

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780095

研究課題名(和文)新規ホスホリラーゼを活用した機能性オリゴ糖のライブラリー構築及び網羅的機能性評価

研究課題名(英文)Enzymatic synthesis of functional oligosaccharides by novel carbohydrate phosphorylases

研究代表者

中井 博之(Nakai, Hiroyuki)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：00400002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：生体内糖質代謝に関与する糖質加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)によるオリゴ糖合成収率は高く、産業上有用な酵素になり得る。しかしながら、既知のホスホリラーゼの報告例は少なく、今後生産可能なオリゴ糖のバリエーション拡大には、新たなホスホリラーゼの発見が必須であった。そこでglycoside hydrolase family 65、94、130に属する微生物由来のホスホリラーゼ様タンパク質の機能性解析を行った結果、これまで報告例のない基質特異性を示すホスホリラーゼを複数発見することができた。また今回得られた新規酵素群の糖受容体特異性を調査することで、多種多様なヘテロオリゴ糖の生産にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Phosphorylases are exolytic enzymes catalyzing phosphorolysis of particular glycosides to produce sugar 1-phosphate with strict substrate specificity. The reaction is reversible, enabling the practical synthesis of oligosaccharides. However, there is little variation among phosphorylases and this limits their utilization for the production of oligosaccharides. Therefore, it would be beneficial to identify phosphorylases with previously unreported substrate specificities. In this study, several bacterial phosphorylase homologues belonging to glycoside hydrolase family 65, 94, and 130 are characterized to be novel phosphorylases showing unreported substrate specificities. In addition, a variety of heterooligosaccharides were synthesized by the reverse phosphorolysis catalyzed by the novel phosphorylases.

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：酵素 オリゴ糖

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖質は生物の生命維持に必要不可欠であり、生命現象の根幹に関わる重要な機能を果たす。その糖質の生体内での合成および分解は酵素反応により行われている。糖質グリコシド結合の消長に關与する酵素は、水的作用により分解生成物を得る加水分解酵素、リン酸ジエステル結合の高エネルギー化により糖質合成を触媒する糖核酸エステル転移酵素、無機リン酸存在下での糖 1-リン酸生産を触媒する加リン酸分解酵素の 3 種類に分類される。

(2) 現在までに多種多様な加水分解酵素および糖核酸エステル転移酵素が見出され、その生物学的意義から詳細な機能・構造解析が進められている。一方で、加リン酸分解酵素の報告例は著しく少なく、他の糖質関連酵素に比べて知見が乏しい。近年ゲノム全塩基配列の解読を目標としたゲノムプロジェクトが様々な生物種を対象に実施されており、今後新たな機能を有する加リン酸分解酵素の発見の可能性は極めて高い。新規糖質関連酵素の発見および機能解明は、生体内での糖質代謝機構を理解する上で学術的に非常に重要であると同時に、食品産業的にも糖質関連酵素群が担う役割は大きい。特に、加水分解酵素は高分子多糖の糖化を目的として幅広く工業的に利用されている。一方で加水分解反応では生成物が複数生じることが多く、単一の糖質の大量調製法としては不向きであり、オリゴ糖をはじめとする種々の糖質の選択的な大量調製法の確立が望まれている。そこで糖核酸エステル転移酵素の糖質・複合糖鎖合成への利用が期待されるが、糖供与体として使用する糖ヌクレオチドのコストおよび本酵素群の安定性の問題から実用的な利用には至っていないのが現状である。またオリゴ糖調製の手法として有機合成法も有用であるが、保護・脱保護を含む多段の反応段階を経る必要がある本手法は、コストおよび安全性の両面から食品用途へ応用することは困難である。

## 2. 研究の目的

上記の問題を解決するために、本研究では加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)のオリゴ糖合成反応に注目した。ホスホリラーゼは、無機リン酸存在下で糖 1-リン酸を生産(正反応)する酵素として広く認知されているが、本反応は可逆反応であり、糖供与体(糖 1-リン酸)と糖受容体を出発材料とした際、オリゴ糖合成反応(逆反応)も効率良く触媒する。そこで今回、生体内糖質代謝を理解する上で生物学的意義から学術的に重要な新規ホスホリラーゼの網羅的探索を行い、得られたホスホリラーゼ群を活用してこれまでに報告例のない新規オリゴ糖を含めた有用オリゴ糖の大量合成系を確立する。

## 3. 研究の方法

(1) 既知のホスホリラーゼとのアミノ酸レベルでの相同性評価により、新たな基質特異性を有すると予想されるホスホリラーゼを探索した。

(2) 機能未知ホスホリラーゼ遺伝子を有する生物種のゲノム DNA から目的遺伝子を PCR 法により単離し、大腸菌による各種組換え酵素の異種宿主発現系を確立した。

(3) 大量調製した組換え酵素を精製し、酵素化学的諸性質(加リン酸分解能、基質特異性等)を解析した。

(4) 糖供与体(糖 1-リン酸)と種々の糖受容体を出発材料として、新規ホスホリラーゼの糖受容体特異性をオリゴ糖合成反応により調査した。得られたオリゴ糖は高速液体クロマトグラフィーを用いて精製し、二次元核磁気共鳴分光法にて構造決定を行った。

(5) 澱粉や蔗糖など安価な天然糖質から加リン酸分解により糖 1-リン酸を生産させた後、糖受容体とのオリゴ糖合成反応により目的オリゴ糖を生産した。

## 4. 研究成果

(1) Glycoside hydrolase family 65、94、130 に属する既知のホスホリラーゼのアミノ酸配列を基に、*Bacillus selenitireducens*、*Bacillus theraotomicon*、*Xanthomonas campestris*、*Neurospora crassa* のゲノム上に、機能性未知のホスホリラーゼホモログをコードする遺伝子の存在を見出した。

(2) 目的遺伝子がコードするホスホリラーゼホモログを、大腸菌を宿主とした異種宿主発現系により調製し、詳細な性質決定を行った。

カリウムイオン要求性アノマー反転型トレハロースホスホリラーゼ(Bsel\_1207) Bsel\_1207 は無機リン酸存在下でトレハロースに対して高い分解活性を示し、その生成物は  $\alpha$ -グルコース 1-リン酸とグルコースであった。またオリゴ糖合成反応により、トレハロースの生成が認められた。さらにカリウムイオン濃度に依存して上記の反応を触媒する効率が向上することを見出し、Bsel\_1207 がこれまでに報告例のないカリウムイオン要求性のアノマー反転型トレハロースホスホリラーゼであることを明らかにした。

分岐グルコ 3 糖生産能を有するマルトースホスホリラーゼ(Bsel\_2056) Bsel\_2056 はグルコースの 2 位にアミノ基を有するグルコサミンや *N*-アセチルグルコサミンなど 8 種の単糖類を糖受容体とし、 $\alpha$ -1,4-グルコ 2 糖を生産するマルトースホス

ホリラーゼであった。興味深いことに、既知のマルトースホスホリラーゼとは異なり、当該酵素はコウジビオースおよびソフォロースといった1,2結合を有するグルコ2糖を糖受容体として認識し、これまで報告例のない新規な分岐グルコ3糖を生産する能力を持ち合わせていることが分かった。

2-*O*- $\beta$ -グルコシルグリセロールホスホリラーゼ (Bsel\_2816)

Bsel\_2816はglycoside hydrolase family 65に属するホスホリラーゼの典型的な基質である $\beta$ -グルコ2糖に対して有意な加リン酸分解活性を示さず、グリセロールを糖受容体とした際2-*O*- $\beta$ -グルコシルグリセロールを特異的に合成することを明らかにした。当該酵素を新規酵素2-*O*- $\beta$ -グルコシルグリセロールホスホリラーゼと命名した。

マンノシル- $\beta$ -1,4-*N*-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ (BT1033)

BT1033はアスパラギン結合型糖鎖のコア構造であるマンノシル- $\beta$ -1,4-*N*-アセチルグルコサミンを可逆的に加リン酸分解することから、当該酵素を新規酵素マンノシル- $\beta$ -1,4-*N*-アセチルグルコサミンホスホリラーゼと命名した。当該酵素遺伝子は $\beta$ -マンノシダーゼ、 $\beta$ -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ、exo-シアリダーゼ、エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼコウジビオースをコードする遺伝子群とゲノム上で遺伝子クラスターを形成していることから、複合型のアスパラギン結合型糖鎖の資化に関与する酵素であることが示唆された。

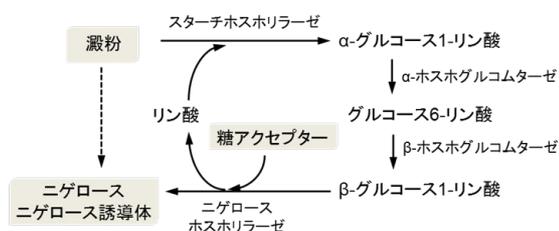
セロピオン酸ホスホリラーゼ (XCC4077、NCU09425)

XCC4077およびNCU09425はセロピオン酸を無機リン酸存在下で加リン酸分解し $\beta$ -グルコース1-リン酸とグルコン酸を遊離することから、当該酵素を新規酵素セロピオン酸ホスホリラーゼと命名した。この発見により、セロピオン酸を経由したセルロース代謝経路が、当該酵素を介して解糖系およびペントースリン酸経路へ移行することを初めて明らかにした。

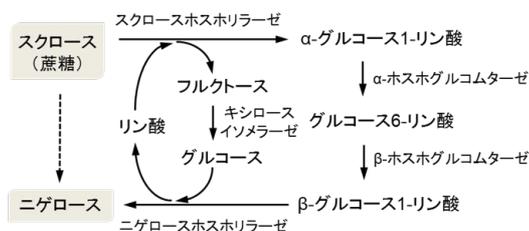
(2) 澱粉や蔗糖といった安価に入手可能な天然糖質からホスホリラーゼが触媒する加リン酸分解反応とオリゴ糖合成反応を組み合わせたOne-pot酵素反応法によって目的オリゴ糖を選択的に製造することを可能とした。その例として、下記に機能性オリゴ糖ニゲロースを目的対象とした製造法を記す。

澱粉を出発材料とするニゲロースの製造法を下図に示す。スターチホスホリラーゼの加リン酸分解反応により澱粉(100 mg/mL)から $\beta$ -グルコース1リン酸を遊離させ、 $\beta$ -ホスホグルコムターゼおよび $\beta$ -ホスホグル

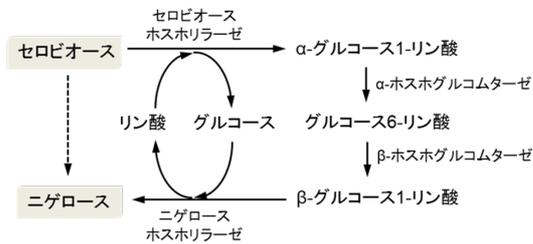
コムターゼの異性化反応により $\beta$ -グルコース1-リン酸に変換した後、添加したグルコース(500 mM)との共にニゲロースホスホリラーゼの基質として利用することでニゲロース(259 mM)を生産した(収率53%)。この澱粉を出発材料とする製造法の利点は、酵素の糖受容体特異性に応じてヘテロオリゴ糖を合成可能な点である。今回用いたニゲロースホスホリラーゼは、グルコース以外の単糖、例えばガラクトースなども糖受容体として認識する。この糖受容体特異性を活用して、上記の製造法で用いたグルコースをガラクトースに置換することにより、ニゲロース誘導体である3-*O*- $\beta$ -グルコシルガラクトース(281 mM)を生産した(収率56%)。



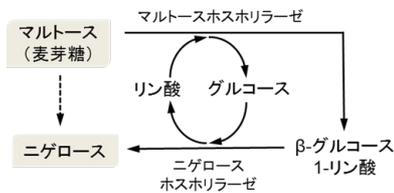
蔗糖(スクロース)を出発材料とするニゲロースの製造法を下図に示す。スクロースホスホリラーゼの加リン酸分解反応によりスクロース(500 mM)を $\beta$ -グルコース1リン酸とフルクトースに分解し、前者を $\beta$ -ホスホグルコムターゼおよび $\beta$ -ホスホグルコムターゼの異性化反応により $\beta$ -グルコース1-リン酸に、後者をキシロースイソメラーゼによりグルコースに変換した後、これらをニゲロースホスホリラーゼの基質として利用することでニゲロース(335 mM)を生産した(収率70%)。



セロピオースを出発材料とするニゲロースの製造法を下図に示す。セロピオースホスホリラーゼの加リン酸分解反応によりセロピオース(250 mM)を $\beta$ -グルコース1リン酸とグルコースに分解し、 $\beta$ -グルコース1リン酸を $\beta$ -ホスホグルコムターゼおよび $\beta$ -ホスホグルコムターゼの異性化反応により $\beta$ -グルコース1-リン酸に変換した後、グルコースと共にニゲロースホスホリラーゼの基質として利用することでニゲロース(129 mM)を生産した(収率52%)。



麦芽糖（マルトース）を出発材料とするニゲロースの製造法を下図に示す。マルトースホスホリラーゼの加リン酸分解反応によりマルトース（500 mM）を  $\alpha$ -D-グルコース 1-リン酸とグルコースに分解し、これらをニゲロースホスホリラーゼの基質として利用することでニゲロース（310 mM）を生産した（収率 64%）。



本研究で開発したホスホリラーゼを利用したオリゴ糖の製造法は、多種多様なオリゴ糖の生産に対応することが可能であり、さらに今後新規酵素が発見されることで製造可能なオリゴ糖の多様性増大が期待できる汎用性の高いオリゴ糖製造法である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

Nihira T., Saito Y., Ohtsubo K., Nakai H., Kitaoka M. 2-O- $\alpha$ -D-glucosylglycerol phosphorylase from *Bacillus selenitireducens* MLS10 possessing hydrolytic activity on  $\alpha$ -D-glucose 1-phosphate. PLoS One (2014) 9, e86548. (査読有)  
DOI: 10.1371/journal.pone.0086548

Nihira T., Saito Y., Nishimoto M., Kitaoka M., Igarashi K., Ohtsubo K., Nakai H. Discovery of cellobionic acid phosphorylase in cellulolytic bacteria and fungi. FEBS Letters (2013) 587, 3556-3561. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.09.014

Nihira T., Saito Y., Chiku K., Kitaoka M., Ohtsubo K., Nakai H. Potassium ion-dependent trehalose phosphorylase from halophilic *Bacillus selenitireducens* MLS10. FEBS Letters (2013) 587, 3382-3386. (査読有)

DOI:10.1016/j.febslet.2013.08.038

Nihira T., Suzuki E., Kitaoka M., Nishimoto M., Ohtsubo K., Nakai H. Discovery of  $\alpha$ -1,4-D-mannosyl-N-acetyl-D-glucosamine phosphorylase involved in the metabolism of N-glycans. The Journal of Biological Chemistry (2013) 288, 27366-27374. (査読有)  
DOI: 10.1074/jbc.M113.469080

Nakai H., Kitaoka M., Svensson B., Ohtsubo K. Recent development of phosphorylases possessing large potential for oligosaccharide synthesis. Current Opinion in Chemical Biology (2013) 17, 301-309. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.01.006

〔学会発表〕(計20件)

Nakai H., Nihira T., Saito Y., Kitaoka M., Ohtsubo K. Identification of *Bacillus selenitireducens* MLS10 maltose phosphorylase possessing synthetic ability for branched  $\alpha$ -D-glucosyl trisaccharides. 10th Carbohydrate Bioengineering meeting (Prague, Czech Republic, 2013.4.21-24)

中井博之、新規ホスホリラーゼを活用した機能性オリゴ糖ライブラリーの構築、平成24年度 第13回酵素応用シンポジウム (名古屋, 2012.6.8)

Nihira T., Nakai H., Chiku K., Kitaoka M. Discovery of nigerose phosphorylase from *Clostridium phytofermentans*. 26th International Carbohydrate Symposium (Madrid, Spain, 2012.7.22-27)

〔産業財産権〕

出願状況 (計7件)

名称: オリゴ糖合成酵素およびアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造の製造方法

発明者: 中井博之、仁平高則、鈴木絵里香、大坪研一、北岡本光

権利者: 国立大学法人新潟大学、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

種類: 特許

番号: 特開 2014-045704 号

出願年月日: 平成24年8月30日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 博之 (NAKAI, Hiroyuki)  
新潟大学・自然科学系・助教  
研究者番号：00400002