

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780099

研究課題名(和文) 抗腫瘍性 - グルカン生合成酵素の同定と応用

研究課題名(英文) Characterization and application of beta-glucan related enzymes

研究代表者

磯野 直人 (ISONO, Naoto)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：70378321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：-1,3-グルカン合成関連酵素の探索を行い、その性質と利用法について調べた。スエヒロタケの-1,3-グルカンシンターゼは推定触媒ドメイン単独でUDPグルコースをドナーとした活性を示した。また、細胞壁消化画分と培養上清にラミナリオリゴ糖を基質とする糖転移酵素があることを見出した。-1,3-グルカンやラミナリオリゴ糖の合成に有用な細菌由来のホスホリラーゼを発見した。-1,3-グルカンの合成系に細菌由来の分岐酵素を加えて反応を行い、水溶性の分岐型-1,3-グルカンを試験管内合成した。

研究成果の概要(英文)：Some enzymes related to synthesis of beta-1,3-glucan were investigated in this study. The catalytic domain protein of beta-1,3-glucan synthase from *Schizophyllum commune* showed significant enzyme activity with UDPglucose. Glucosyltransferases were found in a cell wall autolysate and a culture medium of the fungal mycelia. In addition, novel bacterial beta-1,3-glucan phosphorylase and laminaridextrin phosphorylase were discovered and used for synthesis of beta-1,3-glucan and laminarioligosaccharides. Finally, water-soluble branched polysaccharide was synthesized in vitro using beta-1,3-glucan phosphorylase and bacterial glucosyltransferase.

研究分野：糖質科学・酵素化学・食品化学

キーワード：-1,3-グルカン ラミナリオリゴ糖 糖転移酵素 スエヒロタケ ホスホリラーゼ

1. 研究開始当初の背景

多糖には整腸、血糖上昇抑制、コレステロール改善、免疫賦活など様々な機能があることが知られている。多糖の機能の種類や作用の強さは構造や分子量に依存すると思われる。また、医薬品やサプリメントの成分として多糖を利用する場合、その純度が重要となることがある。しかし、天然物から調製した多糖は機能発揮に最適な構造であるとは限らず、高純度精製が難しい場合もある。多糖の酵素合成技術の開発はこれらの問題の改善と多糖利用の発展に役立つと思われる。

β -1,3-グルカンには菌類、藻類、細菌などが生産する多糖である。 β -1,3-グルカンには直鎖型と、 β -1,6-グルコシド結合を有する分岐型の二種類が存在する。

Schizophyllum commune (スエヒロタケ) は担子菌のモデル生物であり、2010年に全ゲノム配列が解読された。シゾフィランは *S. commune* が生産する分岐型 β -1,3-グルカンであり、抗腫瘍医薬品としての認可を受けている。しかし、注射投与のために、 β -1,3-グルカンを高純度精製する必要があり、価格は極めて高い。シゾフィランは水溶性の菌体外多糖であり、主鎖を構成するグルコース残基の1/3にそれぞれ単一のグルコース残基が β -1,6-結合している。この分岐構造がシゾフィランの機能性や水溶性に対して重要な役割を果たしていると考えられている。

シゾフィランや他の菌類の β -1,3-グルカンの主鎖合成は膜タンパク質である β -1,3-グルカンシンターゼ (BGS) が担っていると考えられている。BGSには1つの触媒ドメインと多数の膜貫通領域が存在する。BGSは膜タンパク質であり取り扱いが難しく、その特性については不明な点が多い。また、触媒ドメインの組換えタンパク質が作製された研究はほとんどなく、BGSの立体構造や反応メカニズムはまだ明らかにされていない。

シゾフィランの分岐形成のメカニズムは明らかにされていない。他の菌類では β -1,3-グルカンの分岐形成に糖転移酵素が関与していることが報告されている。このうち、*Aspergillus fumigatus* ではラミナリオリゴ糖に作用して分岐を形成する糖転移酵素が細胞壁から発見されている。本酵素はGH17タンパク質であり、類似酵素は*Azotobacter vinelandii* から発見されている。

β -1,3-グルカンホスホリラーゼ (BGP) は β -1,3-グルカンを伸長する反応を触媒する酵素である。研究代表者はこれまでに*Ochromonas danica* 由来のBGPを用いて、安価な低分子の基質から直鎖 β -1,3-グルカンを試験管内合成する方法を開発した。また、BGPの一次構造をはじめ明らかにした。BGPによる β -1,3-グルカン伸長反応系に糖転移酵素を加える事により、分岐型 β -1,3-グルカンの試験管内合成が可能であると思われる。ただし、*O. danica* BGPの至適pHは酸性

域 (pH 5.5)、至適温度は中低温 (30°C) であるため、本酵素を用いた β -1,3-グルカン伸長反応条件と糖転移酵素による分岐反応の条件が異なり、分岐型 β -1,3-グルカンの効率的な試験管内合成が実現できない可能性がある。

ラミナリオリゴ糖は β -グルカン関連酵素の基質である。これらの酵素の特性を調べるためには、大量のラミナリオリゴ糖を使用する必要があるが、市販品は非常に高価である。ラミナリデキストリンホスホリラーゼ (LDP) はラミナリオリゴ糖の合成に有用な酵素である。*Euglena gracilis* 由来の酵素のみが知られているが、一次構造は解明されていない。低コストで大量生産可能な組換えLDPを利用したラミナリオリゴ糖の試験管内合成法の開発が期待される。

2. 研究の目的

シゾフィラン合成に関与する酵素の探索と特性解析ならびに分岐型 β -1,3-グルカンの試験管内合成を本研究の目的とした。

(1) *S. commune* β -1,3-グルカン合成関連酵素の探索

① BGS触媒ドメインの発現と機能解析

シゾフィランの主鎖合成に関与する *S. commune* BGS の触媒ドメインの組換えタンパク質を作成する。BGS触媒ドメインが単独で酵素活性を示すか明らかにし、その性質を調べる。

② β -グルカン分岐酵素類似タンパク質の機能解析

β -グルカン分岐反応を触媒することが報告されている他生物の酵素と相同性を示す *S. commune* タンパク質の機能を探索する。

③ β -グルカン分岐酵素の探索

S. commune の菌糸体において、 β -グルカン分岐に関与すると思われる酵素が存在する画分を探索する。また、酵素を精製し、その特性と構造を調べる。

(2) β -グルカンとラミナリオリゴ糖の試験管内合成

① 分岐 β -グルカンの試験管内合成

BGPによる β -1,3-グルカンの伸長反応系に *S. commune* あるいは細菌の糖転移酵素を加えて反応を行い、分岐 β -グルカンの試験管内合成を試みる。得られた産物の構造と分子量分布を調べる。

② β -1,3-グルカン伸長反応法の改善

O. danica BGPと異なる特性を示す新規BGPを探索し、その酵素を用いた β -1,3-グルカン伸長条件を検討する。

③ ラミナリオリゴ糖の簡易合成法の開発

細菌由来の新規LDPを探索し、その構造と特性を調べる。組換え酵素を用いて安価な基質からラミナリオリゴ糖を合成し、活性炭クロマトグラフィーで精製する方法を検討する。

3. 研究の方法

(1) *S. commune* の培養と分画物の調製

S. commune H4-8 株の菌糸体を 2% グルコースを含む最少培地 (MM 培地) で振とう培養 (30°C, 160 rpm) した。遠心分離によって菌糸体と培養上清をそれぞれ回収した。Bead-Beater (BioSpec Product) を用いてガラスビーズで培養 5 日目の菌糸体を破碎した。破碎液を遠心分離して、膜画分、細胞内画分、細胞壁画分をそれぞれ調製した。また、細胞壁画分を自己消化し、遠心分離して得られた上清を細胞壁消化画分とした。

アニリンブルー染色法とフェノール硫酸法により培養上清の多糖 (シゾフィラン) の定性と定量を行った。

(2) *S. commune* 糖転移酵素の精製と構造解析

菌糸体の細胞壁消化画分を Q Sepharose, HiTrap Phenyl, HiTrap Q (GE Healthcare) に供し、糖転移酵素の精製を行った。SDS-PAGE で糖転移酵素と思われるバンドを回収し、トリプシンで消化した。生じたペプチドを MALDI-TOF 質量分析に供し、得られた質量スペクトル情報を用いて *S. commune* のデータベースを検索した。

(3) 大腸菌発現用プラスミドの作製

① *S. commune* BGS

Bio Masher II (和光純薬工業) と Sepasol-RNA Super G (ナカライテスク) を用いて培養 3 日目の菌糸体から抽出した全 RNA を鋳型として、PrimeScript RT-PCR Kit (タカラバイオ) で cDNA を調製した。これを鋳型とした PCR により、2 種類の BGS (BGS1 と BGS2) の触媒ドメインをコードする DNA をそれぞれ増幅した。コールドショック発現ベクター pCold ProS2 (タカラバイオ) のマルチクロニングサイト (MCS) に各 DNA を挿入し、発現用プラスミドを作製した。

② *S. commune* GH17 タンパク質

S. commune cDNA を鋳型とした PCR により、GH17 タンパク質の推定触媒ドメインをコードする DNA を増幅した。pCold ProS2 の MCS に DNA を挿入し、発現用プラスミドを作製した。

③ *A. vinelandii* GH17 タンパク質

A. vinelandii CA 株のゲノムを鋳型とした PCR により、GH17 タンパク質の推定触媒ドメインをコードする DNA を増幅し、pET-42b (Merck) の MCS に挿入して、発現用プラスミドを作製した。

④ *Paenibacillus polymyxa* BGP

P. polymyxa NBRC 15309 株のゲノムを鋳型とした PCR により、*O. danica* BGP の相同タンパク質をコードする DNA を増幅し、pET-23a (Merck) の MCS に挿入して、発現用プラスミドを作製した。

⑤ *Psychromonas ingrahamii* LDP

P. polymyxa 37 株のゲノムを鋳型とした PCR により、*O. danica* BGP の相同タンパク質をコードする DNA を増幅し、コールドショック発現ベクター pCold II (タカラバイオ) の MCS に挿入して、発現用プラスミドを作製した。

(4) 大腸菌組換え酵素の生産と精製

発現用プラスミドで形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) 株を培養し、対数増殖期に IPTG を添加し、発現誘導を行った。コールドショック発現系では IPTG 添加後の培養を 15°C で行った。超音波破碎して得られた大腸菌抽出液を HisTrap (GE Healthcare) に供して、His タグ融合タンパク質を精製した。

(5) 酵素活性の検出

① BGS 活性

UDP-[U-¹⁴C] グルコース (室町薬品) を基質とした反応を行った。Dowex 1x8 (和光純薬工業) を用いて未反応の UDP グルコースを除去した反応液の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測した。

② 糖転移活性

ラミナリヘキサオースと糖転移酵素を混合して反応を行った後、TLC で解析した。

③ BGP (または LDP) の活性

α -グルコース 1-リン酸 (G1P) とラミナリビオース (またはグルコース) を基質とした反応を行い、生じた無機リン酸を定量した。また、ラミナリトリオース (またはラミナリビオース) と無機リン酸を基質とした反応を行い、生じた G1P を定量した。

(6) ラミナリオリゴ糖の調製

グルコース (50 mM), スクロース (100 mM), 無機リン酸 (20 mM), *P. ingrahamii* LDP, スクロースホスホリラーゼ (オリエンタル酵母工業) の混合液を 20°C で 2 日間保持し、ラミナリオリゴ糖を合成した。これを活性炭カラムに供して、ラミナリトリオース, ラミナリテトラオース, ラミナリペンタオース, ラミナリヘキサオースを精製した。また、ザイモリエイス (ナカライテスク) によるカードランの加水分解液を活性炭カラムに供して、ラミナリビオースとラミナリトリオースを精製した。

(7) 分岐多糖・オリゴ糖の合成と分析

ラミナリヘキサオースと糖転移酵素を混合して 30°C で保持した。また、ラミナリビオース, G1P, BGP, 糖転移酵素を混合して 30°C で保持した。 β -1,3-グルコシド結合を特異的に分解するエキソ型酵素に対する反応産物の感受性を観察した。メチル化分析により糖結合様式を調べた。また、反応産物の分子量分布をゲル濾過 HPLC で分析した。

4. 研究成果

(1) *S. commune* の培養

グルコースを含む最少培地で *S. commune* 菌糸体を培養したところ、培養3-4日目から培養上清にシゾフィランが蓄積し始めることが観察された。培地の粘度と菌糸体量を考慮して、酵素精製用の菌糸体の回収は培養5日目に、RNA抽出用の菌糸体と酵素精製用の培養上清の回収は培養3日目に行った。

(2) *S. commune* BGS 触媒ドメインの発現と解析

データベースを解析したところ、*S. commune* のゲノムには2種類のBGS (BGS1: Protein ID 77200 と BGS2: Protein ID 81175) がコードされていることが予測された。大腸菌を用いて *S. commune* BGS の推定触媒ドメイン単独を発現させると封入体となったため、封入体のリフォールディング、シャペロンとの共発現、可溶化タグ ProS2 との融合タンパク質としての発現、酵母 *Pichia pastoris* を用いた発現などを試みた。このうち、可溶化タグを利用した大腸菌発現法では微量ではあるものの可溶性の目的タンパク質を得ることができた。BGS1 と BGS2 の組換えタンパク質はいずれも UDP グルコースをドナー基質とした糖転移活性を示した。このことから、膜タンパク質である BGS は触媒ドメイン単独でも酵素活性を示すことが明らかとなった。このうち、BGS1 の特性を調べた。BGS1 は β -1,3-グルカン (BGP を用いて合成した直鎖グルカン) だけでなく、ラミナリオリゴ糖やグルコースを含む反応液を用いた場合も活性を示した。本酵素は 30°C, pH 7.0-7.5 の条件で強い活性を示した。また、2 価陽イオンの添加によって酵素活性が増加した。BGS 触媒ドメイン単独でも酵素活性を示すことから、将来的には触媒ドメインタンパク質の立体構造解析等による本酵素の構造機能相関研究が可能であると考えられた。BGS の触媒ドメインの構造は異なる菌種間でも類似しているため、このような研究は BGS の阻害剤デザインに役立ち、真菌症治療に有用な抗菌剤の開発につながる可能性がある。一方で、本研究では微量の BGS 触媒ドメインタンパク質しか得られなかったため、発現方法の改善が必要であると考えられた。

(3) *S. commune* GH17 タンパク質の発現と解析

データベースを解析したところ、*S. commune* のゲノムには2種類のGH17タンパク質 (Protein ID 2642958 および Protein ID 63515) がコードされていることが予測された。これらはいずれも膜タンパク質であると予測された。RT-PCR では前者のタンパク質をコードする cDNA のみを得ることができた。Protein ID 2642958 の推定触媒ドメインの発現と精製を行った。本タンパク質を β -1,3-グルカン (BGP を用いて合成した重合度約 30

の直鎖グルカン) に作用させたところ、微量のラミナリペンタオースが生じた。このことから、本タンパク質はエキソ型 β -1,3-グルカナーゼの活性を有することが示唆された。一方、*A. vinelandii* GH17 タンパク質の推定触媒ドメインの解析で観察された、ラミナリオリゴ糖や β -1,3-グルカンを基質とする糖転移活性は検出されなかった。

(4) *S. commune* 糖転移酵素の探索

S. commune (培養5日目) の細胞膜画分と細胞壁消化画分にはラミナリオリゴ糖を基質とする糖転移活性が観察された。また、培養3-5日目の培養上清にも糖転移活性が認められた。このうち、培養上清と細胞壁消化画分からそれぞれ3種類のクロマトグラフィーによって、微量の糖転移酵素を精製した。精製過程における酵素活性の検出結果から、培養上清には少なくとも1種類の糖転移酵素 (酵素A)、細胞壁消化画分には2種類 (酵素B および C) の糖転移酵素が含まれていることが示唆された。酵素Aと酵素Bをラミナリヘキサオースに作用させた後、TLCで分析すると、比較的高分子の産物が観察された (TLCプレートの原点付近に糖のスポットが検出)。また、酵素Cをラミナリヘキサオースに作用させると五糖と七糖のオリゴ糖が生成した。酵素Bは30-40°C, pH 5-7の条件で強い活性を示した。また、酵素Cは40°C, pH 4-6の条件で強い活性を示した。また、酵素Bと酵素Cの反応産物は β -1,3-グルコシド以外の結合が含まれており、これらの酵素は分岐酵素である可能性が考えられた。得られた酵素量が限られていたため、BGPによる β -1,3-グルカンの合成系と組み合わせた分岐 β -グルカンの合成実験は成功に至らなかった。*A. vinelandii* GH17 タンパク質 (後述) と同様に、組換え酵素等を用いれば、分岐 β -グルカンを試験管内合成できる可能性がある。そこで、*S. commune* 糖転移酵素の構造を調べた。酵素A精製画分のSDS-PAGEでは糖転移酵素のバンドを特定することができなかった。酵素Bと酵素Cについては、精製画分に含まれるタンパク質をSDS-PAGEで分離した後、糖転移酵素と思われるバンドを回収した。これらのトリプシン消化物を質量分析した結果、酵素Bは膜結合型のGH16タンパク質あるいは機能未知タンパク質、酵素Cは機能未知タンパク質である可能性が考えられた。

(5) *A. vinelandii* GH17 タンパク質と BGP を用いた分岐 β -グルカンの合成

ラミナリヘキサオースに *A. vinelandii* GH17 タンパク質 (GST との融合タンパク質) を作用させたところ、基質よりも重合度の大きい糖が合成され、本タンパク質には糖転移活性があることが認められた。BGPによる β -1,3-グルカンの合成系 (基質: ラミナリピオース+G1P) に *A. vinelandii* GH17 タンパク質を加えて反応を行ったところ、水溶性

多糖（分子量約1万）が生成した。メチル化分析した結果、この酵素合成多糖は β -1,6-結合を有する分岐 β -1,3-グルカンであることが明らかとなった。このように、分岐 β -グルカンの試験管内合成に成功した。今後、この可溶性酵素合成多糖の機能性についても調べたいと考えている。

(6) 細菌 BGP の発見と β -1,3-グルカンの合成

P. polymyxa NBRC 15309 株のゲノムに BGP (1079 残基, 124 kDa) がコードされていることを見出した。また、本成果を基にした関連研究では超好熱菌由来の BGP も見出している。ラミナリビオースと G1P を基質として *P. polymyxa* BGP の反応を行うと、 β -1,3-グルカンが合成された。*P. polymyxa* BGP の至適 pH は 7.5, 至適温度は 50°C であり, *O. danica* BGP (至適 pH 5.5, 至適温度 30°C) と異なる条件での β -グルカン合成に有用であると考えられた。

(7) 細菌 LDP の発見とラミナリオリゴ糖の合成

P. ingrahamii 37 株のゲノムに LDP (1179 残基, 132 kDa) がコードされていることを見出した。*P. ingrahamii* LDP の至適 pH は 7.5, 至適温度は 25°C であった。グルコースと G1P に本酵素を作用させると種々のラミナリオリゴ糖が合成されることが明らかとなった。そこで、グルコース、スクロース、無機リン酸を基質として LDP とスクロースホスホリラーゼの反応を同時に行い、得られた反応産物からラミナリトリオース、ラミナリテトラオース、ラミナリペンタオース、ラミナリヘキサオースを精製した。これらのオリゴ糖を BGS や糖転移酵素の基質として利用した。ラミナリオリゴ糖には単球の TNF- α 分泌促進作用やプレバイオティクス効果が報告されているため、本酵素は機能性糖質の実用的合成に役立つ可能性がある。

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 6 件)

① 磯野直人 (2015) ホスホリラーゼによる多糖の合成. 化学と生物 53 : 印刷中. [査読有]

② 磯野直人, 山本豊, 西尾昌洋, 梅川逸人, 久松眞 (2015) *Ochromonas danica* 由来 1,3- β -グルカンホスホリラーゼの特性と応用. 応用糖質科学 5 : 印刷中. [査読有]

③ 磯野直人 (2014) ホスホリラーゼを用いた β -1,3-グルカンの合成. 応用糖質科学 4:249-251. [査読無]

④ Yamamoto Y, Kawashima D, Hashizume A, Hisamatsu M, Isono N (2013) Purification and characterization of 1,3- β -D-glucan phosphorylase from *Ochromonas danica*. Biosci Biotechnol Biochem 77:1949-1954. [査読有]

<http://doi.org/10.1271/bbb.130411>

[学会発表] (計 7 件)

① 磯野直人, 山本豊, 西尾昌洋, 梅川逸人, 久松眞 : *Ochromonas danica* 由来 β -1,3-グルカンホスホリラーゼの機能解析と応用, 日本応用糖質科学会 2014 年度大会, 2014 年 9 月 26 日, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)

② 伊藤翔子, 森晴彦, 川島大地, 磯野直人 : 耐熱性ホスホリラーゼを用いた β -1,3-グルカンの合成, 第 62 回日本応用糖質科学会中部支部講演会, 2014 年 3 月 7 日, 愛知県産業労働センター (愛知県名古屋市)

③ 川島大地, 久松眞, 磯野直人 : *Paenibacillus polymyxa* 由来 β -1,3-グルカンホスホリラーゼの構造と機能の解析, 日本応用糖質科学会 2013 年度大会, 2013 年 9 月 25 日, 鹿児島大学農学部 (鹿児島県鹿児島市)

④ 川島大地, 木本智美, 平野鈴, 柳原和典, 山本健, 久松眞, 磯野直人 : グルコースとスクロースを基質とした β -1,3-グルカンの酵素合成, 第 61 回日本応用糖質科学会中部支部講演会, 2013 年 3 月 1 日, 愛知県産業労働センター (愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯野直人 (ISONO, Naoto)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号 : 70378321