

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：51601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450147

研究課題名(和文)ニワトリ卵白リゾチームの反応機構仮説に基づく新規遷移状態アナログの分子設計と展開

研究課題名(英文)Molecular design and development of novel transition-state analogue based on reaction mechanism of hen-egg white lysozyme

研究代表者

尾形 慎(Ogata, Makoto)

福島工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：10532666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、2種類の新規HEWL遷移状態アナログ阻害剤の分子設計および合成と、これら阻害剤を用いたHEWLの触媒機構の再検証について行った。さらに、本阻害剤の設計原理を他の糖質加水分解酵素にも適用可能であることを実証した。また、今回構築したオリゴ糖誘導体ライブラリーの一部は、酵素の活性を簡便に測定可能な新規材料として利用可能であることが示され、今後の更なる応用展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, molecular design and synthesis of two transition-state analogue as inhibitors against hen-egg white lysozyme (HEWL). Furthermore, we investigated the catalytic mechanism of HEWL using these inhibitors. Next, it proved that the design principle of this inhibitor can also be applied to other polysaccharide-hydrolyzing enzyme. In addition, it was revealed that a part of the resulting oligosaccharide derivatives this time can be used as a substrate for enzyme activity measurement.

研究分野：生物有機化学

キーワード：リゾチーム 遷移状態アナログ キチンオリゴ糖 オリゴ糖 阻害剤 酵素

1. 研究開始当初の背景

グリコシダーゼの一つである HEWL は、世界で初めて X 線結晶構造解析によってその三次元構造が決定された酵素である。6 つの基質結合サブサイト (-4 から +2) のうち -1 と +1 サブサイト間で、基質 (ペプチドグリカンやキチンなど) のグリコシド結合が加水分解される。HEWL は X 線結晶構造解析によって構造が解き明かされた最初の酵素であるにもかかわらず、その反応機構に関しては、遊離のオキソカルベニウムイオンがそのまま電荷的に安定化されている “Phillips 機構” か、活性中心のカルボキシ基にグリコシル基が共有結合した “Koshland 機構” かで、論争が絶えなかった (図 1)。Phillips 機構を支持する実験的証拠としては、1972 年にキトテトラオースのラクトン誘導体が合成され、HEWL との結合実験が行われている (*J. Biol. Chem.* 1972, 247, 4740)。一方、Koshland 機構に至っては、野生型 HEWL に対する実験的証拠はこれまで一例もない。唯一の報告例は、2001 年に極めて良好な脱離基を有するフッ化糖基質と HEWL 部位特異的変異体 (E52Q) とを用いて行われたグリコシル酵素共有結合中間体形成実験のみである (*Nature*, 2001, 412, 835)。この報告以後、HEWL の反応機構は多くの立体保持型グリコシダーゼと同様に Koshland 機構を經由して触媒されるということが定説になりつつある。しかしながら、実際には 2 つの HEWL 触媒反応機構仮説に対する正確な結論はまだ得られておらず、またそれらを証明可能な遷移状態アナログの合成に関して合成の難しさや構造の不安定さなどから、未だ達成されていないのが現状である。

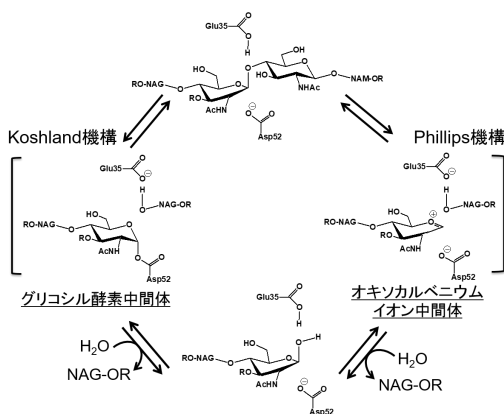


図1 ニワトリ卵白リゾチームの推定反応機構

そこで申請者は、Phillips と Koshland の両説が推定した遷移状態に基づいて構造安定性と合成簡便性に優れた 2 タイプの HEWL 遷移状態アナログ ( $sp^2$  型アノマー; GN<sub>3</sub>L および  $sp^3$  型アノマー; GN<sub>3</sub>M) の合成を着想した (図 2)。興味深いことに、Koshland が提唱した遷移状態のアナログとして設計した、1 デオキシノジリマイシンを末端に有する

GN<sub>3</sub>M が、非常に優れた拮抗型阻害剤として機能すると共に、結晶構造解析から GN<sub>3</sub>M の末端糖残基は <sup>4</sup>C<sub>1</sub> いす型配座で HEWL の -1 サブサイト上に結合することを見出し、世界で初めて Koshland 機構を支持する遷移状態アナログ阻害剤の合成に成功した。また、GN<sub>3</sub>M の HEWL に対する高い結合親和性にはキトトリオース構造と末端糖残基の環窒素の正電荷も重要な役割を担っている可能性を示唆した。

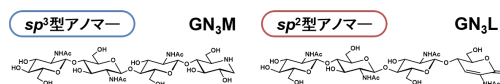


図2 新規ニワトリ卵白リゾチーム遷移状態アナログ

2. 研究の目的

本研究では、GN<sub>3</sub>M をリード化合物として新規 HEWL 遷移状態アナログの分子設計を行うことで、HEWL の反応機構の解明、並びに結合親和性を飛躍的に増強した新規阻害剤の開発研究を展開する。具体的には、阻害剤分子を HEWL の -4 から -2 サブサイトへの結合に関与する “キチンオリゴ糖部” に関して、各種相互作用解析を指標とした構造最適化を行う。また、本阻害剤の設計原理は基質結合サブサイトを有し多糖類をエンド型で加水分解する種々の立体保持型グリコシダーゼに対して適用可能であることから、これまで阻害剤が発見されていない酵素や有用酵素などに対する新規阻害剤の開発を行う。さらに、オリゴ糖型阻害剤の合成に必要な糖転移酵素の探索も合わせて行う。

3. 研究の方法

本研究では、HEWL の -4 から -1 サブサイトに結合可能な遷移状態アナログ阻害剤の合成を行う。具体的には、Phillips と Koshland の両説に対応する 2 タイプの遷移状態アナログを、独自に開発したキチンオリゴ糖変換技術を基盤として合成を試みた。さらに、各種相互作用解析を指標とすることで、阻害剤の構造最適化を行い、飛躍的に結合親和性を増強した HEWL 遷移状態アナログ阻害剤の創製を行った。さらに、本阻害剤を用いて他のキチン分解系酵素に対する阻害効果の評価を行った。

続いて、本阻害剤の設計原理を  $\beta$ -アミラーゼに適用し、阻害剤合成を行った。また、阻害剤合成に使用可能な糖加水分解酵素のスクリーニングを行い、新規な  $\beta$ -L-フコシダーゼの諸性質解明にも着手した。

4. 研究成果

【GN<sub>3</sub>L の合成】

近年、筆者らはホウ酸存在下中性領域において GlcNAc を加熱処理することにより、モルガン エルソン法の色素原料として知ら

れている Chromogen I を含む主に 3 種類のヘキソフラノース誘導体を一段階かつ高収率で得ることに成功している。本方法を (GlcNAc)<sub>4</sub> に対して適用することで、Phillips が提唱した HEWL 遷移状態のアナログとして、(GlcNAc)<sub>4</sub> の還元末端 GlcNAc 残基を 2-アセタミド-2,3-ジデオキシジデヒドロ-グルコノ- $\beta$ -ラクトン (L) 構造に変換した GN<sub>3</sub>L の合成を行った。この L 構造は、不飽和ラクトン構造を有し C1 が sp<sup>2</sup> 混成で安定な半イス型様コンフォメーションをもつ。方法は、400 mM ホウ酸緩衝液 (pH 7.0) に対して終濃度が 100 mM となるように (GlcNAc)<sub>4</sub> を溶解後、100 °C で 1 時間加熱処理した。その反応液を活性炭カラムクロマトグラフィーに供することで、反応生成物として (GlcNAc)<sub>4</sub> の還元末端 GlcNAc 残基の C2 と C3 が選択的に脱水された GN<sub>3</sub>D を収率 4.4% で得た。また、本反応は還元末端 GlcNAc 選択的な一分子脱水反応であり、キトピオースやキトトリオース、キトペンタオース等を用いてもほぼ同様の収率で GN<sub>n</sub>D (n = 1, 2, 4) を得ることができた。さらに、亜臨界条件で反応を行うと触媒を使用しなくても、水溶媒のみで GN<sub>n</sub>D が合成可能であること、さらには収率も分析収率で 25% にまで達することを実証した。続いて、GN<sub>3</sub>D を蒸留水に溶解後、活性炭触媒を 15% (w/v) となるように添加し、60 °C で攪拌しながら 120 時間反応を行った。その結果、GN<sub>3</sub>D の GN<sub>3</sub>L への定量的な変換を確認した。

#### 【GN<sub>3</sub>M の合成】

HEWL を触媒素子とした糖転移反応を利用することで、Koshland が提唱した遷移状態のアナログとして 1-デオキシノジリマイシン (モラノリン; M) を末端構造に有するキトトリオシルモラノリン (GN<sub>3</sub>M) の合成を行った。この末端モラノリン残基は、C1 が sp<sup>3</sup> 混成であり <sup>4</sup>C<sub>1</sub> と呼ばれるイス型コンフォメーションをとっている。具体的には、糖供与体 [(GlcNAc)<sub>4</sub>] と糖受容体 (モラノリン) のモル比率が 1 対 7、反応液の全基質濃度が 2.9% (w/v) となるように調整後、HEWL を添加し 50 °C で 100 時間反応を行った。反応終了後、イオン交換カラムクロマトグラフィー (Dowex-50X H<sup>+</sup> form)、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Toyopearl HW-40S)、脱塩の順で単離精製操作を行い、反応生成物として GNM、GN<sub>2</sub>M、GN<sub>3</sub>M をそれぞれ糖供与体あたり収率 36.3%、5.9%、2.7% で得た。結果として、目的物である GN<sub>3</sub>M を非常に低収率ではあるが一段階の酵素反応で得ることに成功した。また、原料として使用したモラノリンは 80.6% という高い割合で回収することができた。

#### 【遷移状態アナログ阻害剤の機能評価】

キトトリオシルモラノリン (GN<sub>3</sub>M) と HEWL との相互作用解析の結果、GN<sub>3</sub>M が HEWL に対して拮抗型の強い阻害活性を示すとともに、その結合位置は触媒残基が位置する -1 サブサイトを含む -4 から -1 サブサイトである

ことが示された。これにより、新規遷移状態アナログ GN<sub>3</sub>M を用いることで、HEWL の共有結合中間体形成に関する新たな実証例を示すことに成功した。また、HEWL 以外の family GH22 リゾチームに対する阻害効果を実証するため、GN<sub>3</sub>L と無脊椎動物型 (i-type) ハマグリリゾチームとの結合試験を行った結果、HEWL と GN<sub>3</sub>L との共結晶の構造を 1.77 Å の分解能で決定した (図 3)。さらに、GN<sub>2</sub>M がコケ由来の family GH19 キチナーゼの基質結合サブサイトに強く結合することを等温滴定カロリーメトリーおよび NMR 法によって明らかにした (図 3)。

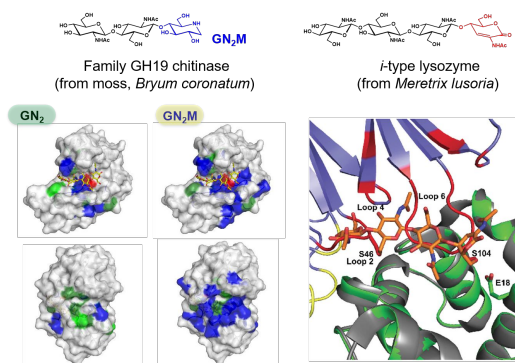


図 3 各種阻害剤の機能評価

#### 【GND の利用】

GND を基質として  $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ ( $\beta$ -NAHase) の加水分解反応を行った。その結果、GND から遊離した D 構造は直ちに Chromogen I へ構造変換することが明らかとなった (図 3)。Chromogen I は発色基質として知られており、p-dimethylaminobenzaldehyde を含む塩酸溶液と混合することで、590 nm の波長吸収を有する化合物に変換することが知られている。この特徴を利用して、*Aspergillus oryzae* 由来  $\beta$ -NAHase の反応速度論解析を行った。結果、Lineweaver-Burk plot において良好な直線性を示し、K<sub>m</sub> 値および V<sub>max</sub> 値を算出することに成功した (K<sub>m</sub> = 2.8 mM, V<sub>max</sub> = 0.018 mM/min)。

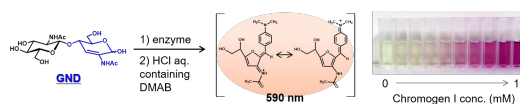


図 4 GND を利用した酵素の活性測定法

#### 【 $\beta$ -アミラーゼ阻害剤の合成】

エキソマルトテトラオヒドロラーゼとマルトトリオヒドロラーゼを触媒素子とした糖転移反応を利用することで、1-デオキシノジリマイシンを末端構造に有するマルトテトラオシルモラノリン (G<sub>4</sub>M) およびマルトトリオシルモラノリン (G<sub>3</sub>M) の合成を行った。

結果として、G<sub>4</sub>M を収量 55.2 mg (収率 16.5%)、G<sub>3</sub>M を収量 7.5 mg (収率 9.5%) でそれぞれ得ることに成功した。

【阻害剤合成に使用する糖加水分解酵素のスクリーニング】

現在我々は、阻害剤合成に基質特異性や位置選択性の観点から糖質加水分解酵素の逆反応を利用している。そこで、フコース含有多糖を分解する酵素の阻害剤合成を目的として新規フコシダーゼの探索を行った。その結果、イトマキヒトデ膵臓より新規 -L-フコシダーゼを発見した。現在、糖転移能も含め諸性質の解明を行っている。

#### 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 5 件)

- 1) Leysen S, Van Herreweghe JM, Yoneda K, Ogata M, Usui T, Araki T, Michiels CW, Strelkov SV. The structure of the proteinaceous inhibitor Plil from *Aeromonas hydrophila* in complex with its target lysozyme. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 71(Pt 2), 344-351 (2015).
- 2) Shinya S, Urasaki A, Ohnuma T, Taira T, Suzuki A, Ogata M, Usui T, Lampela O, Juffer AH, Fukamizo T. Interaction of di-*N*-acetylchitobiosyl moranoline with a family GH19 chitinase from moss, *Bryum coronatum*. *Glycobiology*, 24(10), 945-955 (2014).
- 3) Osada M, Kikuta K, Yoshida K, Totani K, Ogata M, Usui T. Non-catalytic dehydration of *N,N'*-diacetylchitobiose in high-temperature water. *RSC advances*, 4, 33651-33657 (2014).
- 4) 尾形慎, 碓氷泰市, 梅本尚之, 大沼貴之, 深溝慶, 沼田倫征, 糖質関連酵素の最近の進歩 2 リゾチーム遷移状態アナログの設計に基づく反応機構の検証, *化学と生物*, 52(12), 819-824 (2014).
- 5) 尾形慎, 碓氷泰市, 梅本尚之, 大沼貴之, 深溝慶, 沼田倫征, リゾチーム遷移状態アナログの合成と反応機構の解析, *応用糖質科学*, 4(4), 308-313 (2014).

[学会発表](計 22 件)

- 1) 尾形慎, 碓氷泰市, 梅本尚之, 大沼貴之, 深溝慶, 沼田倫征, リゾチーム遷移状態アナログの設計に基づく反応機構の検証, *日本農芸化学会シンポジウム*, 2015 年 3 月 29 日.
- 2) 尾形慎, 松崎優香, 平良東紀, 碓氷泰市, エールリッヒ試薬との呈色反応に基づく糖質加水分解酵素の新規活性測定法, 日

本応用糖質科学会, 2014 年 9 月 24 日.

- 3) 松崎優香, 平良東紀, 碓氷泰市, 尾形慎, キチンオリゴ糖誘導体を用いた糖加水分解酵素の新規活性測定法, *キチン・キトサンシンポジウム*, 2014 年 8 月 8 日.
- 4) 後藤咲季, 河野はるか, 柴田公彦, 鈴木智大, 尾形慎, 新規 -L-フコシダーゼの探索とその諸性質解明, *日本応用糖質科学会東北支部会*, 2015 年 7 月 11 日.
- 5) 尾形慎, 新しい機能性糖質づくりとその展開, *静岡大学学術セミナー*, 2015 年 10 月 2 日.
- 6) 加藤優奈, 尾形慎, -アミラーゼ阻害剤のワンポット酵素合成, *東北高専シンポジウム*, 2015 年 12 月 6 日.
- 7) 河野はるか, 後藤咲季, 柴田公彦, 鈴木智大, 尾形慎, 新規 -L-フコシダーゼの精製と諸性質の検討, *東北高専シンポジウム*, 2015 年 12 月 6 日.
- 8) 佐野孝晃, 二階堂望, 尾形慎, 中島将博, 中井博之, 戸谷一英, *Trichoderma reesei* 由来 -グルコシダーゼの糖転移生成物の解析, *日本応用糖質科学会東北支部会*, 2016 年 7 月 16 日.
- 9) 青木大地, 田中利彦, 細見修, 尾形慎, 非天然型二糖メリピオサミンの酵素合成と効率的精製法の検討, *日本応用糖質科学会東北支部会*, 2016 年 7 月 16 日.
- 10) 河野はるか, 後藤咲季, 柴田公彦, 加藤紗優里, 小野晶子, 鈴木智大, 尾形慎, イトマキヒトデ由来 -L-フコシダーゼの精製とその諸性質解明, *日本応用糖質科学会東北支部会*, 2016 年 7 月 16 日.
- 11) 青木大地, 田中利彦, 細見修, 尾形慎, メリピオサミンの酵素合成と効率的精製法の検討, *日本キチン・キトサン学会*, 2016 年 8 月 18 日.
- 12) 東海林真也, 末永信, 尾形慎, 戸谷一英, 嶋田五百里, 福長博, 高橋伸英, 長田光正, 高温高圧水中での *N*-アセチルグルコサミンからの含窒素化合物合成, *日本キチン・キトサン学会*, 2016 年 8 月 18 日.
- 13) Haruka Kono, Saki Goto, Kimihiko Shibata, Sayuri Kato, Tomohiro Suzuki, Makoto Ogata, Purification and characterization of -L-fucosidase from *Asterina pectinifera*, *化学系学協会東北大会*, 2016 年 9 月 10 日.
- 14) 長田光正, 東海林真也, 末永信, 嶋田五百里, 福長博, 高橋伸英, 尾形慎, 戸谷一英, 高温高圧水中での *N*-アセチルグルコサミンからの含窒素化合物の無触媒合成, *日本応用糖質科学会*, 2016 年 9 月 14 日.
- 15) 戸谷一英, 二階堂望, 佐野孝晃, 小野寺一樹, 尾形慎, 中島将博, 中井博之, *Trichoderma reesei* 由来 -グルコシダーゼ II (Cel1A) の糖転移生成物の解析, *日本応用糖質科学会*, 2016 年 9 月 14 日.
- 16) 河野はるか, 後藤咲季, 柴田公彦, 加藤

なし

- 紗優里, 小野晶子, 鈴木智大, 尾形慎, イトマキヒトデ由来 -L-フコシダーゼの精製・諸性質解明・クローニング, 日本応用糖質科学会, 2016年9月14日.
- 17) 長田光正, 東海林真也, 末永信, 嶋田五百里, 福長博, 高橋伸英, 尾形慎, 戸谷一英, 高温高压水を利用したアミノ糖からの含窒素化合物合成, 触媒討論会討論会, 2016年9月14日.
- 18) 加藤紗優里, 後藤咲季, 河野はるか, 尾形慎, 鈴木智大, イトマキヒトデ由来 -L-フコシダーゼの精製とその性質, 日本生化学会, 2016年9月25日.
- 19) 青木大地, 田中利彦, 細見修, 尾形慎, メリビオサミンの合成と効率的な分離・精製条件の確立, 東北高専シンポジウム, 2016年11月27日.
- 20) 小野晶子, 加藤紗優里, 河野はるか, 後藤咲季, 尾形慎, 鈴木智大, イトマキヒトデ由来 -L-フコシダーゼの精製・諸性質解明・クローニング, 第6回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム, 2016年12月2日.
- 21) 河野はるか, 後藤咲季, 柴田公彦, 加藤紗優里, 小野晶子, 鈴木智大, 尾形慎, イトマキヒトデ由来新規 -L-フコシダーゼの構造解析, 東北高専シンポジウム, 2016年11月27日.
- 22) 松井萌, 松崎優香, 碓氷泰市, 尾形慎, -N-アセチルヘキソサミニダーゼに対する新規活性測定法の開発, 第2回北関東磐越地区化学技術フォーラム, 2016年12月10日.

〔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

<http://researchmap.jp/ogata-m/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾形 慎(オガタ マコト)

福島工業高等専門学校 化学・バイオ工学科 准教授

研究者番号: 10532666

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者