#### 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 6 日現在

機関番号: 16201

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2014~2016

課題番号: 26450097

研究課題名(和文)微生物の代謝機能と酵素を利用した新しい希少糖およびヘテロ希少二糖生産技術の確立

研究課題名 (英文) Study on the production of rare disaccharides and rare sugars.

#### 研究代表者

高田 悟郎 (Takata, Goro)

香川大学・国際希少糖研究教育機構・准教授

研究者番号:50322722

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文): 本課題は、D-アロース、D-アルトロース及びこれらの希少糖を含む二糖を新規の微生物の代謝機能と酵素を用いた新たな反応経路で生産する技術の確立のための基盤研究である。 本研究により、D-グルコシド3-デヒドロゲナーゼの大量生産に成功した。また、結晶化にも成功した。本酵素は様々な二糖類に作用し、化学的還元を組み合わせることで、 -1,4結合型、 -1,4結合型のアロシルグルコース、 -1,4結合型のアロシルアロース、 -1,4結合型のグロシルグルコースなど様々な希少糖含有二糖の生産が

研究成果の概要(英文): The objective of this study is the production of D-allose, D-altrose and their disaccharides using biotechnology method.

From the result of this research, we succeeded to mass-production of recombinant D-glucoside 3-dehydrogenase and its crystalization. This enzyme showed the substrate specificity against various disaccharides. By combination of chemical hydrogenation, we achieved to produced various rare sugar containing disaccharide such as 1,4-a-allosylglucose, 1,4-b-allosylglucose, 1,1-a-allosylallose, and 1,4-b-gulosylglucose.

研究分野: 応用微生物学

キーワード: 希少糖 D-アロース

#### 1. 研究開始当初の背景

応募者は、未利用のバイオマスや農産廃棄 物を糖資源として有効活用するために、これ らに多く含まれる多糖類を酵素で加水分解 して単糖を得る研究を進めている。また、得 られた単糖に酵素を作用させて、天然にはほ とんど存在しないがさまざまな生理活性を 有する希少糖に変換する研究も進めている。 応募者らは天然にはほとんど存在しない単 糖である希少糖に着目し、微生物または酵素 を用いた反応(エピメラーゼ、イソメラーゼお よびポリオールデヒドロゲナーゼの組み合 わせを用いた反応で以下、従来の方法と表記) により、すべての希少糖の生産および分離法 を確立する研究を行った(Granstrom ら J. Biosci. Bioeng. 2004)。最近の本学医学部との 共同研究により、希少糖にはさまざまな生理 活性があることがわかっており、D-プシコー スには、血糖値上昇抑制作用、D-アロースに は、臓器虚血保護作用や癌抑制作用、活性酸 素の産生抑制作用といった生理活性が知ら れている(Murata ら J. Biosci. Bioeng. 2003、 Sui ら、Int. J. Oncol. 2005)。D-プシコースは、 大学発のベンチャー企業への技術移転が行 われて実用化の段階に入っており、希少糖含 有異性化糖「レアシュガースイート」も商品 化されて希少糖を一般向けの市場へも販売 することができるようになった。このように 希少糖に関する国内外の研究は、応募者のグ ループが基礎から応用に至るまでリードし ているが、近年、韓国(Kim ら Appl.Environ.Microbiol.2006)の研究グループ も様々な希少糖の生産に成功しつつある。 我々が、競争力を保ち続けるためには、常に 新しい希少糖の生産技術の開発を続けてい く必要がある。

応募者らが世界で始めて発見した2つの 新規の酵素が、希少糖の研究に革新的な変化 をもたらした。それは、天然に多量存在する D-フルクトースから、D-タガトース 3-エピメ ラーゼを用いて希少糖 D-プシコース (Takeshita ら J. Biosci. Bioeng. 2000)、D-プシ コースから、L-ラムノースイソメラーゼを用 いて希少糖 D-アロースの生産に成功したこ とである。応募者は、この研究成果が学会で 認められ、日本農芸化学会中四国支部奨励賞 を受賞した(2008年)。応募者らはさらに、根 粒菌 Mesorhizobium loti が、上記の D-タガト ース 3-エピメラーゼ、L-ラムノースイソメラ ーゼを両方生産できることを初めて発見し た(研究業績 2、6)。このように天然糖の D-フラクトースから D-プシコースと D-アロー スを同時に生産可能な酵素を持つ微生物は 初めての発見である。応募者はすでにこれら の酵素の性質を明らかにするとともに、結晶 構造解析も行っている。さらに、応募者が土 壌中から分離した新規微生物から既知の D-アロースの代謝経路(リン酸化、異性化)とは 異なる別経路(酸化還元)が存在することを示 唆する新規の酵素、D-グルコシド 3-デヒドロ

ゲナーゼ([EC 1.1.99.13])を発見した。本酵素は、D-アロースの炭素第 3 位を酸化して 3-デヒドログルコースを生成する。その後、3-デヒドログルコースは還元されて D-グルコースを生じ、代謝されていくと考えられた。このように、本酵素が希少糖代謝にどのような影響を与えるのか大変興味深く、また、本酵素を用いた新たな希少糖の生産経路の開発に発展することも期待できる。

つづいて、生理機能の研究者から単糖に機能があれば二糖にするとより安定で高い活性を期待できる可能性があるので、希少糖を用いた二糖を作って欲しいとの要請が出てきた。本酵素は、二糖から炭素第3位の水酸基が異なる二糖へと変換できる有用な酵素であり、例えば、グルコースはアロースに、ガラクトースはグロースに変換することができる。そこで、本酵素と糖ホスホリラーゼを用いて希少糖を含む二糖やオリゴ糖の生産にも取り組むことにした。

希少糖の中にはなお、従来の方法では多段階の反応プロセスが必要なため収率が低く、生産そのものが困難な希少糖も多数存在している。D-アロース、D-アルトロースの生産においても、D-フラクトースからの最大収率は5-10%と大変効率が悪く、大量生産のネックとなっている。それらに対しては、生産・分離プロセスが複雑で多大な労力と時間、コストという課題を解決する必要が急務であり、本酵素を利用した新しい希少糖経路の開発への期待は大きい。

## 2. 研究の目的

本課題では、これまでの応募者らの研究成果を発展させて、次の目標を達成させることを目的とした。

- (1) 新規 D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼ の反応機構と基質認識機構を明らかに するために、結晶構造を明らかにする。 変異を導入しオリゴ糖にも作用できる スーパー酵素の作製を試みる。
- (2) 新たに分離した微生物が、二糖や希少糖をどのように代謝するかを調べるために、代謝産物の機器分析を行い、加水分解と解糖を抑える制御による希少糖生産効率の向上を目指す。
- (3) セロビオースやマンノビオース、マルトース、スクロース、トレハロース、ラクトースを出発原料に、D-アロースを含む希少二糖、D-アルトロースを含む希少二糖、D-グロースを含む希少二糖を経てD-アロース、D-グロースを生産する方法を開発する。
- (4) セロビオース 2 -エピメラーゼを用いて 生産する 1,4-β-グルコシルマンノースと 1,4-β-マンノシルグルコースが生産でき れば、さらに、D-グルコシド 3-デヒドロ ゲナーゼを用いて新規の希少二糖を生 産する。

### 3. 研究の方法

(1)D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼの遺伝

本酵素は、3つのヘテロサブユニットから なる酵素で、組換え酵素での大量生産例は報 告されていない。糖生産、構造解析のために は、組換え酵素の生産が必要である。そこで、 本酵素遺伝子を発現ベクターpQE60に連結後、 大腸菌 JM109 に組み込んだ。

(2) D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼの結晶 化および X 線結晶構造解析

本酵素は、ヒスタグを連結すると封入体を 形成するため、連結させず、各種クロマトグ ラフィーによって酵素を精製した。次に、酵 素濃度を、10 mg/ml に調製しシッティングド ロップ法によって、各種条件下で結晶化を行 った。本酵素は、構造解析例がないため、構 造解析の方法については検討中である。

(3) 希少糖の代謝機能の解析と代謝制御変異 の導入

希少糖の代謝産物を明らかにするために、 遺伝子の操作が容易な大腸菌を用いた。D-ア ロースの代謝系は大腸菌にも存在する。解糖 系のフスホフルクトキナーゼ遺伝子および ピルビン酸キナーゼ遺伝子を破壊し、D-アロ ースからの代謝の流れを機器分析により調 べることで、分離した微生物の代謝経路を推 測した。

(4) 未利用資源から希少糖を含む各種希少二 糖の生産技術の確立

セルロースとガラクトマンナンを加水分 解して得られる、セロビオース、マンノビオ -スのほか様々な各種二糖から酵素反応に より、3-デヒドロ二糖の生産を行った。続い て、水素化ホウ素ナトリウムを用いた穏やか な化学的還元によりアロースまたはアルト ロースを含む希少二糖の生産を試みた。その 後1N 塩酸で加水分解しD-アロース・D-アル トロースの生産を試みる。

(5)グルコシルマンノースとマンノシルグル コースからの新規希少二糖の生産

セロビオース 2-エピメラーゼ遺伝子をク ローニングし、組換え酵素を用いて、セロビ オース、マンノビオースからグルコシルマン ノースとマンシルグルコースの生産を試み る。続いて、D-グルコシド 3-デヒドロゲナー ゼおよび水素化ホウ素ナトリウムを用いて 酸化還元を行い、アロシルマンノース、アル トシルグルコースの生産を試みる。

# 4. 研究成果

(1) D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼの遺伝 子組換え

GAGEACATCACOGACTATCAGAATGOOGACAAGGAAGOCTGGGATTATCOOCATCGCAAC GTGCCACGCAGGAGATGAAGGCGAAATACCCCGTTCTCAGCCGCGATTACCTGCTGGAA GGGACGCTGGGCATGTGGGCGATGAGCAGGAAACGCCCTATGTGGAAGAAAAGCGC E A T L G M W A D E Q E T P Y V E E K R  ${\tt TATEGCTGGTCOSCAG_ACC_FAT_BTGSAG_ECC_AATSCGAAASACSGC_ATGGCGGTGSACTGGCGACTGGCGAATSCGAAASACSGCATGGCGAATSCGAAASACGGCGATGGCGAATSGCGAAASACGGCGATGGCGGACTGGCGAATSGCGAAASACGGCGATGGCGGAATSGCGAAATSGCAATSGCAATTSGCAAT$ CCATCCCCTATGAGGACGTGTCTCCCATGGTATGACTATGTCGAGCGTTTTGCCGGCATT TOGGCAGCCGCGAGGCTGGATATTCTTCCCGATGGTGAATTCCTGCCCCCATTCCG S G S R E G L D I L P D G E F L P P I P CTCAATTTOGTOGAGCAGGATGTOGOCAGCGGGTGAAAAAGGGTTCAAGGGCACACGC GCTGTCAGTTCCGCAACAAGTGTCGGCTGGGCTGTCCCTTCGGCGGCTAFTTCAGCACG R C Q F R N K C R L G C P F G G Y F S T ATGCOGAAACCAATCTGACCTAOGAATACACOGCOGACATCATCTTCCTCAACGCCTCG DAETNLTYEYTADITFLNAS ACOĞLEĞVAÇÎ CEĞACYÎ GOĞ LOĞLLÎY LEĞVAÇÎ COĞOCÎY COĞYLÊ LEĞE GÖRVIĞ GOĞ ELIĞ LE GCAGCAGCTOGGOGAACTOGGOCATAAOGTGATGGAOCAOCATTTOCGCATGGGOGOC ACATTCOSCGITTOCGCAATACOGGOGAGACAAGCGCAAATATCTGCGGGGGTTTOGGA Y I P R F R N T G D D K R K Y L R G F G  ${\tt tati_{A}} {\it asgett_{C}} {\it tag} {\it ca_{A}} {\it asg} {\it st_{C}} {\it ca_{C}} {\it ca_{C}} {\it asg} {\it asges} {\it ca_{C}} {\it ca_{A}} {\it tag} {\it ca_{A}} {\it ca_{C}} {\it ca_{A}} {\it tag} {\it ca_{C}} {\it ca_{C$ GOOGATTACAAGGAGGCCTGACCGAGCGGGGGGGCTGGACCATCGGCATGACTGCTTC
A D V K E A L T E P G G W T I G M T A F GGAGAAA TGCTGCCCT ATCACGACAACCGCGTGAAGCTGGATCATGACAAGAAGGACAAA G E M L P Y H D N R V K L D H D K K D K | Total Color to Color Color

COCTCCAGGGGCAGTTACGCCCCCGGCATGGGTATTCACGAAATGGGAACGGCCCCATG
PSRGSYAPGMGTHEMGTTAR GGACCOGACCOGAAACCTCCGTCCTCAACGGCAACAACCAGGTCTGGGATGCACAGAAC GRDPKTSVLNGNNQVWDAQ GTCTTTGTCACTGACGGGCCTGCATGACATCGGCTCCATCCGTCTTTGACC ATTGCTACACOGAGGAGCAGCGGACACTCTTCGTTTCCGCAATCCCTGAAATCGAGAAG D C Y T D E Q R T L F V S A I P E I E CAGTCAGGCCGAACACAAAAAGGCCTTTCTGGAGCTGACGGCAGAACAGGGGCAGG RSQAEHKKAFLFITAFOP A S A E H A A A P L E L T A E Q R Q . CTTGCCGCGCTGGACAAGCGGCCAAGGCGAACAACGCCGCAAAGCCGCACGCC L L A A L D K Q A K A E Q T P A K P H . TCACGCTOGTCAAGCAGCTGACGCTGCTCGGTTTCTTCACCTCGAAGATCG AAGTTCTOGTCTACGAGAGATTCCCGGCGGTTTCGAAGACCGCCTTCCCTACAA E V L V Y D E I P G G F E D R L P Y COGCTATGCTGACCGCAAGCACCGTTCCCGCTTTTTCGGAGGGGGATGTTGCCAAGGGG TCGGCCCACAGCTTAACGGCACCATCGGCCGGCGGCGGCGGCGGCTGACTATACT V G P Q L N G T I G R A A G G V P D Y

上図に示したように、本酵素は、3 つのペ プチドからなっており、順に、1683bp からな る 561 アミノ酸のサブユニット、558bp から なる 186 アミノ酸のサブユニット、393bp か らなる 131 アミノ酸のサブユニットであるこ とが分かった。組換え酵素の生産にも成功し、 精製酵素の分子量は約65,000と、触媒サブユ ニットの分子量と一致した。しかし、他のサ ブユニットは検出できなかった。

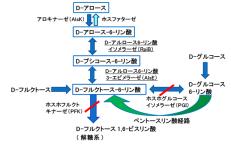
相同性検索をもとに、五か所の点変異を導 入した変異酵素を構築した。それぞれの変異 酵素の基質特異性を検討し、オリゴ糖への反 応性を調べている。

(2) D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼの結晶 化および X 線結晶構造解析



精製酵素を用いて、上図に示したような条 件で、20°C1 週間、結晶化を行ったところ、 六面体様の結晶が得られた。現在、この結晶 化条件を用いて、X線結晶構造解析を進めて いる。

(3) 希少糖の代謝機能の解析と代謝制御変異 の導入



希少糖 D-アロースの推定代謝経路

前ページに示したように、大腸菌は D-アロースを代謝する既存の経路を持っている。そこで、まず、D-アロースを代謝できない遺伝子破壊株、すなわち、ホスホフルクトキナーゼ遺伝子、ピルビン酸キナーゼ遺伝子を破壊した変異株を作製した。次に、D-グルコシド3-デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入し、D-アロースを炭素源に培養を行ったところ、生育が確認され、代謝産物の分析から3-デヒドロ-D-アロースを経て代謝することが分かった。

(4) 未利用資源から希少糖を含む各種希少二 糖の生産技術の確立



D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼの基 質特異性を調べたと ころ、ラクトース、 セロビオース、マル トース、スクロース、 トレハロースに作用

し、マンノビオースにはほとんど作用しないことが分かった。それぞれ、水素化ホウ素ナトリウムで還元したところ、グロシルグルコース、アロシルグルコース( $\beta$ -1,4)、アロシルグルコース( $\alpha$ -1,4、上図)、アロシルフルクトース、アロシルアロース( $\alpha$ -1,4)が得られ、酸加水分解により、D-グロースおよび D-アロースが得られた。しかし、D-アルトロースを得ることはできなかった。また、 $\alpha$ 型の希少糖を含む二糖は不安定で容易に分解されることが分かった。

(5)グルコシルマンノースとマンノシルグル コースからの新規希少二糖の生産

D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼがマンノビオースに作用しないことから、方針を転換し、セロビオース 2-エピメラーゼ遺伝子をクローニングし組換え酵素生産を行った。次に、セロビオースとマンノビオースからそれぞれグルコシルマンノースとマンノシルグルコースを生産した。これらのヘテロ二糖にD-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼを作用させたところ、反応性が非常に低く、3-デヒドロ糖の生産までには至らなかった。今後は、変異酵素を用いて D-アルトロースを含む二糖の生産を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件) すべて査読あり

① Chaikaew, S., Kanpiengjai, A., Intatep, J., Unban, K., Wongputtisin, P., <u>Takata, G.</u>, Khanongnuch, C. X-ray-induced mutation of *Bacillus* sp. MR10 for manno-oligosaccharides production from copra meal (2017) Preparative Biochemistry and Biotechnology, 47 (4), pp. 424-433.

DOI: 10.1080/10826068.2016.1252929

② Unban, K., Kanpiengjai, A., <u>Takata, G.</u>, Uechi, K., Lee, W.-C., Khanongnuch, C. Amylolytic Enzymes Acquired from L-Lactic Acid Producing *Enterococcus faecium* K-1 and Improvement of Direct Lactic Acid Production from Cassava Starch (2017) Applied Biochemistry and Biotechnology, pp. 1-16. Article in Press.

DOI: 10.1007/s12010-017-2436-1

③ Terami, Y., Yoshida, H., Uechi, K., Morimoto, K., Takata, G., Kamitori, S. Essentiality of tetramer formation of *Cellulomonas parahominis* L-ribose isomerase involved in novel L-ribose metabolic pathway (2015) Applied Microbiology and Biotechnology, 99 (15), pp. 6303-6313.

DOI: 10.1007/s00253-015-6417-4

④ Morimoto, K., Yoshihara, A., Furumoto, T., <u>Takata, G.</u> Production and application of a rare disaccharide using sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* (2015) Journal of Bioscience and Bioengineering, 119 (6), pp. 652-656.

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.11.011

⑤ Terami, Y., Uechi, K., Nomura, S., Okamoto, N., Morimoto, K., <u>Takata, G.</u> Production of L-allose and D-talose from L-psicose and D-tagatose by L-ribose isomerase (2015) Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 79 (10), pp. 1725-1729.

DOI: 10.1080/09168451.2015.1038215

© Uechi, K., <u>Takata, G.</u>, Yoneda, K., Ohshima, T., <u>Sakuraba, H.</u> Structure of D-tagatose 3-epimerase-like protein from *Methanocaldococcus jannaschii* (2014) Acta Crystallographica Section F:Structural Biology Communications, 70 (7), pp. 890-895.

DOI: 10.1107/S2053230X14011005

⑦ Yoshida, H., Yoshihara, A., Teraoka, M., Terami, Y., Takata, G., Izumori, K., Kamitori, S. X-ray structure of a novel L-ribose isomerase acting on a non-natural sugar L-ribose as its ideal substrate (2014) FEBS Journal, 281 (14), pp. 3150-3164.

DOI: 10.1111/febs.12850

## 〔学会発表〕(計28件)

- ① Elucidation of functional sugar production using enzyme and fermentation technology of microorgasms, , International symposium on microbial research and biotechnology for biomass utilization, Fukuoka(JAPAN), 2015 年 11 月.
- o<u>Goro Takata</u>, Keiko Uechi, Yuji Terami, Chartchai Khanongnuch, Akane Terai, Mami Kazama, Kohei Nawa, Akkharapimon Yotsombat

② 酵素法を用いた希少糖生産の新展開,平成27年度日本応用糖質科学会中国・四国支部シンポジウム,福山大学(広島県福山市),2015年11月

# 高田 悟郎

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 悟郎 (Takata, Goro)

香川大学・国際希少糖研究教育機構・准教授 研究者番号:50322722

## (2)研究分担者

森本 兼司 (Morimoto, Kenji) 香川大学・国際希少糖研究教育機構・准教授 研究者番号: 90363184

## (3)連携研究者

櫻庭 春彦 (Sakuraba, Haruhiko)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号: 90205823