

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892011

研究課題名(和文)複合糖鎖及びリポ多糖のホスホリラーゼ依存型新規代謝機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the Novel Phosphorylase-Dependent Metabolisms of Glycosonjugates and Lipopolysaccharides

研究代表者

知久 和寛 (CHIKU, KAZUHIRO)

新潟大学・自然科学系・研究員

研究者番号：30711618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Bacteroides thetaiotaomicronおよびThermoanaerobacter sp. X-514から、糖加水分解酵素ファミリー130に分類される3種の新規な β -マンノシドホスホリラーゼ、すなわち β -1,4-マンノシル-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ、 β -1,2-オリゴマンナンホスホリラーゼ、 β -1,2-マンノピオースホスホリラーゼを見出した。また、これら β -マンノシドホスホリラーゼが、複合糖鎖及びリポ多糖のコア構造として含まれる β -1,4-マンノシル-N-アセチルグルコサミンまたは β -1,2-オリゴマンナンの代謝において、鍵酵素として関与することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Three novel β -mannoside phosphorylases (β -1,4-mannosyl-N-acetylglucosamine phosphorylase, β -1,2-mannobiose phosphorylase and β -1,2-oligomannan phosphorylase) were characterized as new member of glycoside hydrolase family 130 from Bacteroides thetaiotaomicron and Thermoanaerobacter sp. X-514. We further suggested that these β -mannoside phosphorylases play crucial roles in metabolisms of N-glycans or β -1,2-oligomannan.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物酵素 糖質 ホスホリラーゼ

1. 研究開始当初の背景

ホスホリラーゼは、リン酸存在下で糖質のグリコシド結合を非還元末端側から順次加リン酸分解し、糖 1 リン酸を遊離する酵素の総称である。アミノ酸配列の相同性から、糖質加水分解酵素ファミリー(GH) 3 ,13 ,65 ,94 ,112 ,130 および糖転移酵素ファミリー(GT) 4 ,35 に分類されている。このうち GH130 は、2011 年に植物細胞壁中の β-1,4-マンナン代謝における代謝中間体 β-1,4-マンノシルグルコースを加リン酸分解する酵素が発見されたことにより新たに分類されたファミリーであり、β-マンノシドを加リン酸分解し α-マンノース 1-リン酸 (α-Man1P) を生成するアノマー反転型ホスホリラーゼが属する。その後研究開始時までに、GH130 に属する酵素として、*Bacteroides fragilis* 由来 β-1,4-マンノシルグルコース(EC 2.4.1.281),*Ruminococcus albus* 由来 β-1,4-マンノシルグルコース(EC 2.4.1.281)と β-1,4-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼ(EC 2.4.1.319)の 3 つのホスホリラーゼが報告された。

GH130 に属するホスホリラーゼの基質である β-マンノシドは、植物細胞壁中のみならず、動植物が産生する糖タンパク質中の N 結合型糖鎖、微生物が産生するリポ多糖などの細胞外多糖類や細胞内貯蓄性多糖類中など多種多様な生物種の糖鎖内でコア構造として存在している。興味深いことに、自然界にはこれら複合糖鎖やリポ多糖を資化することを目的とした特異的な糖代謝機構を有する微生物が存在する。その代謝時の鍵タンパク質として、申請者は複合糖鎖やリポ多糖のコア糖鎖の細胞内分解に寄与する新規 β-マンノシドホスホリラーゼを複数発見している。その一例として、N 型糖鎖代謝に関係する β-1,4-マンノシル-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ(特願 2012-190474)及びリポ多糖代謝に関係する β-1,2-マンノピオースホスホリラーゼ(特願 2012-203891)が挙げられる。これら新規酵素群は世界的に注目を集めているが、その基質特異性や反応メカニズムなどについて十分な学術的知見が得られていない。

さらに申請者は、上記新規ホスホリラーゼ群の遺伝子周辺に当該酵素の基質となる β-マンノシドの細胞内取り込みに関わる新規な糖結合タンパク質がコードされていることを発見した。これまで β-マンノシドに認識性を示す糖結合タンパク質の報告はない。

上述した新規タンパク質群が関与する複合糖鎖とリポ多糖の推定代謝メカニズム(ホスホリラーゼ依存型糖代謝機構)を図 1 に示す。複合糖鎖やリポ多糖は、細胞外分泌型の糖質加水分解酵素群により β-マンノシドまで低重合度化される。生成した β-マンノシドは、細胞膜表層に存在する糖結合タンパク質により

認識されることで選択的に ABC 輸送体を介して細胞内に取り込まれる。その後、細胞内に局在するホスホリラーゼにより加リン酸分解され、マンノース 1-リン酸を経て解糖系に入る。当該ホスホリラーゼ依存型糖代謝機構は、既知の糖質加水分解酵素による単糖化と ATP 消費を伴うキナーゼによるリン酸化経路に比べ、ATP 消費が削減されるため効率的な代謝系と言える。

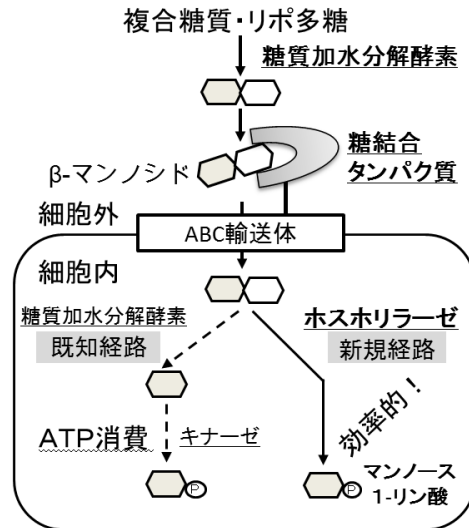


図1. 複合糖鎖・リポ多糖代謝機構

その効率的なエネルギー消費を特徴とするホスホリラーゼ依存型代謝機構は、限られた栄養源や生息圏を確保するための微生物独自の生存戦略として機能しているが、前述の通り当該代謝について十分な学術的知見の蓄積があるとは言い難い。

2. 研究の目的

本研究は、様々な生物の細胞表層に展開する複合糖鎖及びリポ多糖を対象としたホスホリラーゼ依存型新規代謝機構の全貌解明に向けた基盤研究である。

幅広い生物種のゲノム情報を活用し見出した複合糖鎖およびリポ多糖のコア構造である各種 β-マンノシドを細胞内にて加リン酸分解する酵素 β-マンノシドホスホリラーゼ群と細胞内輸送に関わる ABC 輸送体内新規 β-マンノシド結合タンパク質群の 2 つのタンパク質群の機能解析を行う。加えて、バイオインフォマティクス手法により代謝関連タンパク質群の同定を行い、対象複合糖鎖・リポ多糖の全体構造を推定する。

3. 研究の方法

(1) 新規 β-マンノシドホスホリラーゼの酵素機能の評価

幅広い生物種のゲノム情報を活用し見出した β-1,4-マンノシル-N-アセチルグルコサミン

ホスホリラーゼや β -1,2-マンノピオースホスホリラーゼなど複数の新規ホスホリラーゼを大腸菌組換え体として生産させた。その後、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーに供することで電気泳動的に単一な精製酵素標品を得た。得られた精製酵素を用い各種 β -マンノシドの加リン酸分解活性の測定を、 α -Man1P の新規酵素測定法 (Nihira ら, J. Appl. Glycosci., 2013) により行い、各種基質との親和性を動力学的パラメーターで算出した。さらに、上記研究で明らかになったホスホリラーゼ群の反応位置選択性及び反応可逆性を利用し、澱粉・ショ糖・麦芽糖などを出発材料とした各種 β -1,4-マンノシル-*N*-アセチルグルコサミンと β -1,2-オリゴマンナンを生産システム (図2は澱粉を出発原料とした場合。ショ糖を用いた場合はスクロースホスホリラーゼ、麦芽糖を用いた際はマルトースホスホリラーゼを用いた。) の構築を行った。得られた β -マンノシドを用いて、以下に示す

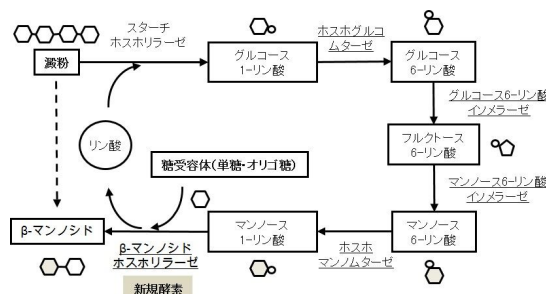


図2. β -マンノシドホスホリラーゼを用いた澱粉からの β -マンノシドの生産システム

糖結合タンパク質の機能解析に用いた。

(2) 複合糖鎖及びリポ多糖構造の解明及び代謝関連タンパク質の同定

バイオインフォマティクス手法を用い、 β -マンノシドホスホリラーゼ周辺遺伝子にコードされている複合糖鎖やリポ多糖代謝機構に関与するタンパク質群の同定を行なった。

(3) 新規糖結合タンパク質の β -マンノシド結合機能の評価

β -マンノシドホスホリラーゼ遺伝子近傍に存在する糖結合タンパク質を大腸菌組換え体として生産させた。その後、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーに供することで電気泳動的に単一な精製酵素標品を得た。精製した糖結合タンパク質を金チップ上に固定化し、表面プラズモン共鳴装置法を用いることで各種糖類 (グルコース, ガラクトース, トレハロース, コーヅピオース, ニゲロース, マルトース, イソマルトース, ソホロース, ラミナリピオース, セロピオース, スクロース, ラクトース, β -1,4-マンノピオース, β -1,4-マンノシルグルコース, β -1,4-マンノシル-*N*-

アセチルグルコサミン, β -1,2-マンノピオース) に対する結合能を調べた。

3. 研究成果

(1) *B. thetaiotaomicron* 由来 β -1,4-マンノシル-*N*-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ (BT_1033)

BT_1033 の機能解析

大腸菌組換え体として生産した BT_1033 の分子質量は、SDS-PAGE から約 35 kDa, ゲル濾過クロマトグラフィーから 147 kDa とそれぞれ推定されたことから、BT_1033 は溶液中で 4 量体を形成していると判断された。 α -Man1P を糖供与体として糖受容体特異性を確認したところ、BT_1033 は *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) および *N,N*-ジアセチルキトピオース (GlcNAc₂) を糖受容体とした際に高いオリゴ糖合成活性を示した。GlcNAc および GlcNAc₂ を糖受容体とした際の反応生成物を核磁気共鳴装置を用い構造解析した結果、前者は β -1,4-マンノシル-*N*-アセチルグルコサミン (ManGlcNAc), 後者は β -1,4-マンノシル- β -1,4-*N*-アセチルグルコサミニル-*N*-アセチルグルコサミン (ManGlcNAc₂) とそれぞれ同定された。糖供与体として α -Man1P, 糖受容体として GlcNAc または GlcNAc₂ を用いて逆反応における反応速度論的解析を行なった結果、 k_{cat} は同程度の値を示したのに対し、 K_m は GlcNAc の方が約 12 倍低い値を示した。すなわち GlcNAc を糖受容体とした際により高い k_{cat}/K_m 値を示すことから、BT_1033 の最も触媒効率の良い糖受容体は GlcNAc であると判断された。BT_1033 は、リン酸存在下において ManGlcNAc および ManGlcNAc₂ を加リン酸分解し、前者では α -Man1P と GlcNAc, 後者では α -Man1P と GlcNAc₂ をそれぞれ遊離した。その反応機構は、反転型ホスホリラーゼでよく見られる逐次 Bi Bi 型を示し、ManGlcNAc に対する k_{cat}/K_m 値は ManGlcNAc₂ のそれと比べ約 58 倍高かった。これらの結果と分解活性がリン酸非存在下において確認されない事実を鑑みて、我々は BT_1033 を新規酵素 β -1,4-マンノシル-*N*-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ (EC 2.4.1.320) と命名した。

バイオインフォマティクス解析から予測される複合型 *N*-グリカンの代謝経路

当該酵素遺伝子近傍に存在する遺伝子について、バイオインフォマティクス解析による遺伝子機能予測を行なった結果、BT_1033 を含む BT_1032 から BT_1040 の 9 種の遺伝子がクラスターを形成し、これら遺伝子がコードするタンパク質の配列は複合型 *N*-グリ

カンの代謝に関連すると考えられる酵素およびタンパク質群と相同性が認められた。この事実から予測される複合型 *N*-グリカンの代謝経路では、まず菌体外 GH18 エンド- β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (BT_1038) によって菌体外環境中に存在する糖タンパク質糖鎖を切り出し、外膜トランスポーター (SusC, BT_1040 および SusD, BT_1039) によってペリプラズム領域に輸送する。 α -シアリダーゼ (BT_1036), GH20 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (BT_1035), GH92 α -マンノシダーゼ (BT_1032) などにより順次加水分解された結果生じる ManGlcNAc が MFS 型 (major facilitator superfamily) トランスポーター (BT_1034) により細胞質内へと輸送され、 β -1,4-マンノシル-*N*-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ (BT_1033) による加リン酸分解を受ける。遊離した α -Man1P は、ホスホマンノムターゼ (BT_1548 および BT_3950) およびマンノース 6-リン酸イソメラーゼ (BT_0373) により、マンノース 6-リン酸を経てフルクトース 6-リン酸へ変換され解糖系へ移行すると考えられる。この代謝経路の特徴は、従来報告されている複合型 *N*-グリカンの代謝において β -マンノシダーゼが担う ManGlcNAc の分解反応をホスホリラーゼが担っている点である。ATP の関与無しに糖をリン酸化するホスホリラーゼを鍵酵素とする代謝系を利用することで ATP の消費を抑制でき、ATP 生産能力が低い腸内嫌気性菌にとって効率的な代謝経路と考えられる。この遺伝子クラスターは、*Bacteroides* 属およびその類縁菌において保存されており、これらの菌が生存競争に勝ち抜くため進化の途上でこの ATP 消費抑制型代謝経路を獲得したものと推察される。

スクロースを出発材料とする ManGlcNAc の合成

250 mM スクロース, 250 mM GlcNAc, 25 mM リン酸, 10 mM 塩化マグネシウム, 41 μ M α -グルコース 1,6-ビスリン酸, 33 μ g/mL スクロースホスホリラーゼ, 0.34 mg/mL α -ホスホグルコムターゼ, 0.37 mg/mL グルコース 6-リン酸イソメラーゼ, 0.23 mg/mL マンノース 6-リン酸イソメラーゼ, 2.4 mg/mL ホスホマンノムターゼおよび 83 μ g/mL β -1,4-マンノシル-*N*-アセチルグルコサミンホスホリラーゼを 30 で作用させた結果、反応開始 276 時間ほどで反応は平衡に達し 58 mM の ManGlcNAc を生産することができ、反応液 1 mL あたり 20 mg の ManGlcNAc を得た (収率 23%)。また反応系におけるスクロース濃度, GlcNAc 濃度, リン酸濃度を最適化した結果、従来の製法の約 1.8 倍高い収率で ManGlcNAc を合成でき

た。

(2) *Thermoanaerobacter* sp. X-514 由来 β -1,2-マンノシドホスホリラーゼ

Teth514_1788 および Teth514_1789 の機能解析

大腸菌組換え体として生産した Teth514_1788 および Teth514_1789 の分子質量は、SDS-PAGE の結果いずれも約 34 kDa と推定されたが、ゲル濾過クロマトグラフィーからは前者が 50 kDa、後者が 27 kDa とそれぞれ推定された。このことから、溶液中で Teth514_1788 は二量体、Teth514_1789 は単量体として存在していると判断された。また、 α -Man1P を糖受容体として糖受容体特異性を確認したところ、Teth514_1788 および Teth514_1789 は共にマンノースを糖受容体とした際にオリゴ糖合成活性を示した。Teth514_1788 および Teth514_1789 を 50 mM α -Man1P および 50 mM マンノースに作用させた際の反応生成物について HPLC 分析、エレクトロスプレーイオン化質量分析および核磁気共鳴分光法を用いた構造解析を行なった。その結果、Teth514_1788 は重合度 2~5 の β -1,2-オリゴマンナンを生成するのに対し、Teth514_1789 は β -1,2-マンノピオースと β -1,2-マンノトリオースのみ生成し、4 糖以上の β -1,2-オリゴマンナンは確認されなかった。次に、マンノース、 β -1,2-マンノピオースおよび β -1,2-マンノトリオースを糖受容体とした際の Teth514_1788 および Teth514_1789 が示す鎖長特異性を反応速度論的に解析した。Teth514_1788 は、 β -1,2-マンノピオースおよび β -1,2-マンノトリオースを糖受容体とした際の k_{cat}/K_m 値がマンノースのそれに比べ約 8 倍高かった。一方 Teth514_1789 は、マンノースを糖受容体とした際に最も高い k_{cat}/K_m 値を示し、 β -1,2-マンノピオースのそれと比べ約 6 倍高かった。また、Teth514_1789 は β -1,2-マンノトリオースに対して合成活性を示さなかった。これらの結果は、Teth514_1788 および Teth514_1789 が基質の鎖長特異性を異にする、すなわち前者は β -1,2-オリゴマンナンを、後者は単糖マンノースをそれぞれ糖受容体として好む β -1,2-マンノシドホスホリラーゼであると推察された。

さらに、両酵素における各種 β -1,2-オリゴマンナンに対する加リン酸分解反応についても、逆反応の解析結果に符合する鎖長特異性の相違が確認された。すなわち、Teth514_1788 が二糖よりも重合度の高い β -1,2-オリゴマンナンに高い活性を示すのに対し、Teth514_1789 は二糖に対して高い活性を示し、四糖以上の基質には作用しなかった。これらの結果から、鎖長特異性を異にす

る Teth514_1788 および Teth514_1789 について、前者を β -1,2-オリゴマンナンホスホリラーゼ、後者を β -1,2-マンノピオースホスホリラーゼと命名した。

バイオインフォマティクス解析から予測される β -1,2-オリゴマンナンの代謝経路当該酵素遺伝子の近傍に存在する遺伝子について、バイオインフォマティクス解析による遺伝子機能予測を行なった。その結果、2種の GH130 β -1,2-マンノシドホスホリラーゼ Teth514_1788 および Teth514_1789 をコードする遺伝子は、他の 9 種の遺伝子とクラスターを形成していることが分かった。これら遺伝子がコードするタンパク質の配列について相同性検索を行なったところ、 β -1,2-オリゴマンナン代謝に関与すると推察されるタンパク質に加え、GDP-マンノースの生合成に関連する酵素との相同性も認められた。このことから、*Thermoanaerobacter* sp. X-514 は、 β -1,2-オリゴマンナン代謝経路および GDP-マンノース生合成経路が融合した特徴的な経路を所持すると予測された。つまり、 β -1,2-オリゴマンナンは、ATP 結合カセットトランスポーター (Teth514_1792~1796) によって菌体内に輸送され、鎖長特異性の異なる β -1,2-オリゴマンナンホスホリラーゼ (Teth514_1788) および β -1,2-マンノピオースホスホリラーゼ (Teth514_1789) によって効率良くマンノースと α -Man1P に加リン酸分解される。また、GH130 ホスホリラーゼによって遊離される α -Man1P は、*R. albus* および *B. thetaiotaomicron* においてはホスホマンノムターゼおよびマンノース 6-リン酸イソメラーゼの触媒作用により解糖系へ移行すると推察されていたが、*Thermoanaerobacter* sp. X514 では GH130 ホスホリラーゼ遺伝子と同一クラスター内にマンノース 1-リン酸グアニリルトランスフェラーゼ (Teth514_1787) および GDP-マンノース依存性 α -マンノシルトランスフェラーゼ (Teth514_1786) をコードすると推定される遺伝子が存在することから、 β -1,2-マンノシドを加リン酸分解することによって生じた α -Man1P を GDP-マンノースに変換する新たな代謝経路の存在が予測された。この遺伝子クラスターは一部の *Thermoanaerobacter* 属において保存されており、GDP-マンノースの生合成に ATP 消費を伴わないこの効率的な代謝経路の所持は、生存競争に打ち勝つための大きなアドバンテージになると考えられる。

澱粉を出発材料とする β -1,2-マンノオリゴ糖の合成

10% 澱粉, 500 mM Man, 10 mM MgCl₂, 75 mM リン酸, 41 μ M α -グルコース 1,6-ビス

リン酸, 96 μ g/mL グリコーゲンホスホリラーゼ, 0.34 mg/mL α -ホスホグルコムターゼ, 0.37 mg/mL グルコース 6-リン酸イソメラーゼ, 0.23 mg/mL マンノース 6-リン酸イソメラーゼ, 2.4 mg/mL ホスホマンノムターゼ, 0.3 μ g/mL イソアミラーゼおよび 12 μ g/mL β -1,2-マンノピオースホスホリラーゼ (Teth514_1789) (12 μ g/mL を作用させ、 β -1,2-Man₂ と β -1,2-Man₃ を生成させるシステムを試みた。このシステムにおいて、反応時間 192 時間後、初期濃度 500 mM Man に対して、反応液 1 mL あたり 10% の β -1,2-Man₂ (50 mM) と 4% の β -1,2-Man₃ (19 mM) を合成できた。

Thermoanaerobacter sp. X-514 由来糖結合タンパク質の機能解析

大腸菌組換え体として生産した *Thermoanaerobacter* sp. X-514 由来糖結合タンパク質をリガンドとして、各種糖類をアナライトとして、糖結合タンパク質と各糖類との結合能を表面プラズモン共鳴法により基質特異性を調べた。*Thermoanaerobacter* sp. strain X-514 由来糖結合タンパク質は β -1,2-マンノピオースに対して結合活性が認められた。今後、定性的な結合能を確認するだけでなく、動的パラメータを算出するための定量的測定、金属イオンなどの補因子の特定、他の固定化法の検討を行う予定である。

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4件)

- (1) **知久和寛**, 仁平高則, 鈴木絵里香, 西本完, 北岡本光, 中井博之, 大坪研一; 「新規 β -マンノシドホスホリラーゼの発見」, *応用糖質科学*, 5(2):p. 120-127, **2015**. (査読有)
- (2) **K. Chiku**, T. Nihira, E. Suzuki, M. Nishimoto, M. Kitaoka, K. Ohtsubo, and H. Nakai; “Discovery of two β -1,2-Mannoside phosphorylases showing different chain-length specificities from *Thermoanaerobacter* sp. X-514”, *PLoS One*, 9: e114882, **2014**. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0114882
- (3) T. Nihira, F. Miyajima, **K. Chiku**, M. Nishimoto, M. Kitaoka, K. Ohtsubo, and H. Nakai; “One pot enzymatic production of nigerose from common sugar resources employing nigerose phosphorylase”, *Journal of Applied Glycoscience*, 61(3): p.75-80, **2014**. (査読有)

DOI: 10.5458/jag.jag.JAG-2013_012

- (4) 仁平高則、宮島双葉、**知久和寛**、大坪研一、中井博之、北岡本光；「ニゲラン代謝に関わる *Clostridium phytofermentans* 由来の新規ホスホリラーゼの発見」, *応用糖質科学*, 4(2): p147-153, **2014**. (査読有)
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009823324/>

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) **知久和寛**、仁平高則、鈴木絵里香、西本完、北岡本光、中井博之、大坪研一；「複合糖鎖の代謝に關与する新規 β マンノシドホスホリラーゼの発見」, 日本応用糖質科学会平成 26 年度大会 (第 63 回)・応用糖質シンポジウム、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)
- (2) 鈴木絵里香、**知久和寛**、仁平高則、西本完、北岡本光、中井博之、大坪研一；「*Saccharophagus degradans* 2-40 由来 4- O - β -D-マンノシル-D-グルコースホスホリラーゼによる非還元性二糖の生産」, 日本応用糖質科学会平成 26 年度大会 (第 63 回) 2014 年 9 月 24 日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県)
- (3) 仁平高則、**知久和寛**、鈴木絵里香、西本完、北岡本光、中井博之、大坪研一；「新規 1,2- β -オリゴマンナンホスホリラーゼ」, 日本応用糖質科学会平成 26 年度大会 (第 63 回) 2014 年 9 月 24 日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県)
- (4) **知久和寛**、仁平高則、鈴木絵里香、西本完、北岡本光、中井博之、大坪研一；「GH130 に属する糖質加水分解酵素 β -1,2-マンノシダーゼの発見」, 日本応用糖質科学会平成 26 年度大会 (第 63 回) 2014 年 9 月 24 日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

知久 和寛 (CHIKU KAZUHIRO)

新潟大学・自然科学系・研究員

研究者番号：30711618

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし