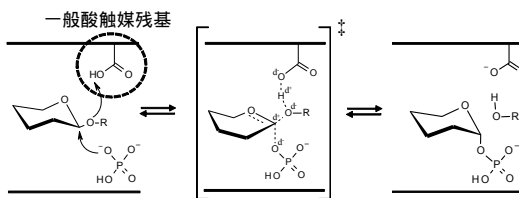


図3. 糖質ホスホリラーゼの反応機構

MGPにおける一般酸塩基触媒残基を決定するため、GH130のアミノ酸配列を多重整列し、本ファミリーにおいて完全に保存されている酸性アミノ酸残基を検索した。その結果、I型MGPのAsp129, Glu311およびAsp341が見出された。これらのアミノ酸残基を置換した変異酵素D129N, E311QおよびD341Nを作製し、活性を検討した。まず、これらの変異酵素を生産した大腸菌の無細胞抽出液におけるMan-Glc加リン酸分解活性を測定すると、D129NとD341Nでは活性が検出されなかった。このためこれらのいずれかが触媒残基であると推定し、精製酵素を用いてさらに解析を進めた。精製D129NとD341Nの2 mM Man-Glcに対する100 mMリン酸ナトリウム緩衝液中での加リン酸分解活性は、それぞれ 6.66×10^{-3} U/mgおよび 1.23×10^{-4} U/mgであり、野生型酵素の 1.21×10^{-2} %および 2.23×10^{-4} %であった。グリコシダーゼの一般塩基触媒残基変異酵素では、アジ化ナトリウムやギ酸の添加により機能相補されて活性が回復するケミカルレスキューと呼ばれる現象が知られている。加リン酸分解酵素の場合、合成反応において触媒残基の酸性アミノ酸残基は一般塩基触媒として機能する。そこで、D129N

とD341Nについてアジ化ナトリウムやギ酸存在下で合成活性を測定した(図4)。その結果、D341Nのみがこれらの試薬の添加により活性の上昇が見られた。このD341Nの活性の増加は、NaCl, NaNO₃, NaFおよびNaBrでも確認され、さらに触媒残基が一般酸触媒として働く加リン酸分解反応でもこれらの試薬の添加による活性の増加が見られた。このことは、反応液に添加した試薬が活性残基の代わりに一般塩基触媒として働いたのではなく、むしろアミノ酸置換により失われた酵素と基質の相互作用を相補したと考えられた。すなわち、Asp341は触媒残基というよりはむしろ基質との相互作用に重要な働きを持つアミノ酸残基であると推定された。このことから、もう一方のAsp129が本酵素の触媒残基であると結論付けた。この結論は最近明らかにされた*Bacteroides fragilis*由来MGPの結晶構造から推定された触媒残基と矛盾しない。

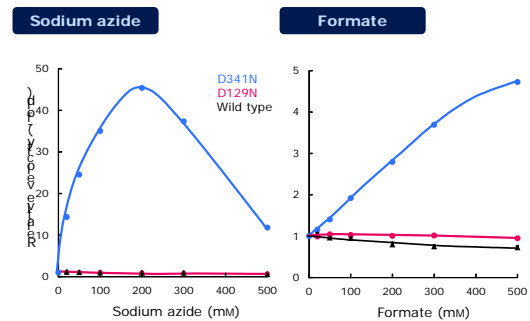


図4. アジ化ナトリウムおよびギ酸存在下でのD341NおよびD129Nの活性

(5) I型MGPとII型MGPにおけるアクセプタ特異性の違いを導く構造因子の決定

I型MGPとII型MGPのアクセプタ特異性を比較すると、I型酵素はグルコース6-OH誘導体に対して活性を示すが、II型酵素は示さない。*B. fragilis*由来MGPのMan-Glc複合体の構造を基に6位水酸基周辺のアミノ酸残基をI型酵素とII型酵素で比較すると、グルコースの6位炭素と疎水的相互作用をしていると推定されるIle212がII型酵素では保存されておらず、His186が対応することが判明した。そこで、I型MGPのIle212をHisに置換した変異酵素I212Hを作製した。I212H変異酵素のMan-Glcに対する比活性は20.5 U/mgであり、野生型酵素の37%であった。グルコース6位誘導体に対する特異性を解析すると、野生型酵素では、6-デオキシグルコース、6-デオキシ-6-フルオログルコースおよびキシロースに対する合成活性(10 mM Man1P存在下での k_{cat}/K_m)がグルコースのそれぞれ31%, 6%および4%であるのに対し、I212Hではそれぞれ12%, 2%および6%であった。すなわち、Ile212の置換によりグルコース6位誘導体に対する特異性が低下した。このことからI型MGPにおいてグルコース6位誘導体に対する高い活性にはIle212が重要であることが明らかになった。

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 13 件)

1. T. Fujiwara, W. Saburi, *et al.*, Structural insights into the epimerization of β -1,4-linked oligosaccharides catalyzed by cellobiose 2-epimerase, the sole enzyme epimerizing non-anomeric hydroxyl groups of unmodified sugars, *J. Biol. Chem.*, **289**, 3405-3415 (2014). (査読有)
2. T. Ojima, W. Saburi, *et al.*, Identification and characterization of cellobiose 2-epimerase from various aerobes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 189-193 (2013). (責任著者) (査読有)
3. T. Fujiwara, W. Saburi, *et al.*, Crystal structure of *Ruminococcus albus* cellobiose 2-epimerase: structural insights into epimerization of unmodified sugar, *FEBS Lett.*, **587**, 840-846 (2013). (査読有)
4. W. Saburi, N. Morimoto, *et al.*, Thermophilic alkalophilic α -amylase from *Bacillus* sp. AAH-31 has a novel domain organization of glycoside hydrolase family 13 enzymes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1867-1873 (2013). (査読有)
5. S. Wakuta, W. Saburi, *et al.*, Modulation of allosteric regulation by E38K and G101N mutations in the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1854-1859 (2013). (責任著者) (査読有)
6. K. Hamura, W. Saburi, *et al.*, Modulation of acceptor specificity of *Ruminococcus albus* cellobiose phosphorylase through site-directed mutagenesis, *Carbohydr. Res.*, **379**, 21-25 (2013). (筆頭著者扱い) (査読有)
7. T. Sawano, W. Saburi, *et al.*, Characterization of *Ruminococcus albus* celloextrin phosphorylase and identification of a key phenylalanine residue for acceptor specificity and low affinity to the phosphate group, *FEBS J.*, **280**, 4463-4473 (2013). (筆頭著者扱い) (査読有)
8. W. Saburi, M. Kobayashi, *et al.*, Replacement of the catalytic nucleophile aspartyl residue of dextran glucosidase by cysteinesulfinate enhances transglycosylation activity, *J. Biochem. Chem.*, **288**, 31670-31677 (2013). (査読有)
9. M.-H. Kim, W. Saburi, *et al.*, COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 is involved in salt and drought stress tolerance in *Arabidopsis*, *FEBS Open Bio*, **3**, 438-442 (2013). (査読有)
10. Y.-M. Kim, W. Saburi, *et al.*, *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 glycoside hydrolase family 66 homolog catalyzes

dextranolytic and cyclization reactions, *FEBS J.*, **279**, 3185-3191 (2012). (査読有)

11. H. Sato, W. Saburi, *et al.*, Immobilization of a thermostable cellobiose 2-epimerase from *Rhodothermus marinus* JCM9785 and continuous production of epilactose, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1584-1587 (2012). (筆頭著者扱い, 責任著者) (査読有)
12. H. Sato, W. Saburi, *et al.*, Immobilization of a thermostable cellobiose 2-epimerase from *Rhodothermus marinus* JCM9785 and continuous production of epilactose, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1584-1587 (2012). (筆頭著者扱い, 責任著者) (査読有)
13. R. Kawahara, W. Saburi, *et al.*, Metabolic mechanism of mannan in a ruminal bacterium, *Ruminococcus albus*, involving two mannoside phosphorylases and cellobiose 2-epimerase: discovery of a new carbohydrate phosphorylase, β -1,4-mannooligosaccharide phosphorylase, *J. Biol. Chem.*, **287**, 42389-42399 (2012). (筆頭著者扱い, 責任著者) (査読有)

[学会発表](計 29 件)

1. Characterization of a thermophilic 4-O- β -D-mannosyl-D-glucose phosphorylase from *Rhodothermus marinus*: N. Jaito, W. Saburi, *et al.*, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 東京, 2014 年 3 月 29 日.
2. アクセプト結合部位を改変した *Ruminococcus albus* 由来マンノシドホスホリラーゼの基質特異性と反応特性の解析, 尾高 伶, 佐分利 亘, 他, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 東京, 2014 年 3 月 29 日.
3. *Halomonas* sp. H11 株由来 α -グルコシダーゼ D274G 変異酵素の一価カチオンによる活性化機構の解析: 城戸 悠輔, 佐分利 亘, 他, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 東京, 2014 年 3 月 28 日.
4. Physiological analysis of OsTAGG2, a rice β -glucoside glucosidase with higher hydrolytic activity towards salicylic acid β -glucoside: R. Takeda, W. Saburi, *et al.*, 第 55 回植物生理学会年会, 富山, 2014 年 3 月 19 日.
5. シロイヌナズナ β -グルコシダーゼ様タンパク質の生化学的機能解析: 谷口 沙希, 佐分利 亘, 他, 日本農芸化学会 北海道支部講演会, 札幌, 2013 年 11 月 30 日.
6. イネ胚乳 ADP-グルコースピロホスホリラーゼの酵素化学的諸性質: 石塚 佐都子, 佐分利 亘, 他, 日本農芸化学会 北海道支部講演会, 札幌, 2013 年 11 月 30 日.
7. *Cellvibrio vulgaris* NCIMB 8633 のマンナン代謝オペロンの機能解析: 田中 佑果, 佐分利 亘, 他, 日本農芸化学会 北海道支部講演会, 札幌, 2013 年 11 月 30 日.
8. *Halomonas* sp. H11 株由来 α -グルコシダーゼの一価陽イオンによる活性化機構の解

- 析：城戸 悠輔，佐分利 亘，他，日本応用糖質科学会 2013 年度大会，鹿児島，2013 年 9 月 25 日。
9. *Bacillus* sp. AAH-31 株由来 α -アミラーゼの一次構造の解析と N 末端ドメインの機能解析：佐分利 亘，森本 奈保喜，他，日本応用糖質科学会 2013 年度大会，鹿児島，2013 年 9 月 25 日。
 10. セロピオース 2-エピメラーゼの異性化反応機構の解明：藤原 孝彰，佐分利 亘，他，日本応用糖質科学会 2013 年度大会，鹿児島，2013 年 9 月 25 日。
 11. シロイヌナズナ β -グルコシダーゼ様タンパク質の生化学的機能解析：谷口 沙希，佐分利 亘，他，日本農芸化学会北海道支部 夏季シンポジウム，旭川，2013 年 8 月 10 日。
 12. *Halomonas* sp. H11 株由来 α -グルコシダーゼ組換え酵素の大腸菌による生産と諸性質：城戸 悠輔，佐分利 亘，他，日本農芸化学会 2013 年度大会，仙台，2013 年 3 月 26 日。
 13. イネ由来ツペロン酸 β -グルコシドグルコシダーゼアイソザイム 1 の機能解析：武田 遼介，佐分利 亘，他，日本農芸化学会 2013 年度大会，仙台，2013 年 3 月 26 日。
 14. イネ由来ツペロン酸 β -グルコシドグルコシダーゼアイソザイムのアグリコン認識メカニズムの解析：姫野 奈美，佐分利 亘，他，日本農芸化学会 2013 年度大会，仙台，2013 年 3 月 26 日。
 15. シロイヌナズナにおける CYP94B2 の機能解析：天野 就基，佐分利 亘，他，日本農芸化学会 2013 年度大会，仙台，2013 年 3 月 26 日。
 16. デキストラン合成酵素 dextran dextrinase の触媒残基およびその機能の決定：貞廣 樹里，佐分利 亘，他，日本農芸化学会 2013 年度大会，仙台，2013 年 3 月 25 日。
 17. COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 regulates salt and drought stress tolerance in *Arabidopsis*: S. Sato, W. Saburi, et al., 第 54 回日本植物生理学会年会，岡山，2013 年 3 月 21-23 日。
 18. イネの傷害時の SAG を donor とした TA に対する糖転移反応：竹松 知紀，佐分利 亘，他，平成 24 年度日本農芸化学会北海道支部講演会，札幌，2012 年 11 月 2 日。
 19. 組換えツペロン酸グルコシドグルコシダーゼの酵素化学的諸性質の解析：武田 遼介，佐分利 亘，他，平成 24 年度日本農芸化学会北海道支部講演会，札幌，2012 年 11 月 2 日。
 20. ツペロン酸グルコシド加水分解酵素の基質認識機構の解明：姫野 奈美，佐分利 亘，他，平成 24 年度日本農芸化学会北海道支部講演会，札幌，2012 年 11 月 2 日。
 21. *Bacillus* sp. AAH-31 株由来耐熱性アルカリ α -アミラーゼの高機能化に関する研究：玉村 尚也，佐分利 亘，他，平成 24 年度日本農芸化学会北海道支部講演会，札幌，2012 年 11 月 2 日。
 22. セロピオース 2-エピメラーゼを用いたエピラクトースの実用的酵素合成法の開発，佐分利 亘，小島 晃代，他，応用糖質科学シンポジウム，東京，2012 年 9 月 21 日。
 23. *Ruminococcus albus* 由来セロピオース 2-エピメラーゼ (RaCE) の X 線結晶構造解析，藤原 孝彰，佐分利 亘，他，日本応用糖質科学会 2012 年度大会，東京，2012 年 9 月 20 日。
 24. シロイヌナズナ ADP-glucose pyrophosphorylase 遺伝子の発現制御因子の解析，石塚 佐都子，佐分利 亘，他，日本応用糖質科学会 2012 年度大会，東京，2012 年 9 月 19 日。
 25. *Ruminococcus albus* NE1 株由来マンノシルグルコースホスホリラーゼ (RaMP1) の一般酸触媒残基の解析，尾高 伶，佐分利 亘，他，日本応用糖質科学会 2012 年度大会，東京，2012 年 9 月 19 日。
 26. *Ruminococcus albus* 由来セロデキストリンホスホリラーゼの諸性質とリン酸結合部位の解析，澤野 達也，佐分利 亘，他，日本応用糖質科学会 2012 年度大会，東京，2012 年 9 月 19 日。
 27. cellobiose phosphorylase の epilactose phosphorylase への改変：羽村 健，佐分利 亘，他，日本応用糖質科学会 2012 年度大会，東京，2012 年 9 月 19 日。
 28. W. Saburi, R. Kawahara, et al., Biochemical characterization of two mannosyl glucose phosphorylase isozymes from *Ruminococcus albus*, 26th International Carbohydrate Symposium, Madrid, Spain, 22-27, July, 2012.
 29. H. Mori, W. Saburi, et al., Domain organization and catalytic amino acids of dextran dextrinase: structural similarity to inverting glucodextranase in catalytic domain, 26th International Carbohydrate Symposium, Madrid, Spain, 22-27, July, 2012.
- 〔図書〕(計 0 件)
 〔産業財産権〕
 出願状況 (計 0 件)
 取得状況 (計 0 件)
 〔その他〕
 ホームページ等 北海道大学大学院農学研究院生物化学研究室
<http://www.agr.hokudai.ac.jp/biochem/>
 6. 研究組織
 (1) 研究代表者 佐分利 亘 (SABURI, Wataru)
 北海道大学・大学院農学研究院・助教
 研究者番号：598089
 (2) 研究分担者 なし
 (3) 連携研究者 なし