

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850059

研究課題名(和文)オリゴ糖異性化酵素とその類縁酵素の構造基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular basis for oligosaccharide epimerases and their related enzymes.

研究代表者

佐分利 亘(SABURI, Wataru)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00598089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：セロピオース2-エピメラーゼ(CE)は、1-4二糖の還元末端グルコース残基をマンノース残基に異性化する。本酵素は触媒ドメインおよび触媒部位構造を他の単糖異性化酵素と共有する。本研究では、これら酵素の構造機能相関を解析した。Rhodothermus marinus由来CEの基質結合部位残基への変異により二糖特異性に重要なアミノ酸残基を決定した。また、本酵素に僅かなイソメラーゼ活性を認め、Cardicellulosiruptor saccharolyticus由来酵素との比較からイソメラーゼ活性に重要な構造を見出した。機能未知タンパク質の解析から、新規なマンノース異性化酵素を見出した。

研究成果の概要(英文)：Cellobiose 2-epimerase (CE) epimerizes the reducing end glucose residue of beta1-4 disaccharides to mannose residue. It shares the catalytic domain and site structures with other monosaccharide isomerases/epimerases. In this study, structure-function relationship of these enzymes was analyzed. Important amino acid residues for high selectivity for disaccharides in Rhodothermus marines CE were determined through site-directed mutation. Slight isomerization activity was observed in R. marines CE, and important structure for isomerase activity was determined based on the comparison of the structures between R. marines and Cardicellulosiruptor saccharolyticus CEs. A novel enzyme acting on mannose was found from function unknown proteins.

研究分野：応用生物化学

キーワード：セロピオース2-エピメラーゼ エピメラーゼ イソメラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

糖質の異性化(エピメリ化やアルドースとケトースの相互変換)は、糖質代謝の重要な反応であり、異性化糖や、近年では希少糖ブシコスの生産など、産業利用もされる有用な反応である。現在 Enzyme Nomenclature には、50種類ほどの糖質異性化酵素( EC 5.1.3.- と EC 5.1.1.-) が登録されているが、その大半がリン酸基や NDP 基を有する糖質に作用するものである。これらの官能基を持たない糖質に作用する酵素もほとんどが単糖を基質とし、未修飾のオリゴ糖に作用する酵素はセロピオース 2-エピメラーゼ( EC 5.1.3.11, CE) とマルトースエピメラーゼ( EC 5.1.3.21) しか知られていない。マルトースエピメラーゼは還元末端グルコース残基のアノマーの変換を触媒する酵素でありエピマーは生成しない。一方、CE はセロピオースなどの  $\beta$ -1,4-結合からなるオリゴ糖の還元末端グルコース残基をマンノース残基に可逆的に異性化する酵素であり、未修飾のオリゴ糖の構造を変換する唯一の酵素である。*Ruminococcus albus* および *Rhodothermus marinus* 由来の 2 つの CE の結晶構造を明らかにした結果、基質との相互作用や触媒機能に重要な構造因子の情報を得られた。いずれの酵素も 12 本の  $\alpha$ -ヘリックスからなる触媒ドメインを有していたが、CE 構造は、アミノ酸配列レベルでの類似性が 15% に満たない単糖異性化酵素、アシルグルコサミン 2-エピメラーゼ( AGE, *N*-アセチルグルコサミンを *N*-アセチルマンノサミンに異性化) とアルドースケトースイソメラーゼ( AKI, グルコース、マンノースおよびフルクトースの相互変換を触媒) と非常に類似していた。活性中心を構成するヒスチジン 2 残基とその近傍の構造はこれらの酵素間で良く保存されており、共通したメカニズムにより反応が触媒されると考えられた。これら 3 つの酵素の基質特異性の違いは、基質結合部位周辺の構造に決定されると予想される。このことを明らかにするには基質結合に関わるアミノ酸残基を置換した変異酵素の解析が必要である。また、これら 3 つの酵素群を含む類縁タンパク質の分子系統樹を作成すると、機能未知タンパク質により構成されるクラスターが見出され、新規異性化酵素の存在が期待された。

また、*Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 由来 CE (CsCE) は、グルコース残基をマンノース残基に異性化するだけでなく、さらにフルクトース残基にまで変換する。本酵素は *R. albus* 由来 CE (RaCE) と配列同一性が 44% と高いにも拘らず、RaCE が触媒しないとされる反応を触媒することは興味深い。活性中心のアミノ酸配列の保存性が高く、*R. marinus* 由来 CE (RmCE) の基質複合体構造からは CsCE によるフルクトース残基への異性化に重要な構造因子を推定できない。生化学的な解析からこの機能的相違を生じる構造因子

の情報を得る必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、CE, AGE, AKI および未知タンパク質により構成されるスーパーファミリー( CE スーパーファミリー) における機能的相違の要因となるタンパク質構造を究明し、酵素機能の合目的改変を可能とすること、未知タンパク質群から新しい特異性を持つ酵素を見出すことで異性化を活用した糖質の効率合成技術の応用範囲を拡大させることを目的とした。

## 3. 研究の方法

## (1) 酵素の調製

各 RmCE 変異酵素の発現プラスミドについては、タカラバイオ社の PrimeSTAR mutagenesis basal kit を用いて調製した RmCE 遺伝子を pET22b に挿入した野生型 RmCE の発現プラスミドをテンプレートとした。変異箇所を含む RmCE 遺伝子全長のシーケンス解析を行い、目的の配列に改変されていること、目的位置以外の延期置換がないことを確認した。各酵素を大腸菌 BL21 (DE3) を用いて生産した。組換え酵素の精製については、これまで熱処理と陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより行っていたが、変異の導入に伴い熱安定性が失われる可能性を考慮して Toyopearl DEAE 650M を用いた陰イオン交換カラムおよび Toyopearl Butyl 650M を用いた疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーの二段階による精製方法に切り替えた。この二段階の精製により、電気泳動的(SDS-PAGE) に単一の酵素試料が得られた。組換え酵素の濃度については、塩酸完全加水分解後のアミノ酸分析により得られた各アミノ酸濃度に基づき決定した。

## (2) 酵素活性の測定

標準的な活性測定では、10 mM Man $\beta$ 1-4Man, 40 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) および酵素からなる反応液 50  $\mu$ L を 60 に 10 分間保持した。これに 0.1 M HCl 20  $\mu$ L を加えて直ちに 100 にて 3 分間加熱することで反応を停止した。この反応により生じた Man $\beta$ 1-4Glc を発表論文 1 に記載の方法により定量した。

反応速度パラメータの測定では、基質濃度を 2.5-25 mM とし、その他の条件を上記と同様とした。

## (3) ラクトースへの反応生成物の解析

300 mM ラクトース, 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0), および酵素からなる反応液を 60 に保持し、適宜反応液を採取して

HPLC により分析した。HPLC では、HILIC pac VG-50E カラムを用い、移動相にアセトニトリル/メタノール/水=75/20/5 を使用した。糖を示差屈折計を用いて検出した。

#### (4) CE スーパーファミリー機能未知タンパク質の解析

各菌株のゲノム DNA を鋳型として PCR により取得した酵素遺伝子を pET23a に組み込み、C 末端 His タグタンパク質として各タンパク質を生産した。各々 Ni キレートカラムを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製し、マンノースや Man $\beta$ 1-4Man などの各種糖類に 37 °C にて適宜反応させ、反応生成物を TLC により分析した。

### 4. 研究成果

#### (1) RmCE における二糖特異性に重要な構造因子の解析

RmCE と基質の複合体構造に基づき、二糖特異性に重要なアミノ酸残基の解析を行った。すなわち、CE における二糖に対する高い選択性に重要なアミノ酸残基として、非還元性末端等残基との相互作用が認められている 2 残基に注目し、これらを Ala に置換した変異酵素を作製した。これらの二糖および単糖に対する活性を評価した。この解析に際し、Man $\beta$ 1-4Man からの反応生成物である Man $\beta$ 1-4Glc の加リン酸分解とグルコースの比色定量反応を組合せた比色定量法による Man $\beta$ 1-4Glc の定量法を開発し、HPLC による定量に依存していた活性測定法を迅速化した。Man $\beta$ 1-4Man に対する  $k_{cat}/K_m$  値は、野生型酵素の  $26.8 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$  に対して、0.0608-17.1% に低下し、アミノ酸置換による著しい低下が見られた。一方、マンノースに対する  $k_{cat}/K_m$  値は、野生型酵素の 5.51-88.1% と、Man $\beta$ 1-4Man に対する活性低下に比してアミノ酸置換に伴う活性の低下が穏やかであった。すなわち、いずれの変異酵素も野生型酵素より二糖選択性が低かった。このことから、注目した二残基がいずれも RmCE における高い二糖選択性に重要な構造因子であることを生化学的に証明した。

#### (2) RmCE と AGE の基質認識の相違を導くアミノ酸残基の解析

RmCE と構造類似性を示す酵素群には、N-アセチルグルコサミンをエピメリ化する酵素 AGE が存在する。AGE と RmCE の構造比較より、基質 (RmCE では還元末端側糖残基) の 2OH 基周辺に存在するアミノ酸残基に相違が見られることが判明した。RmCE において基質の還元末端糖残基の 2OH 基の周辺に位置する 3 残基に注目し、これらがアセトアミド基との結合において立体障害となり得ると推定した。そこでこれらをそれぞれ Ala に置換した変異酵素を作製した。いずれの変

異酵素においても活性の著しい低下が見られ、Man $\beta$ 1-4Man に対する  $k_{cat}/K_m$  値はそれぞれ野生型酵素の 0.23%、0.028% および 0.054% であった。これらの変異酵素について、Glc $\beta$ 1-4GlcNAc に対する作用を検討したが、エピメラーゼ活性は認められず、単アミノ酸置換による基質特異性の改変はできなかった。これらのシングル変異による活性の低下が著しかったことから、多重変異体については検討しなかった。

#### (3) RmCE における反応特異性に重要な構造の解析

CsCE はグルコース残基とマンノース残基の間のエピメリ化だけでなく、フルクトース残基への異性化も触媒する。このような異性化活性については、幾つかの酵素で報告されているものの、RmCE や RaCE などの酵素では検討されていない。そこで RmCE の野生型酵素を用いて高酵素濃度にてラクトースに作用させたところ、イソメラーゼ生成物であるラクチュロースの生成が認められた。この酵素濃度は、従来のエピメラーゼ活性を解析する酵素濃度の 1000 倍であり、過剰な酵素濃度では RmCE もイソメラーゼ反応を触媒することが判明した。

CsCE におけるイソメラーゼ活性とエピメラーゼ活性の反応速度の詳細な比較は行われていなかったため、CsCE の大腸菌組換え酵素を用いてこれらの活性を比較した。その結果、CsCE についても RmCE よりイソメラーゼ活性が高いものの、酵素濃度を過剰としないとイソメラーゼ反応を触媒しないことが明らかになった。すなわち、RmCE においてエピメラーゼ活性のみが見られる酵素濃度においては、CsCE もエピメラーゼ反応のみを触媒した。イソメラーゼ活性については、他の CE においても高酵素濃度とすることで触媒することを確認した。このことから、CsCE が触媒するイソメラーゼ反応は、どの CE においても触媒し得る副反応であることが明らかになった。

この間、幸運にも CsCE の結晶構造を決定することに成功した。RmCE との構造比較を行うと、CsCE には基質との結合により安定化するループ構造が存在することが明らかになった。そこで CsCE において当該ループに位置する 2 残基をそれぞれ RmCE 型に置換した変異酵素を作製し、イソメラーゼ活性とエピメラーゼ活性を比較した。この変異酵素においてラクチュロースからのアルドース (エピラクトースおよびラクトース) 生成量の増加が見られ、当該ループがこれらの反応特異性に影響する構造であることが明らかになった。

#### (4) CE スーパーファミリーにおける機能未知タンパク質の解析

*Marinomonas mediterranea* や *Salinispora tropica* などのゲノム既読株には CE スーパー

ファミリーメンバーと低いながらも配列同一性を示す一群の機能未知タンパク質が存在する。これらの機能未知タンパク質について、大腸菌により組換えタンパク質を生産し、各種糖質に作用させた。その結果、単糖マンノースに対して活性を持つ異性化酵素を見出すことに成功した。

## 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 12件)

Wataru Saburi, Functions, structures and applications of cellobiose 2-epimerase and glycoside hydrolase family 130 mannoside phosphorylases., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, in press, 査読あり, DOI 10.1080/09168451.2016.1166934.

Yuxin Ye, Wataru Saburi, Rei Odaka, Koji Kato, Naofumi Sakurai, Keisuke Komoda, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka, Haruhide Mori, and Min Yao, Structural insights into the difference in substrate recognition of two mannoside phosphorylase from two GH130 subfamilies. *FEBS Letters*, **590**, 828-837 (2016) 査読あり, DOI 10.1002/1873-3468.12105.

Yuki Murakami, Teruyo Ojima-Kato, Wataru Saburi, Haruhide Mori, Hirokazu Matsui, Soichi Tanabe, and Takuya Suzuki, Supplemental epilactose prevents metabolic disorders through uncoupling protein-1 induction in the skeletal muscle of mice fed high-fat diets, *British Journal of Nutrition*, **114**, 1774-1883 (2015), 査読あり, DOI 10.1017/S0007114515003505.

Nongluck Jaito, Wataru Saburi, Rei Odaka, Yusuke Kido, Ken Hamura, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka, Hirokazu Matsui, and Haruhide Mori, Characterization of a thermophilic 4-O-β-D-mannosyl-D-glucose phosphorylase from *Rhodothermus marinus*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **78**, 263-270 (2014), 査読あり, DOI 10.1080/09168451.2014.882760.

Nongluck Jaito, Wataru Saburi, Hirohiko Muto, Hirokazu Matsui, and Haruhide Mori, Colorimetric quantification of β-(1→4)-mannobiose and 4-O-β-D-mannosyl-D-glucose, *Journal of Applied Glycoscience*, **4**, 117-119 (2014), 査読あり, DOI 10.5458/jagjag.JAG-2014\_007. (筆頭

著者扱い)

[学会発表](計 17件)

塩田 咲耶子, 尾高 伶, 佐分利 亘, イエウキン, 薦田 圭介, 加藤 公児, 西本 完, 北岡 本光, 姚 閔, 森 春英: *Ruminococcus albus* 由来 4-O-β-D-マンノシル-D-グルコースホスホリラーゼのサブサイト+1に保存される Arg92 の基質結合への関与, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2016 年 3 月 30 日.

武藤 洋彦, 佐分利 亘, 森 春英: 乳中ラクトースのエピラクトースへの直接変換を志向した各種セロピオース 2-エピメラーゼの機能評価, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2016 年 3 月 30 日.

坂井 未悠, 佐分利 亘, 森 春英: 嫌気性細菌によるエピラクトース代謝の多様性, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2016 年 3 月 28 日.

佐分利 亘: オリゴ糖異性化酵素および関連酵素の分子基盤と応用, 平成 27 年度公益社団法人 日本農芸化学会 北海道支部第 2 回講演会, 北海道大学(北海道札幌市) 2015 年 11 月 14 日.

尾高 伶, 佐分利 亘, Ye Yuxin, 薦田 圭介, 加藤 公児, 西本 完, 北岡 本光, 姚 閔, 森 春英: *Ruminococcus albus* 由来 4-O-β-D-mannosyl-D-glucose phosphorylase RaMP1 の無機リン酸に対するホモトロピック相互作用, 日本応用糖質科学会平成 27 年度大会, 奈良春日野国際フォーラム(奈良県奈良市), 2015 年 9 月 16 日.

Wataru Saburi, Takaaki Fujiwara, Nongluck Jaito, Hirohiko Muto, Hirokazu Matsui, Min Yao, and Haruhide Mori, Molecular basis for the epimerization of oligosaccharides by cellobiose 2-epimerase, 11<sup>th</sup> Carbohydrate Bioengineering Meeting, Dipoli congress centre (Espoo, Finland) 2015 年 5 月 10-13 日.

Nongluck Jaito, Wataru Saburi, Yuka Tanaka, and Haruhide Mori, Biochemical characterization of a novel aldose-ketose isomerase, mannose isomerase from *Marinomonas mediterranea*, 11<sup>th</sup> Carbohydrate Bioengineering Meeting, Dipoli congress centre (Espoo, Finland) 2015 年 5 月 10-13 日.

Nongluck Jaito, Wataru Saburi, Hirohiko Muto, Takaaki Fujiwara, Min Yao, and Haruhide Mori: Characterization of the recombinant cellobiose 2-epimerase from *Rhodothermus marinus* and site-directed mutagenesis of the catalytic residues, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学(岡山県岡山市), 2015 年 3 月 27 日.

武藤 洋彦, 佐分利 亘, 藤原 孝彰, 姚 閔, 森 春英: *Rhodothermus marinus* JCM9785 由来セロピオース 2-エピメラーゼの基質結合部位周辺アミノ酸残基の機能解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学(岡山県岡山市), 2015 年 3 月 27 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

北海道大学大学院農学研究院生物化学研究室 <http://www.agr.hokudai.ac.jp/biochem/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐分利 亘 (SABURI, Wataru)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号: 00598089

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし