

# 新規な酵素群 $\beta$ -1, 2-グルカン関連酵素の機能と構造

東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 中島 将博



## 【略歴】

- 2000年3月 東京大学農学部卒業
- 2006年7月 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻博士課程修了  
博士（農学）取得
- 2006年7月 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所  
農研機構特別研究員
- 2010年4月 岩手生物工学研究センター 研究員
- 2012年4月 東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 助教
- 2017年4月 東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 講師
- 2020年4月 東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 准教授

## はじめに

糖鎖はその構造が非常に多様性に富んでおり、その生体内での役割も多岐に渡る。特に近年では、様々な難分解性糖鎖で腸内環境改善効果が示されていることから糖鎖の潜在的な利用可能性が増している。現在でも様々な糖鎖が上市されているが、糖鎖構造の複雑さを考慮すると利用されている糖鎖の種類は限られていると言える。しかし、天然から得られる糖鎖の多くは生成量が少ない、不均一などの理由により現実的に調製困難であり、機能探索を行う糖鎖の種類を増やすことは難しい。

$\beta$ -1, 2-グルカン<sup>1</sup>はグルコースから構成される糖鎖にも関わらず大量調製が難しい糖鎖である。天然では主に環状糖として存在し、根粒菌においてマメ科植物への共生因子として機能するなどの報告があるが、その物性や食品素材としての性質という利用の観点からの有用機能の探索例はほとんどない。また、 $\beta$ -1, 2-グルカンはジクザグ状のユニークな構造と推測される点、極めて高い水溶性を持つ点でセルロースやラミナリンとは全く異なっており、 $\beta$ -1, 2-グルカンの新規な物性、生理機能が期待される。しかし、筆者の研究開始まで遺伝子同定された  $\beta$ -1, 2-グルカン分解酵素は皆無であった。そのため、 $\beta$ -1, 2-グルカン調製を行うにあたって利用できる酵素がなく、そのような酵素の探索と解析から始める必要があった。

## 糖質加リン酸分解酵素ホモログの機能探索

糖質加リン酸分解酵素は糖鎖と無機リン酸から糖 1 リン酸を生成する酵素である。この酵素の反応は可逆的であるため、逆反応を用いた糖鎖合成が容易である。そこで、糖質加リン酸分解酵素を含むファミリーの機能未知グループのホモログについて機能探索を行った。その結果、このホモログがグルコースとグルコース-1-リン酸 (G1P) から  $\beta$ -1, 2-グルカン<sup>1</sup>を合成できることを見出し、最終的には三糖以上の  $\beta$ -1, 2-グルコオリゴ糖 ( $Sop_n$ s, n は重合度) を加リン酸分解する新規酵素 (SOGP) と同定した<sup>1</sup>。また、SOGP の X 線結晶構造解析を行い、この酵素において鎖長特異性が生じる構造的要因を明らかにした<sup>2</sup> (図1)。

## $\beta$ -1, 2-グルカン大量調製法の確立

糖質加リン酸分解酵素を用いた糖鎖合成において、実用的な観点からは糖 1 リン酸は高価である。そこで、スクロースホスホリラーゼによるスクロースからの G1P 供給系を SOGP の合成反応と組み合わせることで、G1P を原料として用いないワンポットの

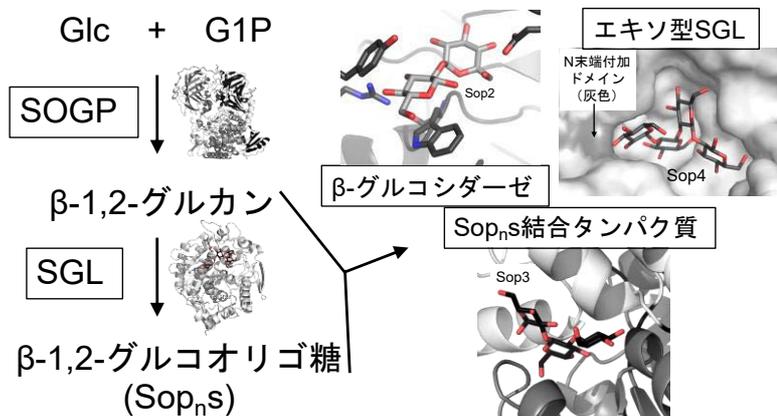


図1. これまでに明らかにした $\beta$ -1,2-グルカン関連酵素と構造

系を確立した。グルコースとスクロースのみを出発糖原料として2Lスケールでの $\beta$ -1,2-グルカン合成を行い、最終的に100グラム以上の精製 $\beta$ -1,2-グルカンの調製に成功した<sup>3</sup>。

### $\beta$ -1,2-グルカナナーゼ遺伝子の同定

$\beta$ -1,2-グルカナナーゼ(SGL)は $\beta$ -1,2-グルカンの分解により $\text{Sop}_{n,s}$ を生成する酵素であるが、原核生物における報告は*Chitinophaga arvensicola*がSGL活性を有することのみであった。そこで、大量合成した $\beta$ -1,2-グルカンを炭素源として*C. arvensicola*を培養し、その細胞抽出画分からSGLの精製を行い、最終的にゲノム既知の近縁種である*Chitinophaga pinensis*より候補タンパク質Cpin6279を得た。組換えCpin6279が $\beta$ -1,2-グルカンに対して顕著な分解活性を示し、二糖から五糖までの $\text{Sop}_{n,s}$ を最終産物として生成したことからCpin6279をSGLと同定した。Cpin6279は新規アミノ酸配列を有していたため、新規の糖質加水分解酵素ファミリー、GH144と認定された。さらに、このファミリーで初めて基質との複合体構造の取得に成功し、基質認識機構を明らかにした<sup>4</sup>(図1)。これにより $\beta$ -1,2-グルカンからの $\text{Sop}_{n,s}$ 大量調製が可能となり、また、高い分解効率、異なる分解様式をもつSGL探索のための構造情報基盤も得られたと言える。さらに真核生物からも*sg1*遺伝子を同定し、新規ファミリー(GH162)が創設された<sup>5</sup>。変異体や基質誘導体を用いた基質の分解様式の解析により、この酵素が極めてユニークな反応機構を有することも明らかにしている。

### $\beta$ -1,2-グルカン関連酵素群の探索

SOGPによる $\beta$ -1,2-グルカン合成とSGLによる $\text{Sop}_{n,s}$ 調製が可能になったことにより $\beta$ -1,2-グルカン関連酵素群の探索が容易になった。この基質を用いてSOGPとSGLの遺伝子クラスター上に存在する $\beta$ -グルコシダーゼ、ABCトランスポーターの糖結合サブユニットの機能解析を行い、これらが $\text{Sop}_{n,s}$ を基質として好むことを明らかにし、これらの基質特異性を生じる立体構造的な要因も明らかにした<sup>6-8</sup>(図1)。また、GH144酵素の探索により、 $\beta$ -1,2-グルカンの非還元末端側からソホロースを遊離する新規のエキソ型酵素を発見した。N末端付加ドメインが基質クレフトの片側の端を塞ぐことが酵素をエキソ型にする要因であることを立体構造解析により明らかにした<sup>9</sup>(図1)。

<sup>1</sup>Nakajima et al. *PLoS ONE* 2014; 9(3): e92353.

<sup>2</sup>Nakajima et al. *Scientific reports* 2017; 7: 42671.

<sup>3</sup>Abe et al. *Journal of Applied Glycoscience* 2015; 62(2): 47-52.

<sup>4</sup>Abe et al. *The Journal of Biological Chemistry* 2017; 292(18): 7487-7506.

<sup>5</sup>Tanaka et al. *The Journal of Biological Chemistry* 2017; 294(19): 7942-7965.

<sup>6</sup>Nakajima et al. *PLoS ONE* 2016; 11(2): e0148870.

<sup>7</sup>Ishiguro et al. *FEBS Letters* 2017; 591(23): 3926-3936.

<sup>8</sup>Abe et al. *The Journal of Biological Chemistry* 2019; 293(23): 8812-8828.

<sup>9</sup>Shimizu et al. *Biochemistry* 2018; 57(26): 3849-3860.

### 今後の展望

SOGPとSGLのホモログは広く微生物に分布しており、これらの遺伝子クラスターやSOGP、SGLのホモログ、近縁のファミリーには糖質関連酵素と推定されるものの機能未知のタンパク質が多数存在している。これらの機能構造解析によって $\beta$ -1,2-グルカン関連酵素群の探索をさらに行うとともに、見出した酵素を用いた糖鎖調製法の確立、その糖鎖の食品、素材としての有用機能性の探索を行い、糖鎖の利用可能性を拓いていきたい。

### 謝辞

本研究は東京理科大学理工学部応用生物科学科で行われたものであり、田口速男教授をはじめ本研究にご協力いただいた関係諸氏に厚く御礼申し上げます。