

# 新規オリゴ糖合成のための多糖分解酵素の単離同定と機能解析

中島 将博

(東京理科大学 理工学部 応用生物科学科)

## 研究の目的

申請者は逆反応においてソホロース(Glc- $\beta$ -1,2-Glc)に作用する新規ホスホリラーゼ(OGP)を発見し、OGP を用いた  $\beta$ -1,2-グルカン、グルコオリゴ糖の容易な酵素合成が可能になった。高価な糖であるソホロースの代わりにグルコースを出発原料としてこれらの糖鎖合成も可能であるが、この場合、反応初期にポリマーが容易に生成するものの、オリゴ糖の生成は非常に遅い。この反応系に  $\beta$ -1,2-グルカン分解酵素を加えることでポリマーを分解し、オリゴ糖の生成速度を上げることができると予想している。しかし、この酵素の単離同定例はないため、本課題では

- <1>ホスホリラーゼ OGP を用いた  $\beta$ -1,2-グルカンの大量合成
- <2>これを用いた  $\beta$ -1,2-グルカン分解酵素の単離同定と探索を目的とする。

## 方法

まず、 $\beta$ -1,2-グルカンの大量合成系の構築を行った。スクロースを sucrose phosphorylase (SP)によって加リン酸分解してグルコース-1-リン酸(Glc1P)を供給する系(文献 1)とグルコースと Glc1P から 1,2- $\beta$ -oligoglucan phosphorylase (OGP)により  $\beta$ -1,2-グルカン生成する系を組み合わせ、原料として Glc1P を使用しない one-pot の反応系を使用した (図 1)。

スクロース濃度と無機リン酸濃度をそれぞれ 1 M, 0.1 M に固定してグルコース濃度の最適化を行い、さらに SP と OGP の酵素濃度比の最適化を行った。反応初期における  $\beta$ -1,2-グルカンの生成量を TLC で検出することにより最適条件を決定した。こ

の最適化した条件を用いたラージスケール (2 L)での合成反応をスクロース濃度の減少が見られなくなるまで 12 日間行い、反応液からの陰イオン交換樹脂による除タンパク質、酵母処理による不要な糖の除去、エタノール沈殿により、 $\beta$ -1,2-グルカンの精製を行った。

精製した  $\beta$ -1,2-グルカン唯一の炭素源として<1>OGP の由来である *Listeria innocua*、<2>OGP ホモログを持つゲノム解読株である *Enterococcus faecalis*、<3>大腸菌、<4> $\beta$ -1,2-グルカンの分解活性のみが報告されている *Chitinophaga arvensicola* (文献 2)、<5>この菌の近縁種でゲノムの解読株の *Chitinophaga pinensis* の培養を行った。培養上清と菌体破砕液中の  $\beta$ -1,2-グルカン分解活性を TLC と還元糖の定量法により測定した。最も高い活性を示す菌株を選択し、1 L の  $\beta$ -1,2-グルカン炭素源とする培地で培養し、菌体抽出液から  $\beta$ -1,2-グルカンの分解活性を指標に 3 種のクロマトグラフィーによる目的酵素の精製を行った。精製した  $\beta$ -1,2-グルカン分解酵素のトリプシン、キモトリプシンを用いた In-gel digestion によるペプチド断片を LC/MS/MS 解析に供した。PEAKS online による *de novo sequence* を行い、信頼度の高い

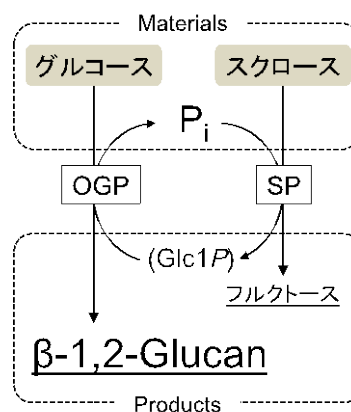


図1.  $\beta$ -1,2-グルカン合成スキーム

ペプチド配列を用いて BLAST 検索を行い、候補遺伝子を選択した。選択した遺伝子をクローニングして大腸菌で発現させ、His-tag カラムを用いて精製を行った。そして精製酵素の基質特異性、 $\beta$ -1,2-グルカンの分解様式を調べた。

## 結果

### < $\beta$ -1,2-グルカンの大量合成>

まず、各グルコース濃度での反応初期における  $\beta$ -1,2-グルカン合成量を比較したところ、0.5 M までは  $\beta$ -1,2-グルカン合成量の上昇が見られたが、それ以上では合成速度が変わらなかったため 0.5 M を最適濃度とした。次に SP と OGP を様々な濃度比で加えて  $\beta$ -1,2-グルカン合成量を調べたところ、OGP を SP の 4 分の 1 量まで減らしても顕著な合成量低下が見られなかったため、SP : OGP = 1 : 4 を最適濃度比とした。この条件を用いて 2 L の反応系で 12 日間反応を行ったところ、800 mM (グルコース換算濃度)以上の  $\beta$ -1,2-グルカンが蓄積した。反応液の DEAE cellulose による除タンパク質、酵母処理による不要な糖の除去後、反応液の半量に等量のエタノールを加えエタノール沈殿を行い、乾燥したところ約 167g の精製  $\beta$ -1,2-グルカンを得た。

### < $\beta$ -1,2-グルカン分解酵素の精製、同定>

$\beta$ -1,2-グルカンを唯一の炭素源として上記の 5 種の菌の培養を行ったところ、*C. arvensicola* のみ十分な生育が認められ、他はほとんど生育がみられなかった。そこで *C. arvensicola* の培養上清と菌体抽出液の活性を測定したところ、明らかに菌体抽出液に高い  $\beta$ -1,2-グルカン分解活性が見られた。菌体抽出液からの目的酵素の精製を行ったところ、活性のある画分のみに存在する SDS-PAGE 上の約 45 kDa のバンドを見出した。そこで、このバンドからトリプシンまたはキモトリプシン処理により抽出した断片を LC/MS/MS に供した。Mascot search を用いたところゲノム既知の近縁種 *C. pinensis* のタンパク質からは有為な候補が得られなかった。そこで、2 種のプロテアーゼ処理による結果それぞれに対し *de novo sequence* を行い、両方に共通するペプチド配列 7 個を信頼性の高い配列として選択した。これを用いて BLAST 検索を行ったところ、4 個が *C. pinensis* 由来の同じタンパク質(以降 SGL)にヒットした。そこで、*sgl* 遺伝子が大腸菌にて発現し、その遺伝子産物を用いて  $\beta$ -1,2-グルカンに作用させたところ、十分な分解がみられた。SGL は  $\beta$ -1,2-グルカンに対して特異的であり、最終産物として 2-5 糖を生成したことから SGL を  $\beta$ -1,2-グルカン分解酵素と同定した。

## 結論

スクロースとグルコースを出発材料とした one-pot の反応系での  $\beta$ -1,2-グルカンの大量合成を行った。この糖鎖を用いて培養した *C. arvensicola* の菌体抽出液から精製した酵素 SGL の同定に成功した。SGL は既知の糖加水分解酵素には属しておらず、新規のファミリーを形成すると考えられる。

## 文献

1) Nakai, H., Kitaoka, M., Svensson, B., and Ohtsubo, K. (2013) Recent development of phosphorylases

- possessing large potential for oligosaccharide synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**: 301-309.
- 2) Mendoza, N.S., and Amemura, A. (1983) (1→2)-β-d-Glucan-hydrolyzing enzymes in *Cytophaga arvensicola*. *J. Ferment. Technol.* **61**: 473-481.