

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：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850062

研究課題名(和文)新規ホスホリラーゼの網羅的探索を基軸とする機能性オリゴ糖ライブラリーの拡充

研究課題名(英文) Screening of carbohydrate phosphorylases enabling practical synthesis of oligosaccharides

研究代表者

中井 博之(Nakai, Hiroyuki)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00400002

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)：生体内糖質代謝に関与する糖質加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)によるオリゴ糖合成の収率は高く、産業上有用な酵素になり得る。しかしながら、既知のホスホリラーゼは他の糖質関連酵素に比べて報告例が少なく、今後生産可能なオリゴ糖のバリエーション拡大には、新たなホスホリラーゼの発見が必須であった。そこで glycoside Hydrolase Family 130に属するホスホリラーゼ様タンパク質の機能解析を行った結果、 α -1,2-マンノオリゴ糖に特異性を示す、これまで報告例のない新規なホスホリラーゼを発見することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Phosphorylases are exolytic enzymes catalyzing phosphorolysis of particular glycosides to produce sugar 1-phosphate with strict substrate specificity. The reaction is reversible, enabling the practical synthesis of oligosaccharides. However, there is little variation among phosphorylases and this limits their utilization for the production of oligosaccharides. Therefore, it would be beneficial to identify phosphorylases with previously unreported substrate specificities. In this study, two phosphorylase homologues belonging to glycoside hydrolase family 130 are characterized to be novel phosphorylases showing distinct chain-length specificities toward α -1,2-oligomannan.

研究分野：応用生物化学

キーワード：酵素 オリゴ糖

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖質は生物の生命維持に必要不可欠であり、生命現象の根幹に関わる重要な機能を果たす。その糖質の生体内での合成および分解は酵素反応により行われている。糖質グリコシド結合の消長に關与する酵素は、水的作用により分解生成物を得る加水分解酵素、リン酸ジエステル結合の高エネルギー化により糖質合成を触媒する糖核酸エステル転移酵素、無機リン酸存在下での糖 1-リン酸生産を触媒する加リン酸分解酵素の 3 種類に分類される。

(2) 現在までに多種多様な加水分解酵素および糖核酸エステル転移酵素が見出され、その生物学的意義から詳細な機能・構造解析が進められている。一方で、加リン酸分解酵素の報告例は著しく少なく、他の糖質関連酵素に比べて知見が乏しい。近年ゲノム全塩基配列の解読を目標としたゲノムプロジェクトが様々な生物種を対象に実施されており、今後新たな機能を有する加リン酸分解酵素の発見の可能性は極めて高い。新規糖質関連酵素の発見および機能解明は、生体内での糖質代謝機構を理解する上で学術的に非常に重要であると同時に、食品産業的にも糖質関連酵素群が担う役割は大きい。特に、これまで加水分解酵素については高分子多糖の糖化を目的に幅広く工業的に利用されている。一方で高分子多糖の加水分解では生成物が複数生じることが多く、単一の糖質の大量調製法としては不向きであり、オリゴ糖をはじめとする種々の糖質の選択的な大量調製法の確立が望まれている。そこで糖核酸エステル転移酵素の糖質・複合糖鎖合成への利用が期待されるが、糖供与体として使用する糖ヌクレオチドのコストおよび本酵素群の安定性の問題から実用的な利用には至っていないのが現状である。またオリゴ糖調製の手法として有機合成法も有用であるが、保護・脱保護を含む多段の反応段階を経る必要がある本手法は、コストおよび安全性の両面から食品用途へ応用することは困難である。

2. 研究の目的

上記の問題を解決するために、本研究では加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)のオリゴ糖合成反応に注目した。ホスホリラーゼは、無機リン酸存在下で糖 1-リン酸を生産(正反応)する酵素として広く認知されているが、本反応は可逆反応であり、糖供与体(糖 1-リン酸)と糖受容体を出発材料とした際、オリゴ糖合成反応(逆反応)も効率良く触媒する。そこで今回、生体内糖質代謝を理解する上で生物学的意義から学術的に重要な新規ホスホリラーゼを探索し、得られたホスホリラーゼを活用して新規オリゴ糖の合成系を確立する。

3. 研究の方法

(1) 既知のホスホリラーゼとのアミノ酸レベルでの相同性評価により、新たな基質特異性を有すると予想されるホスホリラーゼを探索した。

(2) 機能未知ホスホリラーゼ遺伝子を有する生物種のゲノム DNA から目的遺伝子を PCR 法により単離し、大腸菌による各種組換え酵素の異種宿主発現系を確立した。

(3) 大量調製した組換え酵素を精製し、酵素化学的諸性質を詳細に解析した。

(4) 糖供与体(糖 1-リン酸)と種々の糖受容体を出発材料として、新規ホスホリラーゼの糖受容体特異性をオリゴ糖合成反応により調査した。得られたオリゴ糖は高速液体クロマトグラフィーを用いて精製し、二次元核磁気共鳴分光法(NMR)およびエレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)にて構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) Glycoside hydrolase family130 に属する既知のホスホリラーゼのアミノ酸配列を基に、*Thermoanaerobacter sp.* X-514 のゲノム上に、機能性未知のホスホリラーゼホモログ(Teth514_1788 および Teth514_1789)をコードする遺伝子の存在を見出した。既知 GH130 ホスホリラーゼとの相同性は 20~28% 程度と比較的低く、系統樹においても別のカテゴリーに分類されるものと推察された。また、いずれもシグナルペプチド配列が確認されず、既知ホスホリラーゼと同様に菌体内酵素であると予測された。

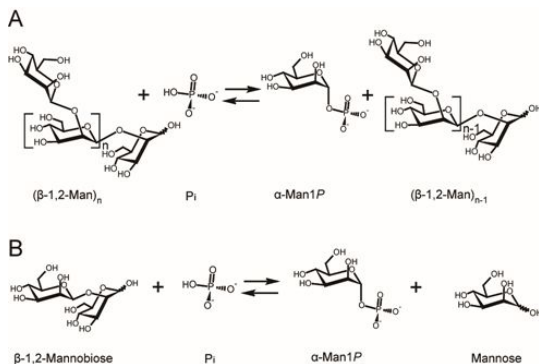
(2) Teth514_1788 および Teth514_1789 の発現プラスミドは、それぞれ目的遺伝子を PCR 法にて増幅後、pET-24a ベクターに連結することで構築した。これら発現プラスミドを用いて形質転換した大腸菌 Rosetta2(DE3)により当該組換え酵素をそれぞれ大量調製した後、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーに供することで電気泳動的に均一な精製酵素標品を得た。Teth514_1788 および Teth514_1789 の分子質量は、SDS-PAGE の結果いずれも約 34 kDa と推定されたが、ゲル濾過クロマトグラフィーからは前者が 50 kDa、後者が 27 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。

(3) α -マンノース 1-リン酸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高いオリゴ糖合成活性を示した。Teth514_1789 および Teth514_1789 をそれぞれ 50 mM α -マンノース 1-リン酸および 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、ESI-MS および NMR 構造解析を行なった結果、Teth514_1788 は重合度 2~5 の α -1,2-オリゴマンナンを生成するのに対し、Teth514_1789 は α -1,2-マンノピオースと α -1,2-マンノトリオースのみ生成し、4 糖以上の α -1,2-オリゴマンナンは確認されないことが明らかになった。

(4) マンノース、 α -1,2-マンノピオースおよび α -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、 α -1,2-マンノピオースおよび α -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、 α -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 α -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 α -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新規な α -1,2-マンノシドホスホリラーゼであると推察された。

(5) 両酵素における各種 α -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 α -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 α -1,2-オリゴマンナンホスホリラーゼ (図 A)、後者を α -1,2-マンノピオースホスホリラーゼ (図 B) と命名した。



Teth514_1788 のような、オリゴグルカンに作用するホスホリラーゼは数種報告されているが、Teth514_1789 のように三糖までを認識するホスホリラーゼは今回が初めての報告である。

(6) 両酵素遺伝子近傍に存在する遺伝子について、*in silico* 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 -マンノシドホスホリラーゼ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、 α -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. X514 は α -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。すなわち、 α -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によって菌体内に輸送され、鎖長特異性の異なる α -1,2-オリゴマンナンホスホリラーゼおよび α -1,2-マンノピオースホスホリラーゼによって効率良くマンノースと α -マンノース 1-リン酸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 -マンノース 1-リン酸においては、従来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ー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をコードすると推定される遺伝子が存在することから、 α -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 -マンノース 1-リン酸を 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。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Nihira T., Chiku K., Suzuki E., Nishimoto M., Fushinobu S., Kitaoka M., Ohtsubo K., Nakai H. An inverting α -1,2-mannosidase belonging to glycoside hydrolase family 130 from *Dyadobacter fermentans*. *FEBS Letters* (2015) 589, 3604-3610. (査読有)
DOI: 10.1016/j.febslet.2015.10.008

Chiku K., Nihira T., Suzuki E., Nishimoto M., Kitaoka M., Ohtsubo K., Nakai H. Discovery of two α -1,2-mannoside phosphorylases showing different chain-length

specificities from *Thermoanaerobacter* sp. X-514. PLOS ONE (2014) 9, e114882. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0114882

Nihira T., Miyajima F., Nishimoto M., Kitaoka M., Ohtsubo K., Nakai H. One pot enzymatic production of nigerose from common sugar resources employing nigerose phosphorylase. Journal of Applied Glycoscience (2014) 61, 75-80. (査読有)
DOI: 10.5458/jag.jag.JAG-2013_012

[学会発表](計33件)

Nakai H., Nihira T., Chiku K., Suzuki E., Nishimoto M., Kitaoka M., Ohtsubo K. Novel GH130 -mannoside phosphorylases. 11th Carbohydrate Bioengineering meeting (Alto University, Espoo, Finland, 2015.5.10-13)

杉本直久、伊藤紗織、佐藤佳太、仁平高則、大坪研一、北岡本光、原崇、中井博之、マウス脾臓細胞のサイトカイン産生に及ぼすニゲロースの影響、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, 2015.9.16-18)

仁平高則、知久和寛、鈴木絵里香、西本完、北岡本光、大坪研一、中井博之、-1,2-マンノシドホスホリラーゼ、第34回日本糖質科学会(東京大学安田講堂, 東京, 2015.7.31-8.2)

仁平高則、齊藤由華、知久和寛、北岡本光、大坪研一、中井博之、*Bacillus selenitireducens* MLS10由来カリウムイオン依存性トレハロースホスホリラーゼ、日本農芸化学会2015年度大会(岡山大学津島キャンパス, 岡山, 2015.3.26-29)

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(朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター, 新潟, 2014.9.24-26)

仁平高則、知久和寛、鈴木絵里香、西本完、北岡本光、伏信進矢、中井博之、大坪研一、新規1,2- α -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(朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター, 新潟, 2014.9.24-26)

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-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(朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター, 新潟, 2014.9.24-26)

齊藤由華、仁平高則、西本完、北岡本光、中井博之、大坪研一、新規ホスホリラーゼを用いたセロビオン酸の合成、日本応用糖質科学会平成26年度大会(朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター, 新潟, 2014.9.24-26)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 博之 (NAKAI, Hiroyuki)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号: 00400002