

## 糖質代謝酵素の分子機構の解明と有用糖質の効率合成への応用展開



北海道大学大学院農学研究院 助教 佐分利 亘

## はじめに

糖質は、構成単糖、結合様式、重合度、分岐などにより多様であり、この代謝に関連する酵素も多岐にわたる。これらの酵素に関する研究は、糖質代謝やタンパク質の機能・構造への理解を深めるだけでなく、食品、医薬など身近なモノづくりに広く応用される。近年では健康増進作用を持つ機能性糖質の開発や再生可能エネルギーの生産への応用なども期待されており、糖質代謝酵素に関する研究の重要性はますます高まっている。我々は微生物に由来する糖質代謝酵素を中心に機能・構造解析を進め、有用糖質の効率合成へと研究を展開してきた。以下にこれまでの研究成果の概要を紹介する。

## 1. セロビオース 2-エピメラーゼ (CE) の分子解析とエピラクトースの効率合成への応用

CE は、セロビオース (Glc $\beta$ 1-4Glc) の還元末端グルコース残基をマンノース残基に異性化し、4-O- $\beta$ -グルコシルマンノース (Glc $\beta$ 1-4Man) を生成する酵素としてルーメン細菌 *Ruminococcus albus* に見出された。本酵素は、数ある糖質異性化酵素の中で唯一オリゴ糖のエピメリ化を触媒する。セロビオース以外にラクトース (Gal $\beta$ 1-4Glc) や  $\beta$ 1-4-マンノビオース (Man $\beta$ 1-4Man) などにも作用することから、CE は、 $\beta$ 1-4結合からなる基質の還元末端グルコース残基もしくはマンノース残基に作用する酵素である。

我々は *R. albus* 由来 CE のアミノ酸配列を基に CE 様タンパク質の機能を解析し、CE が *Bacteroides fragilis* などの嫌気性腸内細菌から *Rhodothermus marinus* などの好気性好熱性細菌に至る様々な微生物に分布することを明らかにした。これらの酵素のうち *R. albus* および *R. marinus* 由来 CE の X線結晶構造解析を行い、立体構造を明らかにした。*R. marinus* 由来 CE とセロビイトル (競争阻害剤) の複合体では、セロビイトルは反応中間体と推定される *cis*-エンジオール中間体様のコンホメーションで酵素に結合していた。この構造に基づき、グルコース残基からマンノース残基への反応において His390 が一般塩基触媒、His259 が一般酸触媒として還元末端糖残基の 2位プロトンの授受を行う機構が考えられた (図1)。

CE とラクトースの反応において 30% 程の収率で得られるエピラクトース (Gal $\beta$ 1-4Man) は、加熱牛乳中に微量存在が知られるオリゴ糖である。我々は固定化 CE による連続合成法や CE 反応液からの効率的精製法を整備し、kg スケールでの高純度エピラクトースの調製を可能とした。合成したエピラクトースを用いた生理機能試験により、エピラクトースが優れた腸内細菌叢改善作用やミネラル吸収促進効果を持つ機能性糖質であることが明らかになった。

## 2. 糖質の異性化と加リン酸分解による新規なヘミセルロース代謝経路の解明

*B. fragilis* において、CE 遺伝子が  $\beta$ -マンナンを加水分解す

る  $\beta$ -マンナーゼと 4-O- $\beta$ -マンノシルグルコース (Man $\beta$ 1-4Glc) を特異的に加リン酸分解する 4-O- $\beta$ -マンノシルグルコースホスホリラーゼ (MGP) をコードする遺伝子とクラスターを形成することが見出された。このことから  $\beta$ -マンナーゼによる加水分解後に CE による  $\beta$ 1-4-マンノビオースの異性化と MGP による Man $\beta$ 1-4Glc の加リン酸分解が行われる  $\beta$ -マンナン代謝経路が推定された。*R. marinus* や *Cellvibrio vulgaris* などの好気性 CE 生産菌にも MGP の存在は確認され、この代謝経路は嫌気性細菌に限定されないと考えられる。*R. albus* には、MGP と配列同一性が高い RaMP1 と低い RaMP2 が存在する。RaMP1 は MGP であったが、RaMP2 は Man $\beta$ 1-4Glc よりも 3糖以上の  $\beta$ 1-4-マンノオリゴ糖に高い活性を持つマンノオリゴ糖ホスホリラーゼであった。RaMP2 の  $\beta$ 1-4-マンノビオースに対する活性は低く、本酵素は  $\beta$ -マンナンの代謝において長鎖マンノオリゴ糖を加リン酸分解して  $\beta$ 1-4-マンノビオースを生じ、CE による異性化につなぐ機能を担うと考えられた (図2)。

3. ルーメン細菌 *R. albus* のセロオリゴ糖代謝酵素の分子解析とオリゴ糖の効率合成

ルーメンの主要セルロース分解菌である *R. albus* では、ホスホリラーゼによるセロオリゴ糖の加リン酸分解が主要な分解経路と推定されていたが、この生化学的機能は未知であった。そこで *R. albus* ゲノムに存在する 2つの推定セロオリゴ糖ホスホリラーゼ遺伝子 Rumal\_0187 と Rumal\_2403 にコードされる酵素の機能を解析し、Rumal\_0187 はセロビオースホスホリラーゼ (CBP)、Rumal\_2403 は 3糖以上のセロオリゴ糖を加リン酸分解するセロデキストリンホスホリラーゼ (CDP) であることを明らかにした。*R. albus* の CDP は、逆反応で  $\beta$ 1-4-マンノビオースを受容体としたことから、グルコマンナンなどの複合多糖の分解への寄与が推定された。CBP に関する研究では、還元末端 Glc 残基結合サイト (サブサイト+1) へのアミノ酸置換の導入 (Typ648 の Phe および Val への置換) によりサブサ

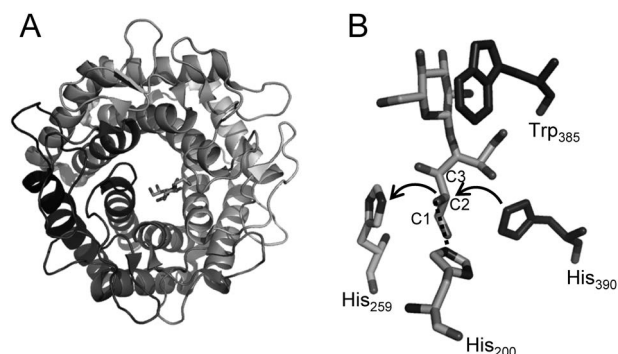


図1. *R. marinus* 由来 CE の立体構造と推定反応機構  
A, セロビイトルとの複合体の全体構造; B, 活性中心の拡大図。

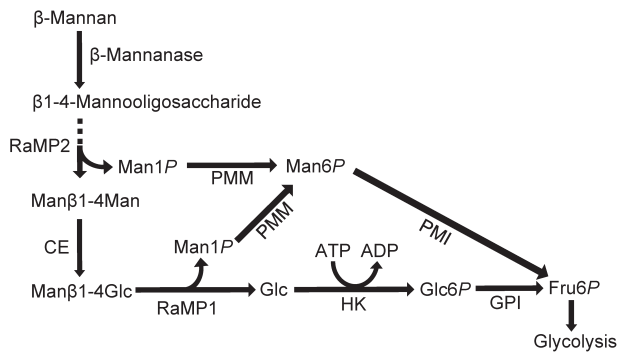


図2. *R. albus*における $\beta$ -マンナン推定代謝経路  
PMM, ホスホマンノムターゼ; PMI, ホスホマンノイソメラーゼ; HK, ヘキソキナーゼ; GPI, グルコースホスフェートイソメラーゼ.

イト+1におけるマンノースおよび*N*-アセチルグルコサミンへの特異性を向上させ、逆反応による4-*O*- $\beta$ -グルコシルマンノースおよび4-*O*- $\beta$ -グルコシル*N*-アセチルグルコサミンの合成を高効率化した。

#### 4. GHファミリー13 (GH13) に属す糖質加水分解酵素 (GH) の構造と機能に関する研究

アミノ酸配列に基づくGHの分類の中でGH13は $\alpha$ -アミラーゼを中心とした酵素群であり、多様な酵素を含む。我々はGH13酵素の多様な機能を支える構造因子の解析とGH13酵素を利用したオリゴ糖や配糖体の効率合成法の開発を進めてきた。

$\alpha$ 1-6結合からなるイソマルトオリゴ糖やデキストランの非還元性末端から加水分解によりグルコースを遊離するデキストラングルコシダーゼ (DG) をモデルとし、基質の鎖長や結合様式への特異性を導く構造因子を解析した。DGの長鎖基質に対する高活性には、DGに特徴的な短い触媒ドメインの $\beta \rightarrow \alpha$ ループ4とサブサイト+1と+2の間に位置するTrp238が重要なことを明らかにし、 $\alpha$ 1-6結合への高い特異性にはサブサイト+1のVal195, Lys275およびGlu371が重要なことを示した。求核触媒残基のCOO<sup>-</sup>をSOO<sup>-</sup>に置換 (Asp194をCysに置換後、酸化。SOO<sup>-</sup>型酵素) することで糖転移活性が著しく向上することを見出し、糖転移活性を向上させる新しい手法として提案した (図3)。

配糖体合成に有用な酵素を得るため、マルトースからグリセロールへのグルコシル基転移活性を指標に探索し、海洋性細菌*Halomonas* sp. H11よりGH13に属す $\alpha$ -グルコシダーゼ (HaG) を見出した。HaGのグリセロールとマルトースへの反応では、3糖以上のオリゴ糖が合成されず、 $\alpha$ -グルコシルグリセロールが効率的に合成された。基質特異性の解析の結果、HaGは2糖に対して厳密な鎖長特異性を持つことが明らかになり、この特異性により3糖が合成されないと考えられた。HaGの $\beta \rightarrow \alpha$ ループ4は他の $\alpha$ -グルコシダーゼのものよりも長く、この長いループによる立体障害が高い2糖選択性を導くと考えられた。HaGは、他起源酵素では配糖化できないショウガの生理機能成分6-ジゲロールの配糖化も触媒した。

洗剤添加剤として有用な耐熱性耐アルカリ性液化型 $\alpha$ -アミラーゼをスクリーニングし、土壌細菌*Bacillus* sp. AAH-31よ

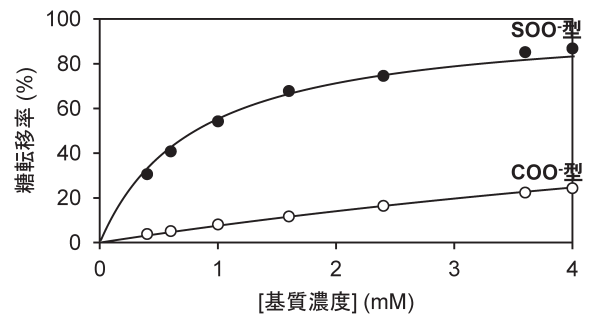


図3. 求核触媒残基の酸化型システインへの置換によるDGの糖転移活性の増強  
SOO<sup>-</sup>型酵素と親酵素の糖転移率の比較. 糖転移率はアグリコン遊離速度に対する糖転移速度の比率を示す。

りAmyLを見出した。本酵素はpH 8~11のアルカリ条件下で高い活性を示し、アルカリ性 (pH 10)、高温 (60°C) 条件下で安定であった。その上、各種界面活性剤やキレート剤存在下でも安定であり、洗剤添加剤として有用な性質を備えていた。配列解析により本酵素はGH13に分類され、プルランを加水分解するネオプルランナーゼ様の触媒ドメイン、N末端側の澱粉結合ドメインおよび2つの機能未知ドメインから成る新規なドメイン構成を持つことが明らかになった。AmyLの触媒部位周辺のアミノ酸残基を最適化し、澱粉分解活性が野生型酵素の340%に向上した変異酵素 (Y426S/K549M) を得た。

#### 5. $\alpha$ -グルコシダーゼとシクロデキストリン合成酵素 (CGTase) を利用した分岐グルカンの合成

糖転移により $\alpha$ 1-6結合や $\alpha$ 1-3結合を生成する $\alpha$ -グルコシダーゼとCGTaseを枝切り酵素存在下で液化澱粉に作用させると、 $\alpha$ 1-4グルカンの非還元性末端に $\alpha$ 1-6結合や $\alpha$ 1-3結合によりグルコシル基が結合した分岐グルカンを効率的に合成できることを見出した。得られたグルカンはオリゴ糖より高分子量のメガロ糖を多く含むが、同程度の鎖長分布の直鎖 $\alpha$ 1-4グルカンに見られる老化性を全く示さず、食品素材として有用と考えられた。

謝辞 本研究は、北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門 生物化学研究室、同 分子酵素学研究室、ならびに日本食品化工株式会社研究所において行われたものです。研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました、松井博和先生、木村淳夫先生、森春英先生、奥山正幸先生、松浦英幸先生 (北海道大学)、高田正保博士、山本健博士 (日本食品化工株式会社)、今井亮三先生 (北海道農業研究センター) に厚く御礼申し上げます。酵素の構造解析では姚関先生、加藤公児先生、薦田圭介先生、藤原孝彰博士、小林桃子氏 (北海道大学)、本同宏成先生 (広島大学)、酵素の探索・機能解析では加藤晃代博士 (名古屋大学)、森本奈保喜博士 (アデカ)、北岡本光博士、西本完博士 (食品総合研究所) に多大なるご支援を賜りました。深く感謝申し上げます。また、共に研究を行っていただきました生物化学研究室の卒業生、在校生の皆様様に心より感謝いたします。最後に、本奨励賞にご推薦いただきました、北海道大学大学院農学研究院、原博先生に厚く御礼申し上げます。