

学位申請論文

$\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖の比色定量法の確立及び  $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖  
に作用する新規糖転移酵素の機能と構造の解明

2019 月 3 月

東京理科大学大学院

理工学研究科

応用生物科学専攻

博士後期課程 3 年

小林 海渡

## 目次

緒論 .....	1
図 .....	4
要旨 .....	5
略語表 .....	7
第 1 章 .....	9
導入 .....	10
方法 .....	12
様々な還元糖定量法を用いた $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖の比色定量 .....	12
$\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖に適用するための Anthon-MBTH の改良 .....	12
緩衝液成分、塩、キレート試薬の影響の調査 .....	13
改良 MBTH 法を用いた $\beta$ -1,2-グルカナーゼの活性測定 .....	13
結果 .....	14
各種比色定量法の $Sop_{ns}$ 定量性の評価 .....	14
Anthon-MBTH 法の改良 .....	14
緩衝液成分、塩、キレート試薬の影響 .....	15
SGL 活性の測定 .....	15
考察 .....	16
図 .....	18
表 .....	28
第 2 章 .....	29
導入 .....	30
方法 .....	32
SGL ホモログの遺伝子クラスター探索 .....	32
機能未知 GH35 酵素のクローニング .....	32
酵素の発現、精製 .....	32
IaSGT、ChSGT の基質の探索 .....	33
IaSGT、ChSGT の温度、pH プロファイル .....	33
加水分解活性、加リン酸分解活性の確認 .....	34
IaSGT、ChSGT の $Sop_{ns}$ に対する速度論量的解析 .....	34
IaSGT の結晶構造解析 .....	34
ゲル濾過クロマトグラフィー .....	35
部位特異的変異導入 .....	35
IaSGT の E343G 変異体のグライコシンターゼ活性の測定 .....	36

IaSGT の配糖体基質の探索 .....	37
IaSGT の配糖体をアクセプターとした際の反応速度論量 .....	37
結果 .....	38
SGL ホモログの遺伝子クラスターの探索 .....	38
IaSGT、ChSGT の系統解析 .....	38
ChSgt、IaSGT の基質の探索 .....	38
IaSGT、ChSGT の温度、pH プロファイル .....	39
ゲル濾過クロマトグラフィー .....	39
IaSGT、ChSGT の $S_{opns}$ に対する速度論量的解析 .....	39
IaSGT の全体構造と基質ポケット .....	39
IaSGT 結晶の非対称単位中の 2 分子の構造比較 .....	40
IaSGT の基質、基質アナログとの複合体構造 .....	41
IaSGT のアクセプター基質探索 .....	42
配糖体をアクセプターとした際の IaSGT の反応速度論量および ChSGT の比活性 .....	42
IaSGT と <i>p</i> NP- $\alpha$ -glucoside の複合体構造 .....	43
IaSGT の E343G 変異体を用いたドナー基質の探索 .....	43
考察 .....	44
図 .....	47
表 .....	74
総括 .....	80
参考文献 .....	81
謝辞 .....	86

## 緒論

糖鎖は自然界に大量に存在しており、その種類も様々である。糖鎖の構成成分は単糖であり、単糖がグリコシド結合によって結合している。d-グルコースの1位にd-グルコースが結合する場合でも2種類のアノマー ( $\alpha, \beta$ ) と5つの結合位置があるので理論上10種類の二糖が考えられる。単糖は数十種類知られているため、理論上は2種類だけでも万をゆうに超える種類が存在可能である。また、天然には様々な重合度の糖鎖が存在しており、直鎖状だけでなく環状であったり、枝分かれしていたりと多様な糖鎖が報告されている。グルコースのみを構成成分とする一本鎖の糖鎖でも、セルロース ( $\beta$ -1,4)、アミロース ( $\alpha$ -1,4)、ラミナラン ( $\beta$ -1,3) など様々である。アミロースはでんぷんの構成成分であるが、でんぷん中のアミロースは枝分かれしており、植物種によって枝分かれの頻度などが異なり、様々な形態をとる。また、セルロースは植物細胞壁の主成分であり、天然で最も多量に存在するポリマーと言われている。植物はセルロースの他にもキシランなどのヘミセルロースやリグニンを含み、これらの糖鎖の比率や構造は種によって多様性に富む。

糖鎖は植物だけではなく、原核生物から真核生物まであらゆる生体内に存在しており、生命活動に密接に関わっている。原核生物の細胞壁や哺乳動物の軟骨成分など糖鎖は生体に広く分布している。また、生体内で合成されるものだけではなく、食物として取り込む糖鎖も生体に影響を与える。アミロースなどのヒトが分解できる糖鎖は食物として摂取された際に分解され、吸収される。しかし、食物として摂取されたセルロースやヘミセルロースはヒトが持つ酵素では分解できないため、ほとんど分解されずに腸まで届く。ヒトの腸内にはセルロースやヘミセルロースを分解する菌が多数生息しており、ヒトが分解できない糖もそのような腸内細菌の餌となる (1)。腸内細菌は免疫応答に影響し、動物実験によって炎症性疾患の発症を防ぐ可能性が示唆されており、その要因の1つとして腸内細菌が生産する短鎖脂肪酸が関与している可能性が指摘されている (2, 3)。糖鎖の種類によって優先的に生育する菌種が異なり、生産される主要な短鎖脂肪酸の種類は菌種によって異なる。また、糖尿病のラットにオリゴ糖を餌として与えると血糖値やコレステロール値を減少させ、糖尿病や尿蛋白、糖尿病性腎症などの糖尿病合併症に対して効果があることが報告されている (4)。このように、糖鎖はヒトの健康にも密接に関わっている。

糖を基質とする酵素も様々であり、糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolase; GH)、糖転移酵素 (Glycosyl transferase; GT)、多糖リアーゼ (Polysaccharide lyase; PL)、炭水化物エステラーゼ (Carbohydrate esterase; CE)、酸化還元酵素 (Auxiliary Activity; AA)、触媒活性を持たない糖質結合モジュール (Carbohydrate-binding module; CBM) などが存在する。これらの酵素はアミノ酸配列によってファミリーに分類されており、GHは1-156、GTは1-106、PLは1-29、CEは1-16、AAは1-15、CBMは1-84のファミリーに分類されており (2018年12月現在)、Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) というデータベースにまとめられている

(<http://www.cazy.org>, CAZy) (5,6)。GH とは、主に EC 3.2.1 に分類される酵素群であり、糖質関連酵素の中でも糖同士もしくは糖と他の成分のグリコシル結合を加水分解する酵素群である。多様な糖構造に対応してそれを分解する糖質分解酵素も複雑に分子進化し、アミノ酸配列は極めて発散している。食物繊維の主要な構成成分であるセルロースや、セルロースに次いで主要な構成成分であるキシランなどが自然界に存在する糖鎖として知られている。他にも、マンナンやキチンなど様々なポリ多糖が自然界に存在している (7)。それらの糖鎖を分解する酵素として、セルロースを分解するセルラーゼ (EC 3.2.1.4, GH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 74, 124) や、キシランを分解するキシラナーゼ (EC 3.2.1.8, GH 5, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51, 62, 98) など多くの GH が研究されている。このように様々な活性とファミリーが存在していて、アミノ酸配列のみで機能を推定することは時として困難である。GH の研究は進んでいるが、新規の GH は定期的に発見されていて、まだ多くの未発見の GH が存在すると考えられる。

一般的に、グリコシル結合の加水分解にはプロトン供与体として働くアミノ酸残基と求核攻撃を行うアミノ酸残基の 2 つのアミノ酸残基が関与しており、これらのアミノ酸残基がグリコシル結合に働くことによってグリコシル結合が加水分解される (8)。一部例外を除いて、加水分解の反応機構は反転型と保持型の 2 つに分類される (Fig. 1)。保持型の場合は水分子の代わりに糖分子が入ることで糖転移が起きる場合がある。また、グリコシル結合の加水分解に直接関与するアミノ酸残基以外にも、電子の受け渡しに関与するアミノ酸残基やプロトンプールとして働く領域などが発見されている (9)。

糖質加水分解酵素や関連酵素は様々な産業分野で利用されている。製紙業ではパルプの漂白にキシラナーゼ (10) が、食品産業では転化糖の製造にインベルターゼ (11)、パンの製造にキシラナーゼ (12) が、製薬産業では抗癌物質や抗炎症物質の生産にエステラーゼ (13) が用いられている。また、バイオエネルギー生産における糖質加水分解酵素の利用に関する研究も進んでいる (14, 15)。このように、糖質関連酵素は産業分野でも重要な役割を果たす。

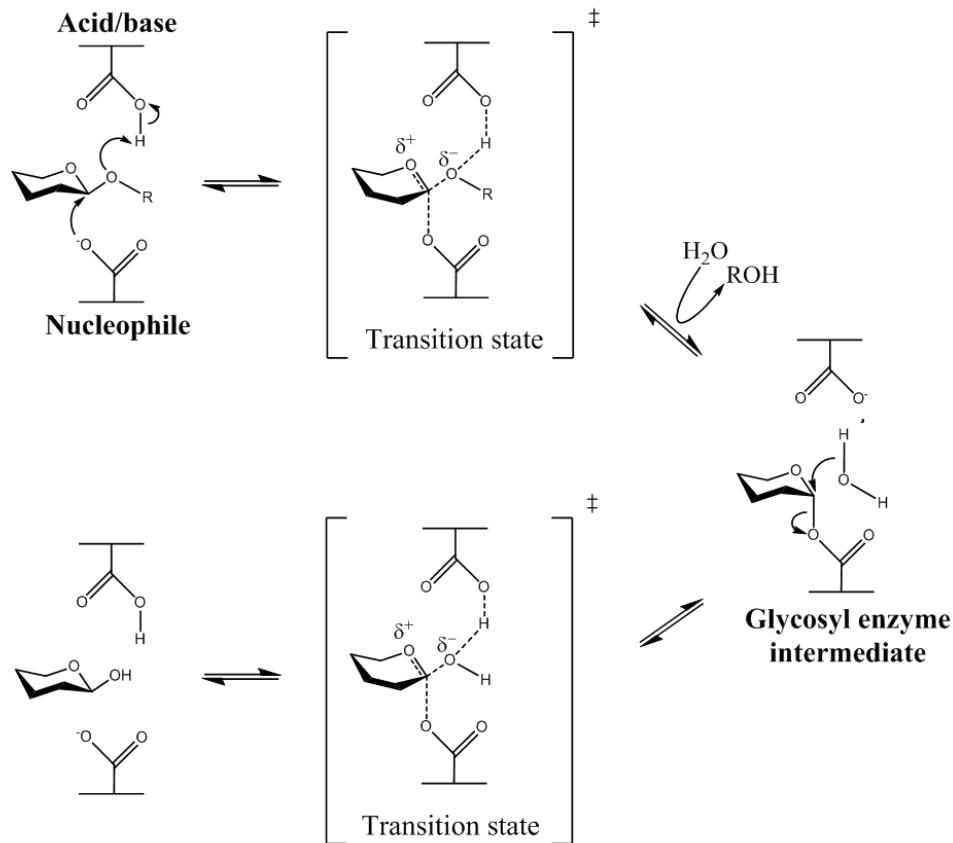
$\beta$ -1,2-グルカンはグルコースが  $\beta$ -1,2-グルコシド結合で重合している糖鎖であるが、天然では直鎖状もしくは環状で存在することが知られている。グラム陰性細菌である *Rhizobium* (旧 *Agrobacterium* を含む), *Shinorhizobium*, *Brucella* などが環状  $\beta$ -1,2-グルカンを生産することが知られており、藻類である *Chlorella pyrenoidosa* が環状及び直鎖状の  $\beta$ -1,2-グルカンを生産することが知られている (16–21)。環状  $\beta$ -1,2-グルカンは動物や植物に対しての感染や共生、細胞の浸透圧調整、鉄の貯蔵などに関わっている (17, 18, 21–24)。 $\beta$ -1,2-グルカンの物性や機能性についてはほとんど解明されておらず、溶解度が高く包摂能 (他の物質を包みこんで溶解度を上昇させる) があるという報告がある程度である (25)。

近年、細菌由来  $\beta$ -1,2-グルカナーゼ (SGL) が同定され、新たに Glycoside hydrolase (GH) family 144 が創設された。 $\beta$ -1,2-グルカン/グルコオリゴ糖に働く酵素はホスホリラーゼ (GH94)、グルコシダーゼ (GH3)、グルカナーゼ (GH144) などが知られているが、糖鎖の希

少性ゆえ他の糖鎖に比べて関連酵素の報告はまだ少ない。また、糖鎖の研究において糖鎖の定量は必須であるが、様々な定量法が用いられている。中でも、比色定量法は High Performance chromatography (HPLC) 法などと比較して簡便かつハイスループットであるという利点がある。糖鎖の比色定量法としては還元末端を認識する方法が多く用いられている。糖質加水分解酵素においては、グリコシド結合の加水分解が 1 回起こるたびに還元末端が 1 つ増える。そのため、還元末端の増加を定量することで酵素活性を測定できる。しかし、 $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖 ( $\text{Sop}_n\text{s}$ ,  $n$  は重合度) を正確に定量できる比色定量法は知られていない。本研究では、 $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖の比色定量法の確立と、 $\beta$ -1,2-グルカン/グルコオリゴ糖に働く新規酵素の探索、機能・構造解析を行った。



### (A) Retaining mechanism for a $\beta$ -glycosidase



### (B) Inverting mechanism for a $\beta$ -glycosidase

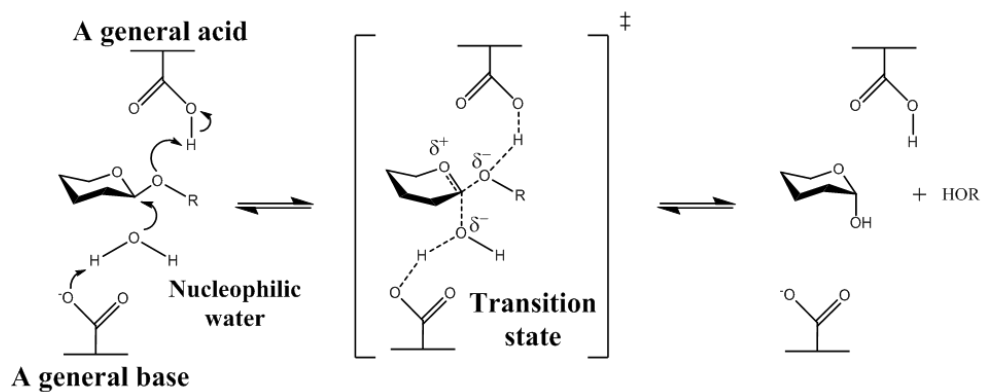


Fig. 1. 糖質加水分解酵素の反応様式

糖質加水分解酵素の反応様式を示す。A が保持型、B が反転型である。反転型は反応前と後でアノマーが反転し、保持型はアノマーが保持される。

## 要旨

$\beta$ -1,2-グルカンはグルコースが  $\beta$ -1,2-グルコシド結合で重合している糖鎖であるが、天然では直鎖状もしくは環状で存在することが知られている。近年、細菌由来  $\beta$ -1,2-グルカナナーゼ (SGL) が同定され、新たに Glycoside hydrolase (GH) family 144 が創設された。 $\beta$ -1,2-グルカン/グルコオリゴ糖に働く酵素はホスホリラーゼ (GH94)、グルコシダーゼ (GH3)、グルカナナーゼ (GH144) などが知られているが、糖鎖の希少性ゆえ他の糖鎖に比べて関連酵素の報告はまだ少ない。また、グルカナナーゼなどの酵素の活性を測定する際には比色定量が用いられることが多いが、 $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖 (Sop<sub>n</sub>s、n は重合度) を正確に定量できる比色定量法は知られていない。本研究では、 $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖の比色定量法の確立と、 $\beta$ -1,2-グルカン/グルコオリゴ糖に働く新規酵素の探索、機能・構造解析を行った。

$\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖の定量に使える比色定量法を探索した。様々な糖の還元末端を認識する比色定量法を Sop<sub>2</sub> を用いて調べた結果、DNS 法、tetrazolium blue 法ではほとんど発色しなかった。PAHBAH 法や ferricyanide 法では 3 糖以上の Sop<sub>n</sub>s ではソホロースよりも顕著に発色が少なかったため、 $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖混合物が生成する  $\beta$ -1,2-グルカナナーゼの定量には適していないと言える。そこで、MBTH (3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン) と糖の還元末端を反応させアジンを生成し、アジンと酸化型 MBTH を反応させて生じる青色色素を定量する方法 (MBTH 法、Gordon E.A. and Diane M.B., *Anal. Biochem.*, 305, 287-289(2002)) を検討した。MBTH 法では Sop<sub>3-5</sub> で同じ吸光度を示したが、グルコースと Sop<sub>2</sub> の吸光度が Sop<sub>3-5</sub> と異なっていた。これらの比色定量法の中で、Sop<sub>3-5</sub> で同じ吸光度を示した MBTH 法を改良して Sop<sub>n</sub>s 定量に使えるようにした。MBTH 法の反応条件 (塩基、反応温度等) を変え、Sop<sub>n</sub>s 定量に最適な条件を検討した。2 種類の塩基 (NaOH, KOH) を試した結果、塩基の種類が反応性に与える影響は少なかった。熱処理の反応時間が MBTH 法に与える影響を調べた結果、反応時間が短い場合は 3 糖以上の Sop<sub>n</sub>s の発色が Sop<sub>2</sub> よりも明らかに小さかったが、反応時間を伸ばすことで Sop<sub>3-5</sub> の吸光度は増加した。反応時間が 30-40 分で Sop<sub>2-5</sub> の発色は同程度となった。そこで、熱処理の時間を 30 分とした条件を  $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖定量用の改良型 MBTH 法とした。この条件下で、0.2-2 mM の範囲で Sop<sub>n</sub>s 濃度と吸光度の関係は直線性を示した。以上から、改良型 MBTH 法は Sop<sub>n</sub>s の定量に適した方法であると言える。

次に、 $\beta$ -1,2-グルカン/グルコオリゴ糖に作用する新規酵素の探索及び機能構造解析を行った。多くの SGL ホモログ遺伝子は遺伝子クラスターを形成するが、構成遺伝子には機能未同定の推定糖加水分解酵素が多くある。その中から、GH35 に属する酵素の機能・構造解析を行った。*Ignavibacterium album*、*Chloroflexus* sp. Y-400-fl 由来の 2 種の GH35 酵素 (IaSGT、ChSGT) を大腸菌内で発現させ、精製した。様々な糖鎖を用いて基質の探索を行ったところ、IaSGT と ChSGT は特異的に Sop<sub>n</sub>s に作用し、グルコース単位を転移する新規活性を示した。



しかし、Sop<sub>ns</sub> に対して両酵素とも反応速度論量の解析において高い  $K_m$  値を示したことから、Sop<sub>ns</sub> はドナーあるいはアクセプターとしては親和性が低いと考えられた。そこで、X線結晶構造解析により IaSGT の Sop<sub>2</sub> 複合体構造を決定したところ、Sop<sub>ns</sub> のみがサブサイト-1 から+1 へ結合していたため、Sop<sub>2</sub> は真のドナーと考えられた。しかし、3 糖以上の Sop<sub>ns</sub> と IaSGT との複合体構造ではサブサイト+2 以降の電子密度が明らかに不明瞭であった。また、グルコースとの複合体構造ではグルコースがサブサイト+1 に結合していた。そのため、サブサイト+1 以降には何らかのグルコシドが結合すると考え、各種グルコシド (Glc- $\alpha$ / $\beta$ -R) をアクセプターとして活性を調べたところ、IaSGT ではアグリコンが Aryl 基や Alkyl 基の  $\alpha$  アノマーのグルコシド配糖体 (Glc- $\alpha$ -R) に特に高い親和性を示した。一方で、ChSGT では配糖体に対しての親和性は低かった。IaSGT と高い活性を示した各種配糖体との複合体構造を解析したところ、グルコース部分はサブサイト+1 に観察され、アグリコン部分が疎水性残基に囲まれていたことから、Aryl 基や Alkyl 基をもつ  $\alpha$  アノマーのグルコシド配糖体が高い親和性を持つことが構造的に裏付けられたと言える。以上から IaSGT において、ドナーは Sop<sub>ns</sub> であり、Aryl 基や Alkyl 基をもつ  $\alpha$  アノマーのグルコシド配糖体が真のアクセプターと考えられた。このような活性は今まで報告されておらず、IaSGT、ChSGT は  $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖に作用する新規活性を有する酵素であると言える。

## 略語表

$\alpha$ -GalF	$\alpha$ -D-galactopyranosyl fluoride
$\alpha$ -GlcF	$\alpha$ -D-glucopyranosyl fluoride
AA	Auxiliary Activity
ATP	Adenosine triphosphate
BGL	$\beta$ -1,2-グルコシダーゼ ( $\beta$ -1,2-Glucosidase)
CAPS	N-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid
CAZY	Carbohydrate-Active enZYMes
CBM	Carbohydrate-binding module
CE	Carbohydrate esterase
CHES	N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid
Cel <sub>n</sub>	セロオリゴ糖 (n は重合度)
CpSGL	<i>Chitinophaga pinensis</i> 由来 SGL
DL	検出限界
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNS	3,5-dinitrosalicylic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
G1P	グルコース-1-リン酸
G6PDH	6-phosphate dehydrogenase
GH	Glycoside hydrolase
GOPOD	Glucose oxidase/ peroxidase
GT	Glycosyl transferase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	High Performance chromatography
HjCel3A	<i>Hypocrea jecorina</i> 由来グリコシダーゼ
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
Ig	Immunoglobulin
Lam <sub>n</sub>	ラミナリオリゴ糖 (n は重合度)
LiBGL	<i>Listeria Innocua</i> 由来の $\beta$ -グルコシダーゼ
LiSOGP	<i>Listeria innocua</i> 由来の SOGP
MBTH	3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MOPS	3-モルホリノプロパンスルホン酸

NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NaOAc	酢酸ナトリウム
PAHBAH	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid hydrazine
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrophenol
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein data bank
PEG	Polyethylene glycol
PGM	Phosphoglucomutase
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PL	Polysaccharide lyase
QL	定量限界
RMSD	Root Mean Square Deviation
SGL	$\beta$ -1,2-グルカナーゼ ( $\beta$ -1,2-Glucanase)
SOBP	$\beta$ -1,2-Glucooligosaccharide binding protein
SOGP	$\beta$ -1,2-ソホオリゴグルカンホスホリラーゼ
Sop <sub>n</sub> s	$\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖 (n は重合度)
Sus	Starch utilization system
TLC	Thin layer chromatography

## 第 1 章

$\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖の比色定量法の確立

## 導入

糖の比色定量法は、簡便で迅速な方法であるがゆえに、GH を含む様々な酵素の活性測定によく利用されている。エキソ型酵素であるグルコシダーゼの場合は、加水分解によって遊離したグルコースを glucose oxidase/ peroxidase (GOPOD) 法 (26) によって定量する (Fig. 1A)。GOPOD 法ではグルコースをグルコースオキシダーゼによってグルコン酸へ酸素で酸化する際に発生する過酸化水素を、*p*-hydroxybenzoic acid と 4-aminoantipyrine 存在下でペルオキシダーゼと反応させることにより生じる赤色色素の吸光度を測定する。これらの方法は、グルコースを基質とする酵素を用いており、非常によく用いられる方法である。他のエキソ型酵素のグリコシダーゼの活性測定法では、人工基質である *p*-nitrophenol (*p*NP) に単糖が結合した配糖体を用いて、分解によって遊離した *p*NP を定量する方法が一般的である。*p*NP はアルカリ条件下で 400 nm 極大吸収を持ち (黄色に発色)、高いモル吸光係数を持つ。脱離基としては 2,4-ジニトロフェニル基や umbelliferyl 基を持つ配糖体も同様の目的で用いられるが、*p*NP よりも非酵素的に脱離しやすい点で不安定であり、*p*NP 糖がよく用いられる。一方で、エンド型酵素は多糖をランダムに分解して様々な鎖長のオリゴ糖を遊離するため、ほとんどの場合反応初期に単糖が生成することではなく、*p*NP 糖を基質として *p*NP を遊離することもない。エンド型酵素のアッセイに用いられる比色定量法は、糖鎖の加水分解によって生じた還元末端を測定するのが一般的である (Fig. 1B)。還元糖の定量には、Somogyi-Nelson 法 (27)、tetrazolium blue 法 (28)、ferricyanide 法 (29, 30)、*p*-hydroxybenzoic acid hydrazine (PAHBAH) 法 (31)、dinitrosalicylic acid (DNS) 法 (32) など様々な方法がある。エンド型酵素は一般的に生産物として様々な重合度のオリゴ糖を遊離するため、異なる重合度のオリゴ糖でも同程度の発色となる比色定量法の使用が前提である。他にも 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazine (MBTH) 法はアルデヒドの定量法として確立された方法であり (33, 34)、その後アルドースやケトースなどの還元糖の定量法としても使用可能であることが示された (Anthon-MBTH 法) (35, 36)。MBTH を用いる方法は主要な方法ではないが、他の比色定量法では定量できないキトオリゴ糖 (N-アセチルグルコサミンが  $\beta$ -1,4-グリコシド結合で重合した糖)の定量に応用された例もある (37)。

近年、 $\beta$ -1,2-グルカンを加水分解するエンド型酵素である CpSGL が単離され、機能・構造解析が行われた。 $\beta$ -1,2-グルカナーゼの活性は  $\beta$ -グルコシダーゼ (38) を組み合わせた方法や PAHBAH 法が用いられた。しかし、*Listeria Innocua* 由来の  $\beta$ -グルコシダーゼ (LiBGL) は Sop<sub>ns</sub> だけでなくグルカンも分解する。PAHBAH 法では Sop<sub>4</sub> を標準物質として CpSGL の分解活性により生成する様々な重合度の Sop<sub>ns</sub> 混合物の量を計算しているため、重合度によってオリゴ糖の発色の度合いが変わらないことが CpSGL の活性が正確に測定できていることの条件であるが、実際には発色の度合いが重合度によって異なっている。先述の通り、一般的にはエンド型の糖質分解酵素のアッセイには様々な鎖長のオリゴ糖を一様に定量できる

比色定量法が用いられる。しかし、 $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖の比色定量法に関する報告はほとんどなく、筆者の所属研究室内での予備的な実験により経験的に極めて感度が悪いということが判明しているのみである。そこで、本研究では、 $\beta$ -1,2-グルカン関連酵素の研究に貢献すべく、 $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖の定量に最適な比色定量法を確立することを目的とした。

## 方法

### 様々な還元糖定量法を用いた $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖の比色定量

#### <DNS 法>

0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM の Sop<sub>2</sub> およびグルコース溶液 50  $\mu$ L と DNS 溶液 (1% (w/v) 3, 5-dinitrosalicylic acid, 0.2% (w/v) phenol, 0.05% (w/v) sodium bisulfate, 1% (w/v) NaOH) 150  $\mu$ L を混合し、100 °C で 5 分間熱処理を行った。冷却後、575 nm の吸光度を測定した。全ての実験を通して吸光度の測定は、96 ウェルマイクロプレート (EIA/RIA plate, 96-well half area; Corning Inc., Corning, USA) とマイクロプレートリーダー Spectramax 190 (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, USA)を用いて行った。

#### <Tetrazolium blue 法>

0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM の Sop<sub>2</sub> およびグルコース溶液 50  $\mu$ L と Tetrazolium blue 溶液 [2% (w/v) blue tetrazolium chloride in 0.1 M NaOH] 95  $\mu$ L、1 M sodium potassium tartrate 95  $\mu$ L を混合し、100 °C で 5 分間熱処理を行った。冷却後、660 nm の吸光度を測定した。

#### <Ferricyanide 法>

それぞれの糖溶液 (60  $\mu$ L) と ferricyanide 溶液 (0.5 g/L potassium ferricyanide) 20  $\mu$ L、carbonate-cyanide 溶液 (5.3 g/L sodium carbonate, 0.65 g/L potassium cyanide) 20  $\mu$ L を混合し、100 °C で 10 分間熱処理を行った。室温に冷却後、ferric ion 溶液 (1.5 g/L ferric ammonium sulfate, 2 g/L sodium dodecyl sulfate in 0.2 M sulfuric acid) 100  $\mu$ L を加え、15 分間室温で静置した。その後、690 nm の吸光度を測定した。

#### <PAHBAH 法>

PAHBAH 試薬を 0.5 M HCl 中に 5% (w/v) となるように溶解した。この溶液を 0.5 M NaOH で 1% (w/v)となるように希釈した。Sop<sub>2</sub>, Sop<sub>3</sub>, Sop<sub>4</sub>, Sop<sub>5</sub> の溶液 30  $\mu$ L と 1% (w/v) PAHBAH 溶液 150  $\mu$ L を混合し、100 °C で 5 分間熱処理した。その後、410 nm の吸光度を測定した。

#### <Anthon-MBTH 法>

糖溶液 20  $\mu$ L と 0.5 M NaOH 20  $\mu$ L を混合した。等量の 3 mg/mL MBTH 溶液と 1 mg/mL dithiothreitol (DTT) 溶液を素早く混ぜ、サンプルに 20  $\mu$ L 加え、80 °C で 15 分間熱処理した。その後、0.5% (FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>)·12H<sub>2</sub>O, 0.5% sulfuric acid, 0.25 M HCl を 40  $\mu$ L 加え、室温まで冷却した。100  $\mu$ L の蒸留水を加え、620 nm の吸光度を測定した。

### $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖に適用するための Anthon-MBTH の改良

まず、NaOH と KOH を用いて、塩基溶液の影響を調べた。Anthon-MBTH 法の 0.5 M NaOH 溶液を 0.5 M KOH 溶液に変えて Sop<sub>2</sub> の検量線を作製し、塩基の種類による影響を評価した。次に、熱処理の時間による影響を調べた。熱処理の時間を 10 - 60 分に変えて Sop<sub>2-5</sub> の発色の変化を調べた。さらに、DTT 濃度がバックグラウンドに与える影響を調べた。0, 0.5, 1.0,

1.5, 2.0 mg/mL の DTT 溶液を用いた際のバックグラウンドの発色を測定した。それぞれの DTT 溶液を用いて、Anthon-MBTH 法の熱処理時間を 30 分に変更した方法 (改良 MBTH 法) で各濃度の DTT 存在下での Sop<sub>2-5</sub> の発色による吸光度を調べた。

#### 緩衝液成分、塩、キレート試薬の影響の調査

50 mM または 100 mM 緩衝液 (MOPS buffer, pH 7.0; HEPES buffer, pH 8.0; MES buffer, pH 6.0; PIPES buffer, pH 7.0; CHES buffer, pH 9.5; Bicine buffer, pH 8.5; CAPS buffer, pH 10.5; phosphate buffer, pH 6.2; acetate buffer, pH 5.0; Tris-HCl buffer, pH 8.0; citrate buffer, pH 4.5; cacodylate buffer, pH 6.5; imidazole buffer, pH 7.0; or carbonate buffer, pH 10.0)、50mM または 100mM 塩溶液 (NaCl or ammonium sulfate)、もしくは 5 mM, 50mM または 100mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液中に Sop<sub>2</sub> が 5 mM となるようにサンプルを調製し、改良 MBTH 法で発色させ、緩衝液成分、塩、キレート試薬の発色に与える影響を評価した。コントロールとして蒸留水で 0.5 mM に調製した Sop<sub>2</sub> 溶液を用いた。

#### 改良 MBTH 法を用いた $\beta$ -1,2-グルカナーゼの活性測定

50mM MES 緩衝液 (pH 6.5) 中に 0.2%  $\beta$ -1,2-グルカンと 0.12, 0.24, 0.36 または 0.48  $\mu$ g/mL CpSGL が含まれるように反応液を調製し、30 °C で 0, 2, 4, 6, 8, 10 分反応させた。反応後、100 °C で 10 分間熱処理し、酵素反応を止めた。反応液中の還元末端を改良 MBTH 法で定量した。



## 結果

### 各種比色定量法の Sop<sub>ns</sub> 定量性の評価

DNS 法は Sop<sub>2</sub> ではほぼ発色せず、tetrazolium blue 法は Sop<sub>2</sub> ではグルコースと比べて 6 倍程度発色が悪かった (Fig. 2AB, Table 1)。Ferricyanide 法と PAHBAH 法では Sop<sub>ns</sub> で直線性を示す検量線が得られたが、重合度の増加に伴って顕著に吸光度が減少していた (Fig. 2CD, Table 1)。一方で、Anthon-MBTH 法では、Sop<sub>3-5</sub> で同じ吸光度を示したが、グルコースおよび Sop<sub>2</sub> の吸光度は異なっており、グルコースが最も発色がよく次いで Sop<sub>2</sub> であった (Fig. 2E)。Anthon-MBTH 法ではグルコースと Sop<sub>2</sub> の発色の違いは 3 倍程度でありもっとも差が少なかった。また、各比色定量法によって測定溶液に含まれる糖の終濃度が異なっているため、測定溶液の終濃度を基にしたミリモル吸光係数を Table 1 に示した。Sop<sub>ns</sub> に対するミリモル吸光係数は ferricyanide 法と Anthon-MBTH 法の発色が良い。Ferricyanide 法ではグルコースと Sop<sub>2</sub> の発色は Anthon-MBTH 法よりも高いが、Sop<sub>3-5</sub> では Anthon-MBTH 法の方が発色が良い。

### Anthon-MBTH 法の改良

塩基溶液を NaOH から KOH に変えて発色を評価したが、大きな違いはみられなかった (Fig. 3)。熱処理の時間を変化させた結果、20 分以内では Sop<sub>2</sub> と Sop<sub>3-5</sub> の吸光度が一致しなかったが、30-40 分の間で Sop<sub>2-5</sub> の吸光度が一致した。50 分以上では再び Sop<sub>2-5</sub> の吸光度にばらつきが生じた。バックグラウンドは時間経過とともに増加していた (Fig. 4)。40 分の方が吸光度が高かったが、バックグラウンドが時間経過とともに増加したため、30 分の発色時間を用いることにした。DTT 濃度がバックグラウンドに与える影響はほとんどないと言えるが、DTT 溶液の濃度が 0.5 mg/mL で最も低かった (Fig. 5)。DTT を加える理由は還元的な雰囲気にするすることで MBTH が酸化しないようにするためだと考えられ、測定環境や夾雑物の存在によっては DTT の有無でバックグラウンドの増加を抑える働きがある可能性がある。また、DTT 濃度で発色 (傾き) は変わらなかったため、DTT は元の 0.5 mg/mL の濃度を採用した。これらの結果より、Anthon-MBTH 法の熱処理時間を 30 分に変更した改良 MBTH 法を用いて Sop<sub>2-5</sub> の発色を調べることにした。改良 MBTH では Sop<sub>2-5</sub> においてプロットがよく直線にフィットしており、これらの発色の度合いもほぼ等しかった。グルコースよりは発色の程度が低いものの、この方法で Sop<sub>2-5</sub> を十分に定量できることが示されたと言える (Fig. 6A-E)。また、改良 MBTH 法で Sop<sub>ns</sub> を定量する際の検出限界 (DL) 及び定量限界 (QL) を求めるために、低濃度での Sop<sub>2</sub> の発色を調べ、次の式で算出した ([https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf))。DL = 3.3σ/S、QL = 10 σ/S、σ はブランクの標準偏差、S は DL 付近での検量線の傾きを示す。DL および QL それぞれ 0.041 mM 及び 0.12 mM であった (Fig. 6F)。

### 緩衝液成分、塩、キレート試薬の影響

Fig. 7 に緩衝液成分、塩、キレート試薬の影響を示す。グッドバッファー (39) は 100 mM HEPES を除いて、発色への影響は 10%未満であった。100 mM HEPES では発色が 80%程度に減少した。acetate buffer (100mM and 50 mM), Tris buffer (100mM and 50 mM), cacodylate buffer (50 mM), imidazole buffer (100mM and 50 mM) and carbonate buffer (50 mM)は吸光度の変化は 10%未満であった。無機リン酸存在下では鉄イオンがリン酸塩として沈殿した。また、クエン酸など一部の緩衝液では緩衝液成分が鉄イオンをマスクするため、発色が大きく減少した。NaCl と硫酸アンモニウム塩は発色を阻害することはなかった。50 mM および 100 mM の EDTA では EDTA が鉄イオンをキレートするため発色しなかったが、5 mM EDTA では発色は阻害されなかった。

### SGL 活性の測定

時間経過による  $\beta$ -1,2-グルカン分解産物の増加は改良 MBTH 法で測定することができた (Fig. 8)。また、いずれの酵素濃度でもグラフは直線を示し、直線の傾きは酵素濃度が低い方から順に 0.016、0.036、0.057、0.075 であり、概ね酵素濃度に比例して増加した。0.2%  $\beta$ -1,2-グルカン、0.48  $\mu\text{g/mL}$  CpSGL の条件では酵素の比活性は 144 U/mg であった。

## 考察

本研究は様々な比色定量法で  $Sop_{ns}$  の発色をデータとして示した初めての例である。その結果、いずれの比色定量法でも  $Sop_{ns}$  はグルコースよりも呈色しづらかった。これは、 $Sop_{ns}$  の還元力が低いためであり、 $Sop_{ns}$  は比色定量法には反応性の高い試薬を用いる必要があると考えられる。中でも DNS 法と tetrazolium blue 法では  $Sop_2$  は発色が悪かった。Ferricyanide 法、PAHBAH 法では比色定量法として十分な発色が得られたが、 $Sop_{2-5}$  の発色の度合いがそれぞれ異なっていた。PAHBAH 試薬はヒドラジンで反応性が高いために、還元力の低い  $Sop_{ns}$  でも発色させることができると推測される。PAHBAH 試薬との反応ではオサゾンができるが、通常の糖の場合還元糖の 1 位と 2 位の OH と結合する。しかし、 $Sop_{ns}$  の場合は 2 位がグリコシド結合に使われているため 1 位しか結合できない。そのため、グルコースと  $Sop_{ns}$  で発色の違いがあると推測される。重合度が増加すると発色が減少するのは、2 位に結合している糖鎖が大きくなると立体障害が増すためかもしれない。また Ferricyanide 法は特に発色の度合いが高かったが、使用する試薬の毒性が高い (40)。グルコースと比べて  $Sop_2$  で発色が悪くなるのは還元末端のグルコシドの 2 位に結合しているグリコシドが立体障害となり試薬が反応部位に接近しづらいからかもしれない。さらに、 $Sop_3$  以上の重合度で発色が一層悪くなるのは糖鎖が長くなると立体障害が増すためだと考えられる。Anthon-MBTH 法は  $Sop_{3-5}$  の発色が同程度であり、感度も十分であったためこの比色定量法を  $Sop_{ns}$  定量用に改良することにした。改良 MBTH 法では時間経過とともに  $Sop_{ns}$  の発色による吸光度がバックグラウンド以上に上昇し続けており、30 分では MBTH と  $Sop_{ns}$  との反応が完全に終了していないために  $Sop_{ns}$  はグルコースより発色の度合いが低いのかかもしれない。

MBTH 法はアルデヒドを定量する方法として開発された比色定量法であり、MBTH とアルデヒドが結合し黄色い色素 (アジン) が生成され、アジンと酸化型 MBTH が結合することにより青色の色素が生成される (Fig. 9)。アジンとしての吸光度を測定することも可能であるが (41)、 $Sop_2$  では PAHBAH 法と同程度の発色であり適していない。Anthon-MBTH で  $Sop_2$  と比べて  $Sop_{3-5}$  の吸光度が低いことが熱処理時間の延長によって解消されたのは  $Sop_3$  より長い鎖長の糖鎖で反応性が悪いためだと考えられる。この熱処理時間を延長した改良 MBTH 法によって重合度によらずに  $Sop_{ns}$  を定量可能となったと言える。MBTH も PAHBAH と同様にヒドラジンの一種で反応性が高いため、加熱による発色の際に複雑な副反応が生じてバックグラウンドが徐々に上昇する。副反応によって生じる物質は 620 nm に吸収を持つ物質ではなく、不溶性の沈殿によって吸光度が上昇するの可能性が考えられる。しかし、単一の  $Sop_n$  を定量する場合は発色の度合いを重視して、発色のための加熱時間を 30 分よりも伸ばすことも可能であろう。

MBTH 法が他の定量法より発色が良かったのは MBTH の反応性の高さゆえであると考えられる。還元糖の比色定量法では還元糖の還元力を利用する方法が一般的である。アルドース

はアルデヒド基を有するため還元力を示す。ケトースはケト-エノール互変異性により溶液中で一部がアルドースへと異性化するために還元力を示す。DNS 法、Tetrazolium blue 法、Ferricyanide 法は還元糖の還元力により試薬が還元されて発色する (Fig. 10)。これらの方法で発色が悪い、もしくは重合度が高くなるにつれて発色が悪くなったのは Sop<sub>ns</sub> では還元末端のグリコシドの 2 位にグリコシド結合で糖が結合しており、還元力を示す 1 位のアルデヒド基に試薬が接近することが困難であるからだと考えられる。一方で、PAHBAH 法と MBTH 法では試薬が直接糖と結合する (Fig. 9, 10)。

改良 MBTH 法で Sop<sub>ns</sub> を定量する際の DL と QL は 0.041 mM と 0.12 mM であり、GOPOD 法の QL が 0.5 mM 程度であることを考慮するとオリゴ糖の比色定量法としては十分な感度と言える。また、改良 MBTH が酵素のアッセイに使用できるかを調べるために、酵素アッセイに一般的に用いられるグッドバッファーをはじめとする緩衝液等が発色に与える影響を調べた。多くの緩衝液は 100 mM までの濃度で発色を著しく阻害しなかった。また、一般的な塩である NaCl と硫酸アンモニウムも発色を阻害しなかった。金属のキレート剤としてよく用いられる EDTA は 5 mM 程度の濃度であれば発色を阻害しなかったため、酵素の金属要求性などを調べる目的であれば、使用に大きな問題はないと考えられる。リン酸など Fe<sup>3+</sup> の役割を阻害する一部の緩衝液を避ければ酵素アッセイに使用可能と考えられる。

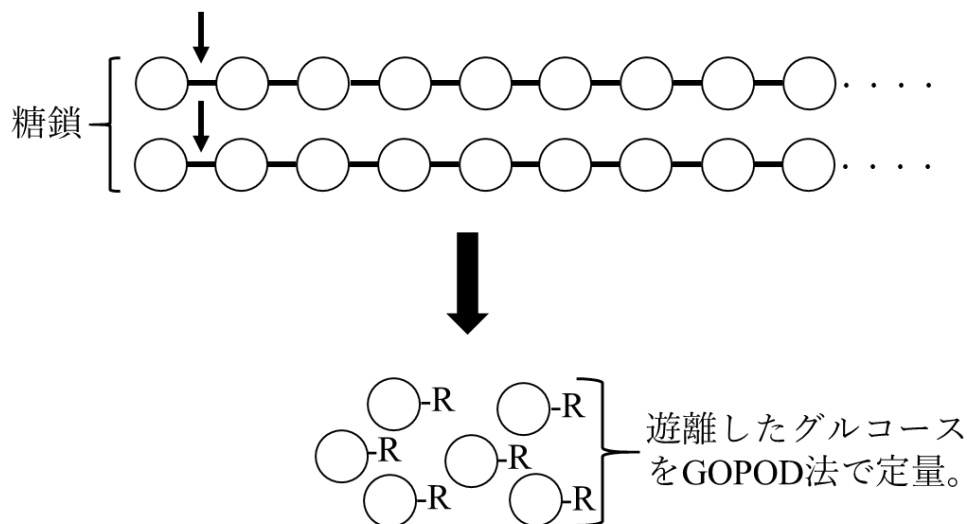
改良 MBTH 法では  $\beta$ -1,2-グルカナーゼの活性を正確に測定することができた。CpSGL の分解産物は Sop<sub>2</sub> 以上であり、グルコースは生産しない。そのため、改良 MBTH 法で活性を正確に定量することができる。CpSGL の文献では pH・温度依存性では LiBGL を組み合わせた方法で測定しているが、LiBGL はグルカンへの活性も少しあり、生成物の Sop<sub>ns</sub> の比率は不明であり、さらにグルコースに分解される比率も不明なので、これらの方法で SGL 活性の正確な定量は困難である。BGL の組み合わせで正確に定量するには  $\alpha$ -1,4-グルコオリゴ糖の修飾基質を使用してエンド型の 4- $\alpha$ -glucanotransferase の transgerase 活性を調べているように非還元末端をブロックし、還元末端に pNP などの発色試薬を結合した人工基質を用いる必要がある (42)。CpSGL の文献では基質濃度 0.2% 時の比活性は 26 U/mg であるが、本研究で求めた比活性は 144 U/mg であった。この文献では PAHBAH 法を用いており、Sop<sub>4</sub> の検量線を使用している。しかし、PAHBAH 法は Sop<sub>ns</sub> の鎖長が長くなるほど発色が低くなり、CpSGL の反応初期段階では長い鎖長の Sop<sub>ns</sub> が多く含まれると予測されるため、比活性が低く見積もられたと考えられる。

$\beta$ -1,2-グルカン関連酵素やタンパク質は研究が進みつつある。例として、 $\beta$ -1,2-グルコシダーゼ、Sop<sub>2</sub> を遊離する酵素、Sop<sub>ns</sub> 結合タンパク質などが報告された (43–46)。本研究で確立した比色定量法は、これらのグループの酵素やタンパク質の研究に寄与すると考えられる。

図

A

グルコシダーゼが糖鎖の末端からグリ  
コシド結合を加水分解により切断。



B

グルカナーゼが糖鎖ランダムな位置の  
グリコシド結合を加水分解により切断。

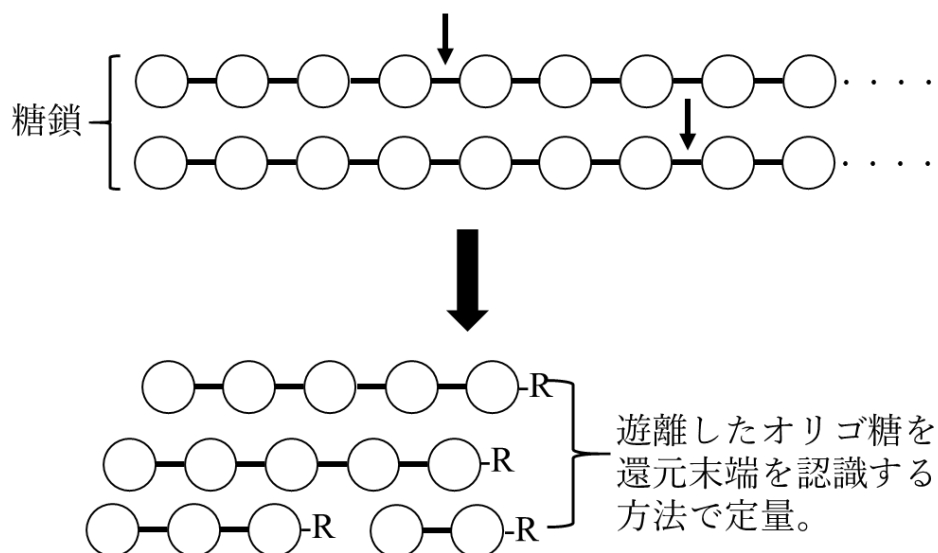


Fig. 1. 比色定量を用いた糖加水分解酵素のアッセイ

比色定量法を用いたグルコシダーゼ (A) とグルカナーゼ (B) の活性測定方法。-R は還元末端を示す。

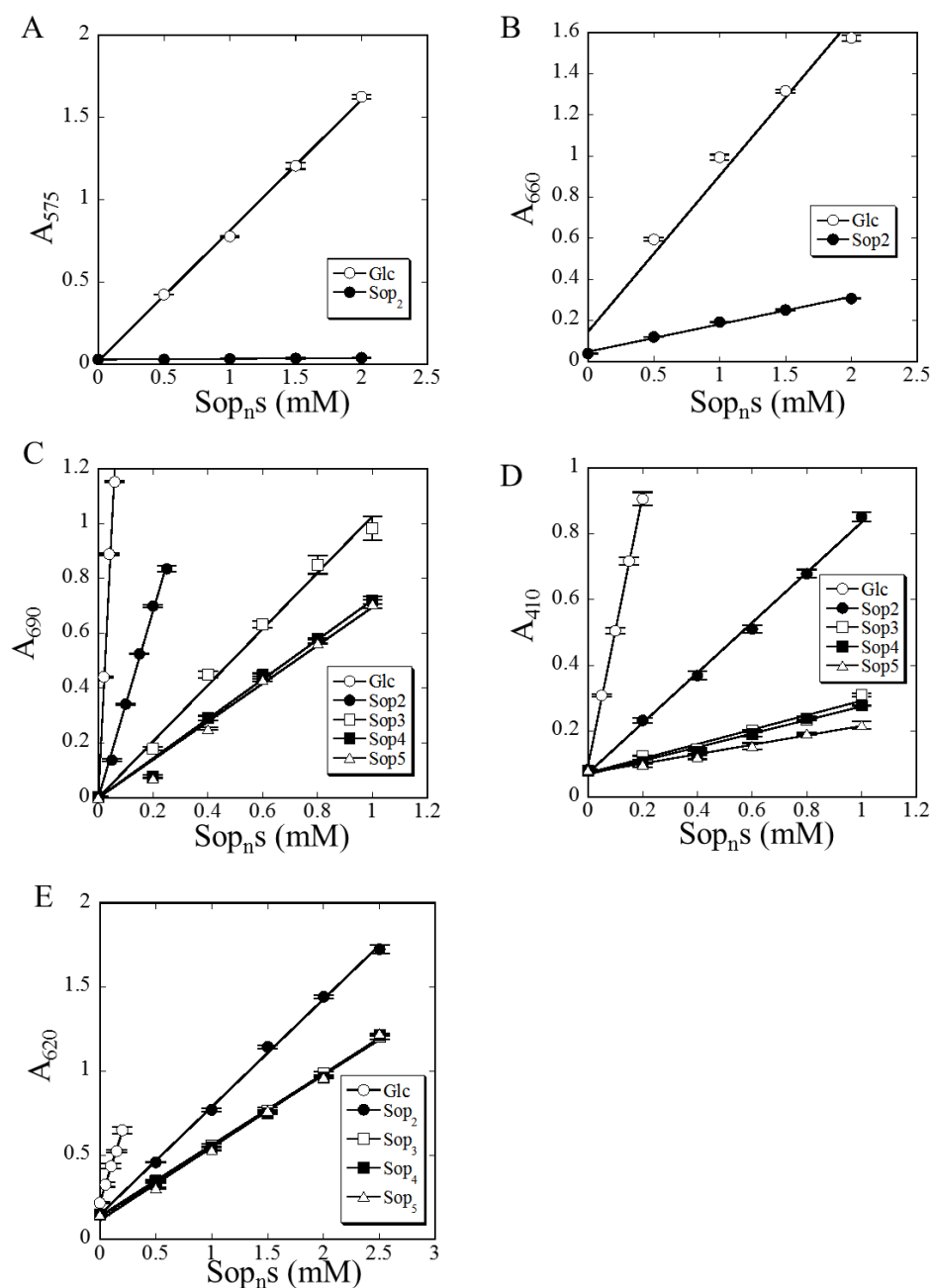


Fig. 2. 様々な比色定量法の検量線

グルコースと Sop<sub>2</sub> を用いた DNS 法 (A)、Tetrazolium blue 法 (B) の検量線およびグルコースと Sop<sub>2-5</sub> を用いた ferricyanide 法 (C)、PAHBAH 法 (D)、Anthon-MBTH 法 (E) の検量線。○、●、□、■、△は、それぞれグルコース、Sop<sub>2</sub>、Sop<sub>3</sub>、Sop<sub>4</sub>、Sop<sub>5</sub>を示す。横軸は用いた糖溶液の濃度を示す(終濃度ではない)。n = 3; エラーバーは標準誤差 (SE) を示す。

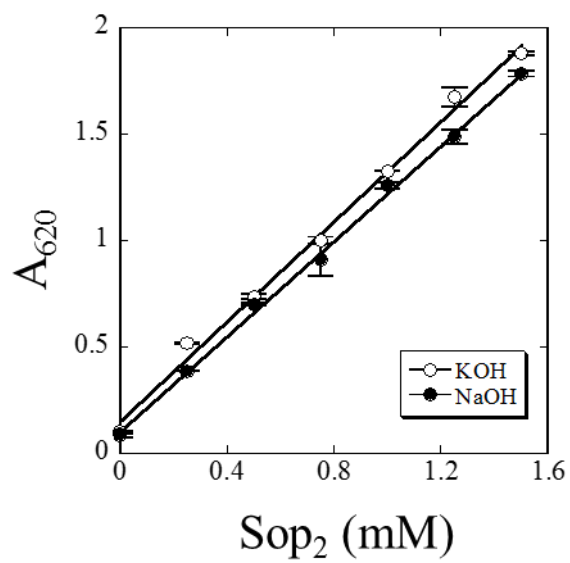


Fig. 3. NaOH と KOH を用いた際の Sop<sub>2</sub> の検量線

Anthron-MBTH で塩基溶液に NaOH (●) と KOH (○) を用いた際の検量線。n=3; エラーバーは標準誤差(SE)を示す。

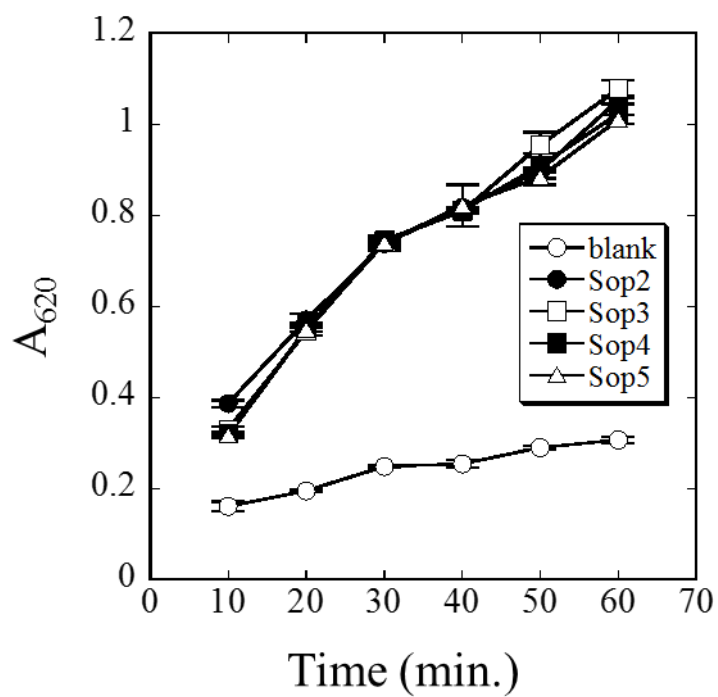


Fig. 4. Anthon-MBTH 法で熱処理の時間を変更した際の発色に与える影響  
 0 - 60 分の範囲で熱処理時間の影響を調べた。○、●、□、■、△は、それぞれblank、Sop<sub>2</sub>、Sop<sub>3</sub>、Sop<sub>4</sub>、Sop<sub>5</sub>を示す。n = 3; エラーバーは標準誤差 (SE) を示す。



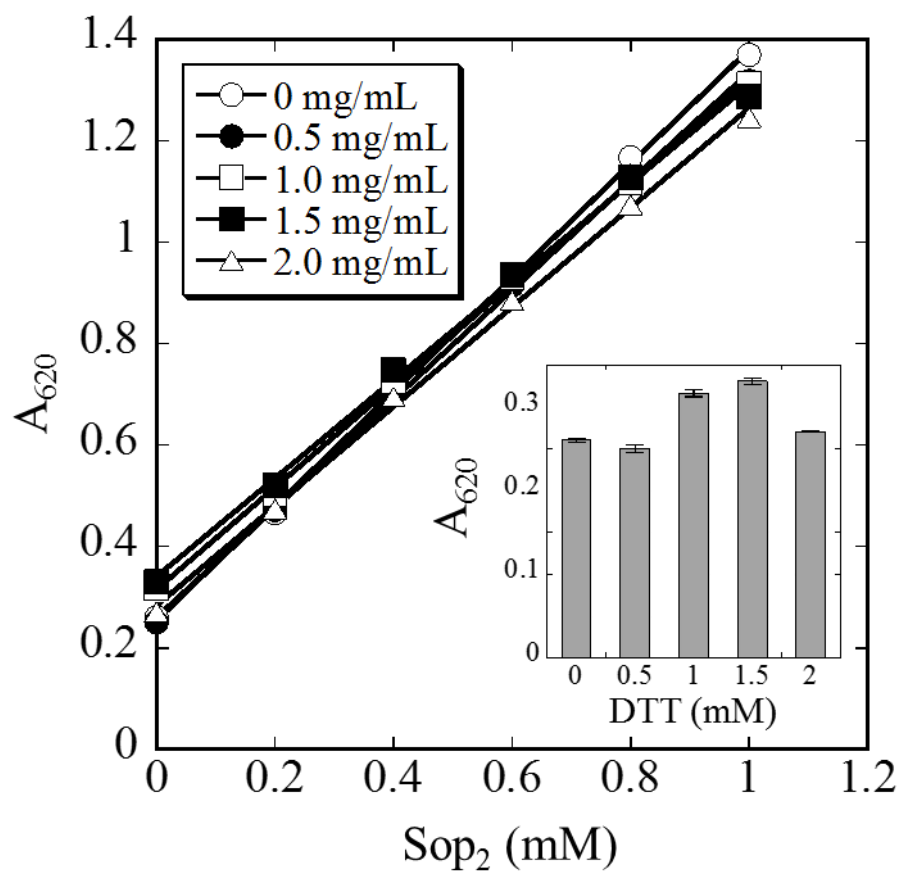


Fig. 5. Anthon-MBTH 法において DTT 濃度が発色とバックグラウンドに与える影響  
 DTT 濃度は 0 (○), 0.5 (●), 1.0 (□), 1.5 (■), 2.0 (△) mM を用いた。n=3; エラーバーは標準誤差 (SE) を示す。

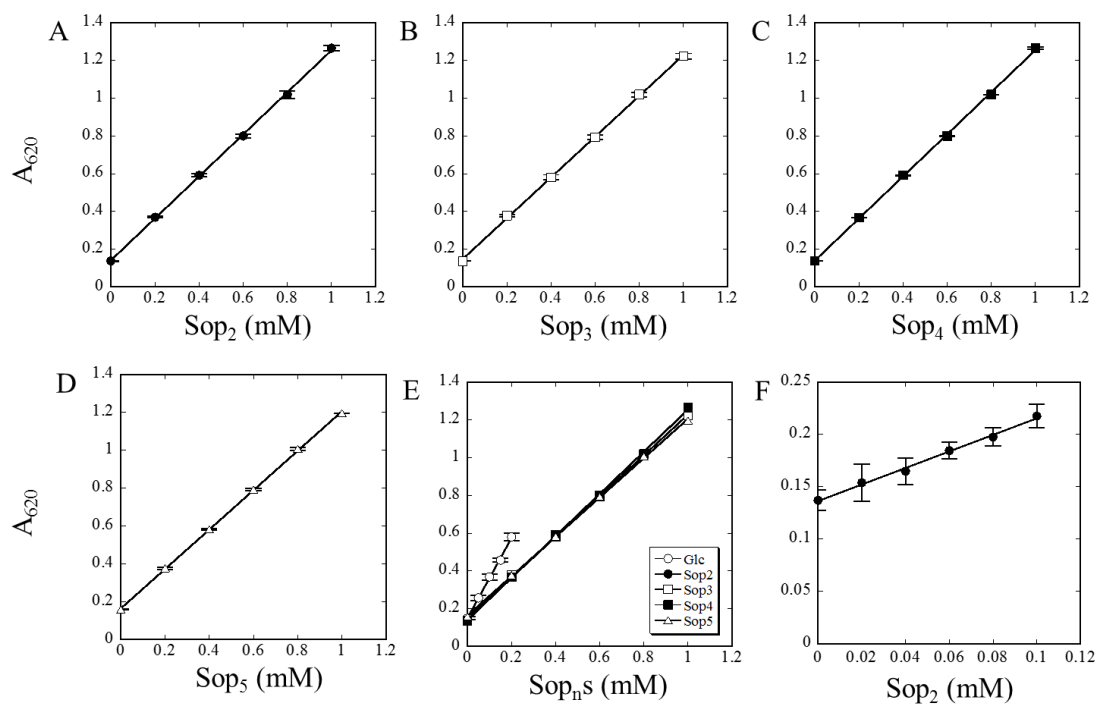


Fig. 6. 改良 MBTH 法の Sop<sub>n</sub>s の検量線

○、●、□、■、△は、それぞれグルコース、Sop<sub>2</sub>、Sop<sub>3</sub>、Sop<sub>4</sub>、Sop<sub>5</sub>を示す。(A) Sop<sub>2</sub>, (B) Sop<sub>3</sub>, (C) Sop<sub>4</sub>, (D) Sop<sub>5</sub>, (E) Sop<sub>2-5</sub>, (F) Sop<sub>2</sub> (低濃度)。n = 3; エラーバーは標準誤差 (SE) (A-E) もしくは標準偏差 (F) を示す。

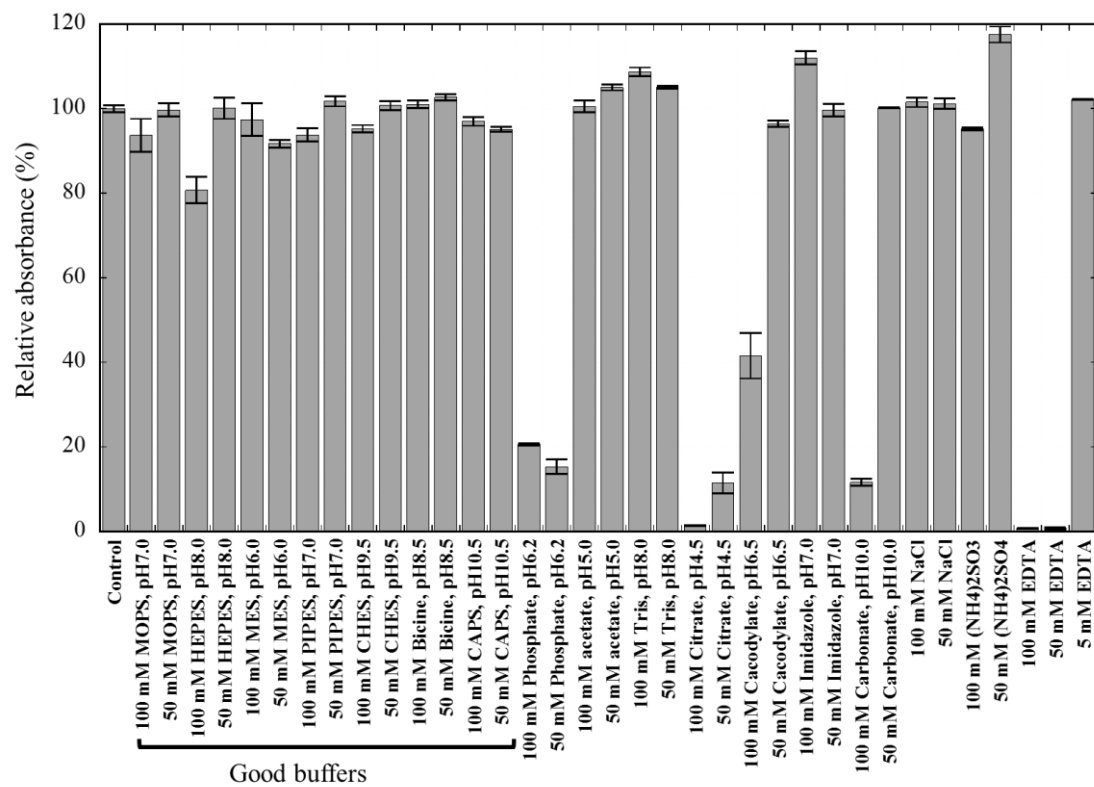


Fig. 7. バッファー成分、塩、EDTA が改良 MBTH 法に与える影響  
0.5 mM Sop<sub>2</sub> を用いて発色させた。n = 3; エラーバーは標準誤差 (SE) を示す。

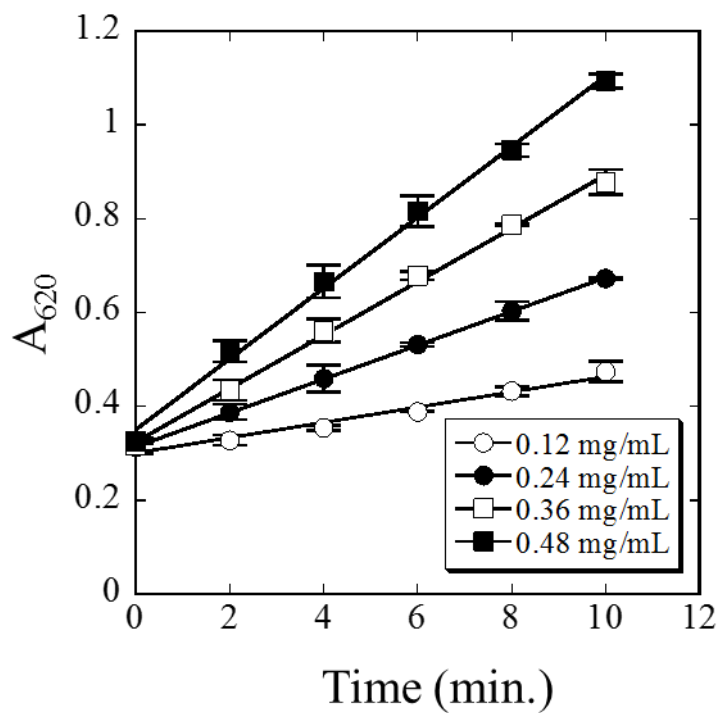


Fig. 8. CpSGL による  $\beta$ -1,2-グルカンの加水分解物の時間経過による増加  
改良 MBTH 法で還元力のモニターを行った。CpSGL 濃度は 0.12 (○), 0.24 (●), 0.36 (□), 0.48 (■)  $\mu$ g/mL で行った。直線の傾きは酵素濃度が低い方から順に 0.016、0.036、0.057、0.075 であった。n = 3; エラーバーは標準誤差 (SE) を示す。

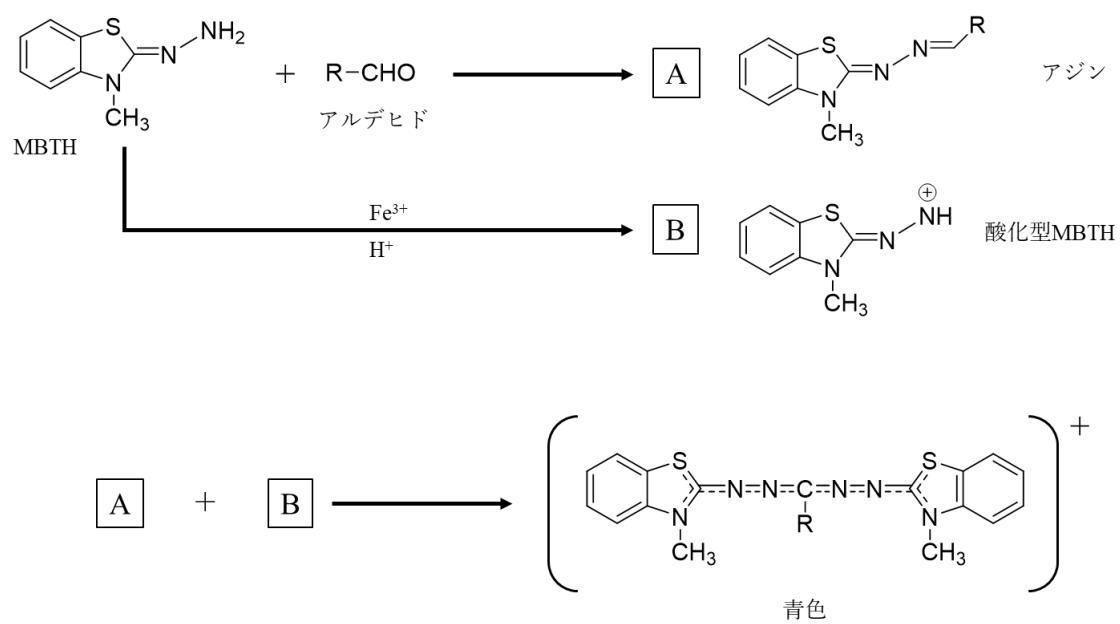
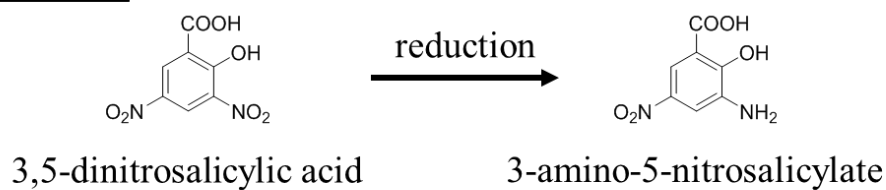
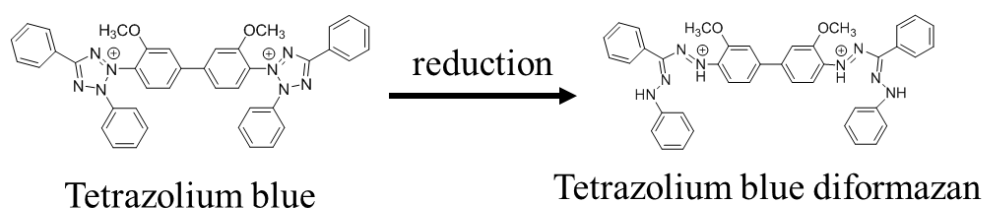


Fig. 9. MBTH 法の反応様式

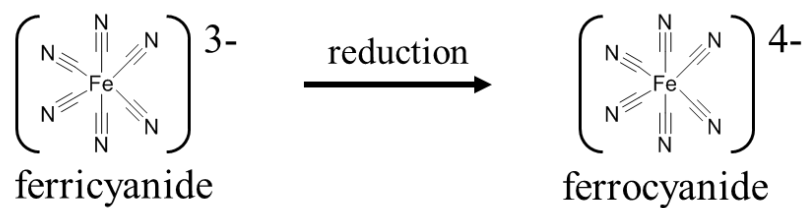
### DNS法



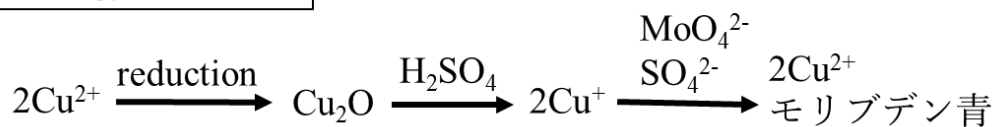
### Tetrazolium blue法



### Ferricyanide法



### Somogyi-Nelson法



### PAHBAH法

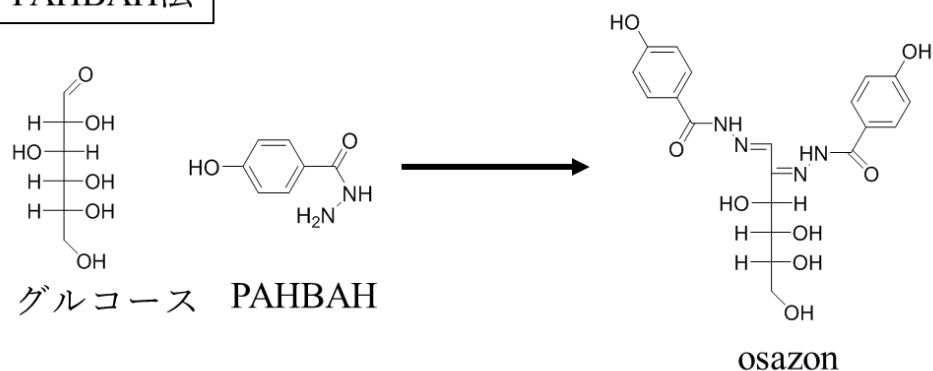


Fig. 10. 各比色定量法の原理

DNS 法、Tetrazolium blue 法、Ferricyanide 法、Somogyi-Nelson 法、PAHBAH 法の原理を示す。

表

Table 1. 各比色定量法のミリモル吸光係数

	Glc	Sop <sub>2</sub>	Sop <sub>3</sub>	Sop <sub>4</sub>	Sop <sub>5</sub>
DNS	3.18	0.187	-	-	-
Tetrazolium blue	15.2	2.67	-	-	-
PAHBAH	24.7	4.57	1.31	1.23	0.861
Ferricyanide	67.6	11.4	3.42	2.4	2.32
Anthon-MBTH	21.2	6.41	4.24	4.21	4.34

ミリモル吸光係数 ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) は発色した溶液中に含まれる糖の濃度を用いて検量線の傾きから計算した。-はデータがないことを示す。

## 第 2 章

### $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖に作用する新規糖転移酵素の 機能と構造の解明



## 導入

糖鎖には様々な種類があり、それに関連する酵素も様々である。 $\beta$ -1,2-グルカンは 1950 年頃植物病原菌の分泌する物質として発見された糖鎖 (47) で後にそれが環状糖であることが明らかとなり (19)、環状糖の合成酵素の酵素機能や生理機能の解析が進められた。一方で、分解酵素については 1961、1983、1987 年にグルカナーゼとグルコシダーゼについての活性の報告が 3 報あるのみであり、 $\beta$ -1,2-グルカンの分解酵素として遺伝子同定されたものは皆無であった(38, 48, 49)。現在、 $\beta$ -1,2-グルカン/グルコオリゴ糖に働く酵素やタンパク質は、 $\beta$ -1,2-グルカナーゼ (GH144) (46, 50)、 $\beta$ -1,2-ソホオリゴグルカンホスホリラーゼ (SOGP, GH94) (51, 52)、 $\beta$ -1,2-グルコシダーゼ (BGL, GH3) (44)、 $\beta$ -1,2-glucooligosaccharide binding protein (SOBP) (53)が報告されているがその酵素群探索の流れは以下のとおりである。まず初めに本研究室より新規活性を示す酵素である *Listeria innocua* 由来の SOGP (LiSOGP) が発見された。SOGP は  $\beta$ -1,2-グルカンを加リン酸分解する酵素であり、逆反応を用いることで  $\beta$ -1,2-グルカンを経易に合成できる酵素である。この酵素を用いることでそれまで調製困難であった  $\beta$ -1,2-グルカンの大量合成が容易となった (54)。また、SOGP による Sop<sub>ns</sub> の酵素合成も可能となり、 $\beta$ -1,2-グルカン関連酵素群を本格的に探索することが可能となった。その後、LiSOGP と同じクラスターにコードされている推定 BGL や推定 ABC トランスポーターの糖結合サブユニットの機能構造解析によって、これらがそれぞれ SOGP の加リン酸分解産物を基質としてグルコースに分解する、SOGP の基質と高い結合能を示す (SOGP の基質を細胞内に取り込む) ことが明らかとなった。これらの基質特異性から、この 3 つの酵素、タンパク質が協同的に Sop<sub>ns</sub> の代謝に関与することが強く示唆された (44, 53)。また、LiBGL のホモログとして  $\beta$ -1,2-グルカンに作用する腸内細菌由来 BGL も同定されている。これは直鎖状の糖鎖のみに作用するので環状糖の存在を判定するツールとしても用いることができる。さらに、合成した  $\beta$ -1,2-グルカンを用いてそれまで活性のみが報告されていた SGL が単離同定され、*Chitinophaga pinensis* 由来 SGL の組み換え酵素 (CpSGL, 第 1 章と同じ酵素) の機能、構造解析の結果に基づいて新たなファミリー GH144 が創設された (50)。そして、GH144 のホモログの探索により腸内細菌 *Parabacteroides distasoni* 由来の新規酵素である  $\beta$ -1,2-グルカンの非還元末端から 2 糖ずつを切り出す酵素も発見されている。このように近年、 $\beta$ -1,2-グルカン/グルコオリゴ糖に働く酵素やタンパク質は研究が進んできているが、依然として他の糖鎖に働く酵素・タンパク質に比べて研究が進んでいないのが現状である。CpSGL はゲノム上で単独で存在していてクラスターを形成していない。しかし、GH144 ホモログの由来の細菌ではゲノム上にホモログ遺伝子の周辺に遺伝子クラスターを形成しているものが多数存在し、その中に糖質関連酵素と推定される遺伝子が含まれている。特定の基質の代謝に協同的に関わる糖質関連の酵素やタンパク質では、これらをコードする遺伝子がオペロンやクラスターを形成していることが多い。例として、糖質関連酵

素では Starch utilization system (Sus) オペロンが知られている (55)。Sus オペロンでは、デンプンをマルトオリゴ糖へと分解する  $\alpha$ -アミラーゼ (Sus G)、糖鎖へ結合するタンパク質 (Sus D, E, F)、マルトオリゴ糖をペリプラズムへ輸送するタンパク質 (Sus C)、マルトオリゴ糖をグルコースへと分解する  $\alpha$ -グルコシダーゼ (Sus B) やネオプルラーナーゼ (Sus A) といったデンプンの代謝で協働して働く酵素やタンパク質がオペロンを形成している。このような組み合わせで働くタンパク質や酵素はデンプンの代謝系に限らない。しかし、どのような代謝を行うか判明していないものはかなり多い。そこで本章では、SGL のホモログでオペロンや遺伝子クラスターを形成しているものを探し、その近辺にコードされている  $\beta$ -1,2-グルカン/グルコオリゴ糖を基質とする酵素を探索し、その機能と立体構造の解明を目指した。新規性のある酵素であれば、立体構造を明らかにすることによって基質の認識方法などを既存の酵素と比較してなぜ異なる活性を示すのかを解明できる。

## 方法

### SGL ホモログの遺伝子クラスター探索

ゲノム上で遺伝子クラスターを形成している遺伝子群のコードするタンパク質同士は関連する機能を持つことが多い。そのため、CpSGL をアミノ酸配列で BLAST (blastp) にかけて CpSGL のホモログを収集し、これらのホモログをコードする遺伝子が含まれるクラスターから GH ファミリーとアノテーションされている配列を探した。データベースは KEGG (<https://www.genome.jp/>) を使用した。

### 機能未知 GH35 酵素のクローニング

*Ignavibacterium album*、*Chloroflexus* sp. Y-400-fl の CpSGL ホモログ遺伝子の近くにコードされている GH35 とアノテーションされている配列 (IALB\_1185 (IaSGT), Chy400\_4177 (ChSGT)) をクローニングした。それぞれのゲノム (Leibniz Institute DSMZ, German) から PCR 法で目的遺伝子を増幅し、精製した。PCR は KOD-plus- (TOYOBO, Japan)、増幅 DNA の精製は High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, ) を用いた。プライマーは、以下のものを用いた。

IaSGT:

5'-GAATTTAAACAATcAtATGAAGCCGCATAATTCTG-3' (forward)

5'-TAAAAAGTTcTcgagTTTGTCTCTTTTATAAC-3' (reverse)

ChSGT:

5'-CAAAGGAAGTcaTATGCCTGCATTACCGCTC-3' (forward)

5'-AGCTGCCTGCACTActCgagTGTCGTTCTGATGG-3' (reverse)

制限酵素 NdeI、XhoI で精製 DNA と pET30a を処理後、アガロースゲル電気泳動を行い、切断された DNA のバンドを切り出し、High Pure PCR Product Purification Kit で抽出した。精製 DNA を用いてライゲーションを行い、*Escherichia coli* BL21 (DE3) 及び *E. coli* B834 (DE3) を形質転換した。発現させるタンパク質の C 末端に 6×His-tag が付加されるように発現系を構築した。

### 酵素の発現、精製

大腸菌を 30 µg/mL のカナマイシンを含む LB 培地で一晚 37°C で前培養した。前培養液を 30 µg/mL のカナマイシンを含む新しい LB 培地に 1/100 量加え、37°C で本培養を行った。培地の OD<sub>600</sub> が 0.7 程度に達した後、1 M IPTG を培地の 10<sup>-4</sup>量加え、20°C で一晚誘導を行った。培養液を 5640 ×g、10 分間遠心し、菌体を回収した。菌体を 50 mM MOPS, 10 mM Imidazole, pH7.5 で懸濁し、-30°C で保存した。溶解した懸濁液中の菌体をソニケーションによって破碎し、13000 rpm、10 分間遠心し、上清を回収した。HisTrap FF crude 5 mL (GE

Healthcare, UK) を用いて細胞抽出液から His-tag 融合タンパク質を精製した (50 mM MOPS buffer, pH7.5, 20–500 mM imidazole linear gradient)。目的タンパク質が含まれるフラクションを回収し、等量の 3 M 硫酸アンモニウム溶液を加えた。このサンプルをブチルカラム (HiTrap Butyl HP, GE Healthcare) にかき、さらなる精製を行った (50 mM MOPS buffer, pH7.0, 1.5–0 M 硫酸アンモニウム linear gradient)。目的タンパク質が含まれるフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 Ultracel-30K (Merck Millipore, USA)を用いて、IaSGT は 5 mM MOPS buffer, pH7.0, 100 mM 硫酸アンモニウム, 5 mM DTT、ChSGT は 5 mM MOPS buffer, pH7.0 にバッファー交換及び濃縮した。IaSGT を精製する際に用いた緩衝液には 1 mM DTT が含まれているものを用いた。IaSGT のセレノメチオニン置換体は *E. coli* B834 (DE3) を Se-Met core 培地 (日本製薬株式会社、日本) に KAO AND VITAMIN SOLUTION (100×) (SIGMA-ALDRICH, ) とセレノメチオニン (WAKO, Japan) 加えた培地で培養し、同様に精製した。酵素濃度は  $A_{280}$  の吸光度を測定し、アミノ酸配列から推測されるモル吸光係数を用いて算出した。IaSGT と ChSGT の推定されるモル吸光係数はそれぞれ  $113080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、 $116405 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  である。

### IaSGT、ChSGT の基質の探索

各種糖 (cellobiose ( $\text{Cel}_2$ ), cellotriose ( $\text{Cel}_3$ ), cellotetraose ( $\text{Cel}_4$ ), cellopentaose ( $\text{Cel}_5$ ), laminaribiose ( $\text{Lam}_2$ ), laminaritriose ( $\text{Lam}_3$ ), laminaritetraose ( $\text{Lam}_4$ ), laminaripentaose ( $\text{Lam}_5$ ),  $\beta$ -1,2-glucooligosaccharides (sophorose ( $\text{Sop}_2$ ), trisaccharide ( $\text{Sop}_3$ ), tetrasaccharide ( $\text{Sop}_4$ ), pentasaccharide ( $\text{Sop}_5$ ) and hexasaccharide ( $\text{Sop}_6$ )), maltose, gentibiose, melibiose, sucrose and lactose) と IaSGT および ChSGT を 0.2 mg/mL、酢酸ナトリウム (NaOAc) buffer, pH5.0、30°C で一晩反応させ、TLC で解析した。シリカゲルプレート (TLC Silica gel 60, Merck, Germany) にサンプルを 0.5  $\mu\text{L}$  アプライし、十分に乾燥させた。75% アセトニトリルで展開し、十分に乾燥させた後、5% 硫酸/エタノールに浸し、オーブンで加熱した。

### IaSGT、ChSGT の温度、pH プロファイル

至適 pH の測定では、20 mM の緩衝液 (Britton-Robinson buffer, pH 3-12 and NaOAc buffer, pH 4.5-5.5)、20 mM  $\text{Sop}_3$ 、酵素 (13.9  $\mu\text{g}$  ChSGT or 5.6  $\mu\text{g}$  IaSGT) を含む反応液 (50  $\mu\text{L}$ ) を作製し、37°C、60 分で反応を行い、100°C で 5 分間熱処理し酵素反応を停止した。至適温度の測定では、20 mM NaOAc buffer (NaOAc/ $\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 5.0)、20 mM  $\text{Sop}_3$ 、酵素 (13.9  $\mu\text{g}$  Chy400\_4177 or 5.6  $\mu\text{g}$  IALB\_1185) を含む反応液 (50  $\mu\text{L}$ ) 中で、20–80°C、60 分間反応を行った。pH 安定性の解析では、酵素溶液を各 pH に 37°C で 60 分間さらした後、残存活性を測定した。温度安定性の解析では、各温度で 60 分間酵素溶液 (IaSGT は 5.6 mg/ml、ChSGT は 14 mg/mL) をインキュベートした後、残存活性を測定した。活性の測定は  $\text{Sop}_3$  に対しての糖転移活性の際に遊離する  $\text{Sop}_2$  を HjCel3A によってグルコースへ分解し、グルコースを GOPOD 法によって定量することで測定した。HjCel3A は  $\beta$ -グルコシダーゼであり、 $\text{Sop}_{\text{ns}}$  の

中では Sop<sub>2</sub> のみを加水分解し、重合度 3 以上の Sop<sub>n</sub>s には働かない。それぞれのサンプルに 0.1 mg/mL HjCel3A を含む 100 mM NaOAc buffer (pH 5.5) を等量加え、40°C、30 分間反応させた。GOPOD 溶液 (Megazyme, Ireland) 300 µL にサンプル 10 µL を加え、45°C、20 分間反応させた。A<sub>510</sub> を測定し、グルコース濃度を算出した。グルコースをスタンダードとして用いた。

### 加水分解活性、加リン酸分解活性の確認

IaSGT および ChSGT が Sop<sub>3</sub> に対して糖転移活性だけではなく加水分解及び加リン酸分解活性を持つか調べた。10 mM Sop<sub>3</sub> を酵素 (終濃度は IaSGT; 0.11 mg/mL、ChSGT; 0.28 mg/mL) を 50 mM NaOAc buffer, pH5.0 (加水分解測定用) もしくは 100 mM リン酸バッファー, pH7.0 (加リン酸分解測定用) 中で混合し、37°C、60 分間反応させ、100°C で 5 分間熱処理し酵素反応を停止した。それぞれ糖転移反応の産物である Sop<sub>2</sub> を前セクションの方法で定量し、加水分解活性により生成するグルコースは GOPOD 法で定量した。加リン酸分解は G1P を phosphoglucumutase (PGM)-glucose と 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) を組み合わせた方法で定量した。10 µL の酵素反応後のサンプル溶液を 90 µL の反応溶液 (50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5), 1 mM thio-NAD<sup>+</sup> (Oriental Yeast, Tokyo, Japan), 10 µM glucose-1,6-bisphosphate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 U/mL PGM from rabbit muscle (Sigma-Aldrich), 10 U/mL G6PDH from *Leuconostoc mesenteroides* (Oriental Yeast)) と混合し 30°C で 20 分間反応させ、thio-NADH の吸収波長である 398 nm の吸光度を測定し、G1P 濃度を算出した。

### IaSGT、ChSGT の Sop<sub>n</sub>s に対する速度論量的解析

IaSGT および ChSGT の Sop<sub>2-5</sub> に対しての反応速度論量を解析した。各濃度の Sop<sub>n</sub>s と酵素 (終濃度は IaSGT: 0.11 mg/mL、ChSGT: 0.28 mg/mL) を 50 mM NaOAc buffer, pH5.0 中で混合し、37°C、60 分間反応させ、100°C で 5 分間熱処理し酵素反応を停止した。Sop<sub>2</sub> への活性はグルコースを GOPOD 法によって定量した。Sop<sub>3</sub> への活性は上記の方法で測定した。Sop<sub>4</sub> への活性は反応産物である Sop<sub>5</sub> を CpSGL (Sop<sub>4</sub> 以下は基質とせず、Sop<sub>5</sub> 以上を加水分解する) で分解し、遊離した Sop<sub>2</sub> を HjCel3A で分解し、GOPOD 法でグルコースを定量した。Sop<sub>5</sub> への活性は、反応液に 1 M NaBH<sub>4</sub> を 1/5 量加え、1 時間反応し反応液中のオリゴ糖の還元末端を還元したのち、還元された Sop<sub>6</sub> を CpSGL で Sop<sub>3</sub> と還元された Sop<sub>3</sub> へと分解し、改良 MBTH 法で 3 糖を定量した。重合度 5 以下の Sop<sub>n</sub>s は還元末端を還元されると CpSGL によって分解されない。Grafit ver. 7.0.3 で Michaelis-Menten の式にフィッティングし、反応速度論量を算出した。

### IaSGT の結晶構造解析

1 次スクリーニングはシッティングドロップ蒸気拡散法で行なった。この際、リザーバー溶

液として Wizard Classic 1&2 (Emerald Biosystem, Washington, USA)、PEG/Ion Screen (Hampton Research, USA)、Crystal Screen (Hampton Research) を用いた。リザーバー溶液と酵素溶液(3.5 mg/mL)を 1  $\mu$ L ずつ混合し、25°C で静置した。2 次スクリーニングはハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。プレートは VDX plate (Hampton Research)、カバーガラスは Siliconized Glass Circle Cover Slides (Hampton Research) を用いた。リザーバー溶液は 1 mL で、1 次スクリーニングで結晶が出た条件の沈殿剤や塩の濃度、緩衝液の pH などの条件検討を行った。リザーバー溶液と酵素溶液 (3.5 mg/mL) を 1  $\mu$ L ずつ混合し、25°C で静置した。最適なタンパク質結晶が出た条件である 10% PEG3,000、100 mM Tris-HCl, pH7.5、200 mM 酢酸カルシウム結晶化を行った。セレノメチオニン置換体は 12.5% PEG3,000、100 mM Tris-HCl, pH7.5、200 mM 酢酸カルシウムで結晶化を行った。X 線データの収集は全て高エネルギー加速器研究機構 (KEK Photon Factory, Ibaraki, Japan) のビームライン PF BL-5A および AR-NW12A にて行った。クライオプロテクトANTとして 20% PEG400 (終濃度) を含むリザーバー溶液に結晶を浸した後にデータ収集を行った。リガンドとの複合体構造は結晶を 20 mM のリガンドと 20% PEG400 を含むリザーバー溶液にソーキングして X 線結晶構造解析を行った。セレノメチオニン置換体を用いた位相決定は SAD 法で行った。回析画像の処理は iMosflm (56) もしくは XDS (57) で、位相決定は Phenix で、分子置換は Molrep (58) で行った。精密化には Refmac5 (59)、手動による精密化には Coot (60) を用いた。また、図の作成には PyMOL (61) を使用した。

#### ゲル濾過クロマトグラフィー

IaSGT および ChSGT のゲル濾過クロマトグラフィーを行った。流速は 0.5 mL/min で行った。IaSGT は 5 mM MOPS, pH 7.5, 100 mM 硫酸アンモニウム, 1 mM DTT、ChSGT は 5 mM MOPS, pH 7.5, 100 mM NaCl でカラムを平衡化した。Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) カラムにサンプル (0.5 mg protein, 500  $\mu$ L) をアプライし、IaSGT、ChSGT ともに平衡化バッファーと同じバッファーで溶出した。分子量マーカーは Gel Filtration Calibration Kit HMW (GE Healthcare) を用いた。マーカーの分子量はそれぞれ、ovalbumin: 43,000, conalbumin: 75,000, aldolase: 158,000, ferritin: 440,000, thyroglobulin: 669,000, blue dextran 2000: 2,000,000 である。グラフの値は、 $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$  の式に従って算出した。V<sub>t</sub> はカラム体積、V<sub>0</sub> は Blue Dextran 2000 の溶出体積、V<sub>e</sub> はその他のタンパク質の溶出体積。

#### 部位特異的変異導入

変異の導入には PrimeStar® Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa, Japan) を用いた。変異導入の確認は DNA シークエンシングにより確認した。変異導入のためのプライマーは以下のものを使用した。

IaSGT

E176Q

5'-CTGCAATCAAATTGGTGTGTTTCAATG-3'  
5'-CCAATTTGATTGCAGAGCTGCATCATT-3'  
E343Q  
5'-GGCTGCACAGTTTCAGGCAGGAACAAG-3'  
5'-TGAAACTGTGCAGCCCAAACAGGAGCT-3'  
E343G  
5'-GGCTGCAGGGTTTCAGGCAGGAACAAG-3'  
5'-TGAAACCCTGCAGCCCAAACAGGAGCT-3'

ChSGT  
E174Q  
5'-GATAACCAGATGGGAATGCTGCATTGG-3'  
5'-TCCCATCTGGTTATCGAGTTGGACCAT-3'  
E331Q  
5'-TCCATTCAAGTTTCAGGCGGGTGGCAAT-3'  
5'-CTGAAACTGAATGGAAAAGAGTGGTTG-3'  
E331G  
5'-TCCATTGGGTTTCAGGCGGGTGGCAAT-3'  
5'-CTGAAACCCAATGGAAAAGAGTGGTTG-3'

変異体の発現、精製は野生型の場合と同様に行った。

#### IaSGT の E343G 変異体のグライコシターゼ活性の測定

IaSGT E343G を用いてグライコシターゼ活性を調べた。2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl fluoride を脱アセチル化して  $\alpha$ -D-glucopyranosyl fluoride ( $\alpha$ -GlcF) を作製した。2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl fluoride (株式会社ペプチド研究所, Japan) を 100 mM となるようにメタノール (低水分溶剤) (nacalai tesque, Japan) に溶かし、ナトリウムメトキシド (wako, Japan) を 5 mM となるように添加した。氷上で 1 時間静置し脱アセチル化を行った後、減圧乾燥器で乾燥させた。50 mM NaOAc buffer, pH5.0 中で 10 mM  $\alpha$ -GlcF、各糖 10 mM、酵素濃度 90  $\mu$ g/mL となるように混合し、30°C、O/N で反応させ、TLC で解析した。糖は以下のものを用いた：Sop<sub>2</sub>、ゲンチオビオース、セロビオース、マルトース、トレハロース、スクロース、グルコース、 $\beta$ -メチルグルコース、キシロース、マンノース、フコース、ガラクトース、*p*NP- $\beta$ -glucoside (nacalai tesque)、*p*NP- $\alpha$ -glucoside (nacalai tesque)、*p*NP- $\beta$ -xyloside (nacalai tesque)、*p*NP- $\beta$ -galactoside (nacalai tesque)。  
また、グルコースをアクセプターとし、 $\alpha$ -GalF がドナーとなるかを調べた。IaSGT E343G を 70  $\mu$ g/mL、10 mM グルコース、10 mM  $\alpha$ -GlcF もしくは  $\alpha$ -GalF となるように 50 mM NaOAc

buffer, pH 5.0 中で混合し、37°で一晩反応した。反応後のサンプルは TLC によって解析した。TLC プレートにサンプルを 0.5  $\mu$ L ずつアプライし、80% (v/v) アセトニトリルで展開した。

#### IaSGT の配糖体基質の探索

IaSGT が配糖体をアクセプターとするかを調べた。50 mM NaOAc buffer, pH5.0 中で酵素と 10 mM Sop<sub>2</sub>、10 mM 配糖体を反応させた。配糖体は以下のものを用いた；methyl- $\alpha$ -glucoside (TCI, Japan), ethyl- $\alpha$ -glucoside (wako), phenyl- $\alpha$ -glucoside (Toronto Research Chemicals, Canada),  $\alpha$ -arbutin (EZAKI GLICO, Japan), *p*NP- $\alpha$ -glucoside (nacalai tesque), benzyl- $\alpha$ -glucoside (wako), 2-naphthyl- $\alpha$ -glucoside (Toronto Research), methyl- $\beta$ -glucoside (SIGMA-ALDRICH), *n*-octyl- $\beta$ -D-glucoside (DOJINDO LABORATORIES, Japan),  $\beta$ -arbutin (Combi-Blocks, USA), *p*NP- $\beta$ -glucoside (nacalai tesque), Gastrodin (TCI), salicin (Combi-Blocks), esculin (wako), amygdalin (wako)。反応は 37°C で一晩行った。活性は TLC により解析した。展開溶媒は 80% アセトニトリルを用いた。

#### IaSGT の配糖体をアクセプターとした際の反応速度論量

配糖体をアクセプターとした際の反応速度論量を測定した。Sop<sub>2</sub> の濃度を 1 mM で固定し、配糖体の濃度を変えて活性を測定した。活性は遊離したグルコースをヘキソキナーゼ (Hexokinase from Baker's Yeast, lyophilized powder, nacalai tesque) と G6PDH [G-6-P DH (L. M.); Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*, ORIENTAL YEAST, Japan] を用いて thio-NADH の増加を A<sub>398</sub> で測定し、算出した。ヘキソキナーゼ、G6PDH、ATP (nacalai tesque)、thio-NAD<sup>+</sup> (ORIENTAL YEAST)、MgCl<sub>2</sub> はそれぞれ終濃度が 100 U/mL、100 U/mL、1 mM、1 mM、10 mM となるように反応液を調製した。ドナー基質とアクセプター基質を加えて 37°C で 5 分間インキュベートし、酵素を加えて 37°C で反応を行った。1 分ごとに A<sub>398</sub> を測定し、直線となる範囲の傾きから反応速度を求めた。



## 結果

### SGL ホモログの遺伝子クラスターの探索

様々な生物種のゲノム上にコードされる SGL ホモログ遺伝子の近傍を探索した結果、多くの SGL ホモログ遺伝子でその周辺に遺伝子クラスターが形成されていた。その中で、*Ignavibacterium album* JCM 16511 と *Chloroflex aurantiacus* Y-400-fl のゲノム上にコードされる SGL ホモログ遺伝子の近傍に GH35 とアノテーションされている配列に着目した (Fig. 1)。これらの GH35 の近くには SGL の他にも GH94、GH3 といった  $\beta$ -1,2-グルカンへの活性が知られている GH のホモログや、糖輸送に関わる SOBP や ABC トランスポーターとアノテーションされている配列が存在する。したがって、GH35 とアノテーションされている配列も関連のある酵素である可能性があると考えた。しかし、GH35 は大部分が  $\beta$ -ガラクトシダーゼとして知られるファミリーであり、 $\beta$ -1,2 関連の活性は知られていないため、これらの酵素を解析することにした。

### IaSGT、ChSGT の系統解析

SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) でシグナルペプチドの予測を行ったところ、IaSGT および ChSGT はシグナルペプチドを有していなかった。機能既知の GH35 酵素と IaSGT および ChSGT のアミノ酸配列を用いて系統解析を行った (Fig. 2)。系統樹上では IaSGT、ChSGT およびそのホモログは既知の GH35 酵素とは異なるクラスターを形成していた。このクラスターには機能既知のものは存在しなかった。真核生物由来の GH35 は 2 つのクラスターに分かれており、細菌由来の GH35 は 1 つのクラスター、古細菌由来の GH35 は 1 つのクラスターにそれぞれまとまっていた。また、既知の GH35 酵素の中で最も相同性が高い酵素は古細菌由来の  $\beta$ -グルコサミニダーゼであったが、アミノ酸配列の相同性は 28%程度であり高いとは言えない。これらの新規 GH35 酵素の全体のアミノ酸配列は機能既知の GH 酵素と比べると保存性が低い。

### ChSgt、IaSGT の基質の探索

様々なオリゴ糖を用いて活性を探索した結果、IaSGT、ChSGT はセロオリゴ糖 (Cel<sub>2-5</sub>、 $\beta$ -1,4 結合のグルコオリゴ糖)、マルトース (Glc- $\alpha$ -1,4-Glc)、ゲンチオビオース (Glc- $\beta$ -1,6-Glc)、スクロース ( $\alpha$ -Glc-1,2- $\beta$ -Fru) には活性はなかった (Fig. 3AC)。さらに、多くの GH35 酵素が加水分解活性を示すラクトース ( $\beta$ -Gal-1,4-Glc) (Fig. 3C) や人工基質である pNP- $\beta$ -galactoside にも加水分解活性を示さなかった (data not shown)。しかし、Sop<sub>ns</sub> に対しては Sop<sub>2-5</sub> の全てに明確な活性があった (Fig. 4)。加水分解であれば、基質とした糖鎖よりも重合度が低い糖鎖が遊離するが、新規 GH35 酵素と Sop<sub>ns</sub> との反応では基質とした糖鎖よりも重合度が低い物だけではなく高い糖鎖も遊離しているため、これらの酵素は Sop<sub>ns</sub> に対して糖転移反応を

行っていると考えられる (Fig. 5)。糖転移と加水分解反応の反応様式は非常に似ているため両方の活性を有する可能性もある (Fig. 5)。しかし、時間経過とともに生成物が全体的に低分子側に偏らず、低分子側と高分子側の両方に進んでいくため、糖転移反応と加水分解反応では少なくとも糖転移反応がメインの反応であることは明らかである。また、IaSGT はラミナリオリゴ糖 ( $\beta$ -1,3 結合のグルコオリゴ糖) の 2 糖 (Lam<sub>2</sub>) に対しても糖転移活性を示したが、Sop<sub>ns</sub> と比較すると弱い活性であった (Fig. 3B)。反応後にグルコースが見えていないことから Lam<sub>2</sub> を Sop<sub>2</sub> へと変換する反応が起きていると推測できる。また、3 糖以上のラミナリオリゴ糖 (Lam<sub>3-5</sub>) には活性を示さなかった。ChSGT はいずれのラミナリオリゴ糖にも活性を示さなかった。

### IaSGT、ChSGT の温度、pH プロファイル

IaSGT の至適 pH は 5.0 (Fig. 6A)、至適温度は 60°C (Fig. 7A) であった。また、pH5-11 (Fig. 6C)、60°C まで安定 (Fig. 7C) であった。ChSGT の至適 pH は 5.0 (Fig. 6B)、至適温度は 55°C (Fig. 7B) であった。また、pH4-11 (Fig. 6D)、50°C まで安定 (Fig. 7D) であった。新規 GH35 酵素の至適 pH は酸性である pH5.0 であり (Fig. 6AB)、この性質は糖質加水分解酵素の性質と一致する。熱安定性においては 70°C でほぼ完全に失活するため (Fig. 7CD) 熱安定性が高いとは言えないが、IaSGT や ChSGT は温泉から単離された菌が由来であり、ある程度の温度までは耐えられる酵素であると言える。

### ゲル濾過クロマトグラフィー

ゲル濾過クロマトグラフィーから求められた IaSGT の分子量は 141000、ChSGT は 147000 であった (Fig. 8)。IaSGT および ChSGT の理論分子量は 84728.98 および 85782.19 であるため、これらの酵素は 2 量体を形成していると考えられる。

### IaSGT、ChSGT の Sop<sub>ns</sub> に対する速度論量的解析

IaSGT、ChSGT の速度論量を Table 1 に示す。ChSGT の  $k_{cat}$  は糖鎖が長くなるにつれて増加し、IaSGT は Sop<sub>3</sub> で最も高かったが酵素の反応速度としては低い値である。また、 $K_m$  の値も全体的に高い、つまり酵素の基質に対しての親和性も低いと言える。触媒効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) は共に Sop<sub>4</sub> でもっとも高かったが全体的に低い。従って、いずれの基質に対しても  $K_m$  が高く、触媒効率は低い。親和性が低いことから、アクセプター基質、もしくはドナー基質の少なくとも一方が不適である可能性がある。また、これらの酵素において加水分解活性および加リン酸分解活性は検出されなかった。加水分解、加リン酸分解ともに 20 mM Sop<sub>3</sub> を基質とした際の糖転移活性 (1.0 U/mg) と比較すると少なくとも 0.1% 以下である。

### IaSGT の全体構造と基質ポケット

IaSGT、ChSGT の X 線結晶構造解析を試みたが、ChSGT は反射の良い結晶が得られず、構

造が解けたのは IaSGT のみであった (Table 2)。IaSGT の結晶を Fig. 9 に示す。IaSGT のアポ構造は 1.75 Å の分解能であった。IaSGT 結晶の非対称単位には 2 分子が存在しており (Fig. 10A)、PDBePISA (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) による解析では 2 分子が会合している状態が安定であることが示唆された。この結果はゲル濾過クロマトグラフィーの結果と合致する。また、非対称単位中の 2 分子の RMSD 値は 0.493 Å であった。一つのサブユニットは 3 つのドメイン (( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (TIM バレル) domain (1–433 a.a.), Rossmann fold domain (434–650 a.a.), Ig like domain (651–717 a.a.)) から構成されていた (Fig. 10B)。IaSGT のアポ構造とホロ構造の全体構造は一部動いている領域があった。構造が明らかになっている既知の GH35 酵素 [PDB ID: 5GSM (古細菌由来  $\beta$ -ガラクトサミニダーゼ), 3THC (ヒト由来  $\beta$ -ガラクトシダーゼ、系統樹右), 4E8C (細菌由来  $\beta$ -ガラクトシダーゼ)] (62–64) との触媒ドメインの重ね合わせを行ったところ、触媒ドメインである ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> domain はよく重なった (Fig. 10C)。(  $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> domain 比較した酵素間で重なっていなかった。IaSGT と構造を比較した既知の GH35 酵素とのアミノ酸配列の相同性は 21–28% と高くはなかったが、触媒ドメインの 3 次構造はよく保存されていると言える (Fig. 10C)。触媒ドメインのみの構造を Dali server (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/>) で解析したところ、Z-score は 5GSM の Chain A で 47.1、3THC の chain B で 38.4、4E8C の chain A で 37.6 であった。これら比較対象の GH35 酵素の基質と IaSGT-Sop<sub>2</sub> 複合体の Sop<sub>2</sub> の位置が重なったので、( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> domain の中心付近が基質ポケットであると示唆された。基質ポケットの重ね合わせでは基質ポケット付近のアミノ酸の位置はよく保存されていた。既知 GH35 酵素の触媒残基の位置も IaSGL の E343 と E176 とよく重なり、また、この 2 残基は既知の GH35 酵素とのアミノ酸配列のアライメントでも保存されていた (Fig. 11)。これらのアミノ酸に変異を導入した (E174Q, E343Q) 結果、10 mM の Sop<sub>3</sub> を基質とした際の糖転移活性が野生型の 1% 以下と活性が失われていたことから、E174 と E343 はそれぞれ求核触媒残基、酸/塩基触媒残基と推定された。また、比較に用いた既知の GH35 酵素はサブサイト –1 (Fig. 12) に基質が結合しているので、Sop<sub>2</sub> との複合体構造は –1 から +1 に結合していると示唆された (Fig. 13)。

### IaSGT 結晶の非対称単位中の 2 分子の構造比較

非対称単位中の 2 分子全体の RMSD 値は 1.0 Å 以下と高い類似性を示したが、各ドメインごとの比較では ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> domain (1–433 a.a.), Rossmann fold domain (434–650 a.a.), Ig like domain (651–717 a.a.) のそれぞれで、0.462、0.136、0.261 Å であり、2 サブユニット間の構造の違いは主に ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> domain に由来していた。基質結合部位周辺の領域 (可変領域) で構造の変化が大きく、基質が結合した構造ではサブユニット B の構造はサブユニット A に近づいていた (Fig. 14)。また、DNJ との複合体ではサブユニット A のみにリガンドが観察され、Sop<sub>4</sub> との複合体構造ではサブユニット A の基質と比べてサブユニット B の基質は電子密度が不明瞭であることから、サブユニット A が基質と結合したときの構造でありサブユニット B が基質と結合していないときの構造と考えられる。Sop<sub>2</sub> とグルコースとの複合体では

どちらのサブユニットにも基質が観察されたが、アポ型酵素と比較してサブユニット B の可変領域はわずかにサブユニット A 型に近づいた程度であった。これは、結晶構造では溶液中での構造とは異なりサブユニット B の可変領域が symmetry mate (非対称単位外の隣の分子) と接触しており、基質の結合による可変領域の動きを制限しているから、つまり、クリスタルパッキングの影響のためであると考えられる。

### IaSGT の基質、基質アナログとの複合体構造

野生型の IaSGT と Sop<sub>2</sub> の複合体構造では、Sop<sub>2</sub> はサブサイト -1 から +1 にかけて結合していた (Fig. 15A)。反応が生じて様々な重合度の Sop<sub>n</sub>s が生じているはずであるが、電子密度がはっきりと観察されたのは Sop<sub>2</sub> であり、サブサイト +1 から -1 への Sop<sub>2</sub> の結合は強いと言えるため、ドナー基質は Sop<sub>2</sub> である可能性が高い。グルコースアナログである DNJ と変異体 E343G との複合体ではサブサイト +1 と -1 に DNJ が観察された (Fig. 15B)。やはりサブサイト +1 と -1 はグリコシドの認識が強く、+2 以降は弱いと考えられる。また、結合の向きはどちらの DNJ 分子も Sop<sub>2</sub> 複合体の対応するグリコシド部分と同じであった。

グルコースには DNJ と違い 1 位にヒドロキシ基がある。そのため、隣り合うサブサイトの両方にグルコースが結合しようとするするとグリコシド結合の酸素原子に相当するヒドロキシ基の酸素原子が衝突するため、どちらかのサブサイトにしかグルコースが入らない。グルコースとの複合体では明らかに +1 に電子密度が観察されたためグルコースはサブサイト +1 のみに強く結合している (Fig. 15C)。結合の向きも Sop<sub>2</sub> のサブサイト +1 のグルコース部分や DNJ 分子と同じであるため、サブサイト +1 に結合する基質の向きは一意であると考えられる。つまり、アクセプターも何らかのグリコシドでありドナーのグリコシドがアクセプターに β-1,2-結合するものと考えられる。また、Sop<sub>4</sub> と野生型酵素の複合体構造ではサブサイト +2 以降は電子密度が極めて不明瞭であるため (Fig. 15D)、サブサイト +2 のグリコシドの認識は弱く (Fig. 15C)、酵素反応により生じた Sop<sub>2</sub> が結晶中の分子の大部分に結合しているものと推測される。サブサイト -1, +1, +2 のグリコシドとの結合を Fig. 16 に示す。サブサイト -1, +1 の水素結合は多いが、サブサイト +2 の水素結合は少ない。そのため、やはりグリコシドの結合が強いのはサブサイト -1, +1 で +2 のグリコシドの結合は弱いと考えられる。

Sop<sub>n</sub>s がサブサイト +2 まで結合する場合は、L100 の側鎖が近いため、それが緩やかな立体障害となり結合しにくいと考えられる (Fig. 17)。Sop<sub>n</sub>s のみを基質とした場合は少なくともアクセプター基質として働く段階でサブサイト +2 以降に結合するのでこのことは Sop<sub>n</sub>s のみの反応で親和性が低いこととも一致する。

IaSGT の R349 は他のグループの GH35 酵素には保存されておらず特徴的である (Fig. 11)。ChSGT ではアルギニンではなくアスパラギンになっている。また、E102 は GH35 酵素間で保存されているが、IaSGT のアポ構造では基質と反対側を向いている (Fig. 11, 18)。サブサイト -1 にグリコシドが結合する際には E102 は基質の方を向き、基質と水素結合する。E102 が基質の方を向くとアポ構造の R349 の位置では側鎖同士が干渉するが、R349 はサブサイ

ト +1 の方向に伸びてサブサイト +1 のグルコシドと 4 つの水素結合を形成して強く結合する (Fig. 18)。アポ構造での R349 の側鎖は電子密度が不明瞭だが、複合体構造でサブサイト +1 の基質と水素結合している R349 の側鎖は電子密度がはっきりしている。サブサイト -1 に基質が結合しておらず E102 が基質の方を向かない場合でもサブサイト +1 にグリコシドが結合する場合は R349 はサブサイト +1 の方向に伸びて基質と水素結合を形成する。

### IaSGT のアクセプター基質探索

Sop<sub>ns</sub> の他に単糖やオリゴ糖をアクセプターとして添加した場合、Sop<sub>ns</sub> 分子間で糖転移した産物とアクセプター基質への転移産物が TLC 上でスポットの位置が重なると予測されるため、グライコシンターゼ化した IaSGT (E343G 変異体) を用いてフッ化糖をドナー基質としてアクセプター基質を探索した。その結果、ドナー基質である  $\alpha$ -GlcF はアクセプター基質ともなつて Glc-GlcF が生成したものの、Sop<sub>2</sub>、ゲンチオビオース、セロビオース、マルトース、トレハロース、スクロース、キシロース、マンノース、ラクトースがアクセプターのときの生成物は検出されなかった。フコースはスポットが不明瞭であり判別できない。グルコースはアクセプターとなっていた。しかし、*p*NP- $\alpha$ -glucoside をアクセプターとしたときのみ糖転移活性が確認された (Fig. 19A)。そこで、様々な配糖体を用いてアクセプターとなる基質を野生型酵素を用いて探索したところ、IaSGT は methyl- $\beta$ -Glucoside 以外のいずれの配糖体へも糖転移活性を示した (Fig. 19B)。Methyl- $\beta$ -Glucoside は反応産物のスポットがグルコースと重なるためか反応の有無を確認できなかった。Sop<sub>3</sub> よりも Methyl- $\beta$ -Glucoside 以外の配糖体由来の産物のスポットが濃いので、配糖体の方が優先的にアクセプターとなっていたと言える。

### 配糖体をアクセプターとした際の IaSGT の反応速度論量および ChSGT の比活性

配糖体をアクセプターとした際の反応速度論量を Table 3 に示す。Sop<sub>ns</sub> のみを基質とした場合と比較して  $\alpha$  グルコシドの配糖体をアクセプター基質として用いた場合は親和性と触媒効率はかなり改善した。 $K_m$  値は 70 – 340 倍以上上昇した。触媒効率はアクセプター基質がない場合の 15 – 120 倍になった。特に *p*NP- $\alpha$ -glucoside が最もアクセプターとして優れた基質であった。一方、 $\beta$  グルコシドの配糖体を添加した場合は触媒効率が 2.63 - 44 倍となったが、 $\alpha$  グルコシドの配糖体ほどの触媒効率の上昇ではなかった。用いた基質の中では *p*NP- $\alpha$ -glucoside をアクセプター基質とした際の触媒効率が最も高く、また  $K_m$  値も GH 酵素としては十分に低い値であることから *p*NP- $\alpha$ -glucoside が最も好ましい基質であるが、アグリコンの特異性は広いと言える。アグリコンの大きさなどと各パラメーターに明確な関係はないように思える。ドナー基質としての Sop<sub>2</sub> と Sop<sub>3</sub> を比べると、Sop<sub>2</sub> の方が反応速度と親和性が優れており、触媒効率が高いため Sop<sub>2</sub> が本来のドナー基質であると考えられる。このことは、サブサイト +2 にグリコシドが結合しにくいこととも合致する。ChSGT は配糖体をアクセプターとした際も活性が向上せず、他に真のアクセプター基質が存在する可能性が

ある (Table 4)。

### IaSGT と *p*NP- $\alpha$ -glucoside の複合体構造

複合体構造ではサブユニット A に基質が入りやすいようなので、比較などはすべてサブユニット A を用いている。サブサイト+1 のグルコシドは Sop<sub>2</sub> と *p*NP- $\alpha$ -glucoside でよく重なる (Fig. 18)。このため、*p*NP- $\alpha$ -glucoside は生産的な位置に結合していると言える。IaSGT の *p*NP- $\alpha$ -glucoside との複合体構造では、配糖体のアグリコン部分が結合する領域は疎水的なアミノ酸残基に囲まれており L183 がアポ構造と比べると外側に少し動き配糖体のアグリコン部分が結合する (Fig. 20)。しかし、この領域は狭く、芳香環のような平らな構造の分子はこの空間に入ることができるが、糖のように折れ曲がった分子は入ることができないと考えられる。また、この領域はグルコシドの  $\alpha$  面側にあり、 $\alpha$  配糖体のアグリコンの方がこの領域にフィットするため、 $\alpha$  配糖体に対して親和性が高いと考えられる。

### IaSGT の E343G 変異体を用いたドナー基質の探索

GH35 はガラクトシダーゼのファミリーであり、サブサイト -1 には本来ガラクトシドが結合する。IaSGT においてもサブサイト -1 にガラクトシドが結合するかをグルコースおよびガラクトースの 1 位ヒドロキシ基がフッ素に置換されているフッ化糖 ( $\alpha$ -GlcF および  $\alpha$ -GalF) を用いて確認した。 $\alpha$ -GlcF とグルコースを基質とした場合は  $\alpha$ -GlcF がグルコースへとグルコシドが転移して Sop<sub>2</sub> が生成していた。また、 $\alpha$ -GlcF をアクセプター基質とした反応産物のスポット ( $\beta$ -Glc-1,2- $\alpha$ -GlcF) も確認された。 $\beta$ -Glc-1,2- $\alpha$ -GlcF のスポットは Sop<sub>2</sub> と同程度であった。しかし、 $\alpha$ -GalF とグルコースを基質とした場合は反応が起こらなかった。ガラクトシドもサブサイト-1 に結合するのであれば、 $\alpha$ -GlcF と同様に  $\alpha$ -GalF もドナーとして働くはずである。つまり、グルコシドはサブサイト -1 に結合するが、ガラクトシドはサブサイト -1 に結合しないと言える (Fig. 21)。

## 考察

本章で発見した IaSGT と ChSGT の Sop<sub>n</sub>s を基質とした糖転移反応は新規のものである。Sop<sub>n</sub>s の糖転移酵素としては SOGP があり、Sop<sub>n</sub>s と触媒量の無機リン酸によって不均化重合反応が進行する。ただし、この反応は2段階が必要であり、まず加リン酸分解によってグルコース-1-リン酸が生成し、次に逆反応によって G1P のグルコシドが別の分子に転移することで不均化重合反応としてのグルコシドの転移が完了する。そのため、SOGP などの加リン酸分解酵素は系統名としては無機リン酸への糖の転移酵素として命名されている。そこで、IaSGT と ChSGT が加リン酸分解活性を有するかを調べたが、G1P の生成は見られなかったため、これらは明らかに SOGP とは異なる酵素であると言える。また、糖加水分解酵素の中には糖転移活性を示す酵素が多数存在するが、このような酵素は糖加水分解酵素に分類される。しかし、本酵素は全く加水分解活性を示さなかったことから、これらの酵素は明確に糖転移酵素と分類されると言える。

この糖転移活性はこれらの酵素遺伝子が SGL の遺伝子クラスターにあることを考慮すると妥当な機能である。SGL が  $\beta$ -1,2-グルカン を Sop<sub>n</sub>s へと分解し、Sop<sub>n</sub>s の一部がホスホリラーゼやグルコシダーゼで分解され、一部を IaSGT や ChSGT などの糖転移酵素が基質として用いていると考えられる。しかし、糖加水分解酵素としては極めて低い親和性（高い  $K_m$  値）と低い触媒効率であった (Table 1)。Sop<sub>n</sub>s のみを基質とする場合は糖転移するグルコシドを提供するドナー基質もそれを受け取るアクセプター基質も Sop<sub>n</sub>s であるが、少なくともいずれか一方が本来の基質ではないと考えられた。そこで、グルコシドの1位に置換基を持つ配糖体15種類がアクセプター基質となるかを調べたところ、IaSGT の Sop<sub>n</sub>s をドナー基質、配糖体をアクセプター基質とした場合の触媒効率は Sop<sub>n</sub>s のみを基質とした場合の触媒効率と比べてかなり改善した (Table 3)。そのため、IaSGT の真のアクセプター基質は配糖体であると考えられる。しかし、本研究で IaSGT が高い活性を示した配糖体は天然には存在しないものであるため、生体内では別の配糖体が基質として働いていると考えられる。ChSGT では、大きく触媒効率が改善したとはいえ、真のアクセプター基質は他にある可能性がある (Table 3)。

基質との親和性を反映する  $K_m$  値に基づくと、IaSGT は配糖体の中でもアグリコンが  $\alpha$ -グルコシドに結合している配糖体を好む傾向にあるが、ドナー基質として働く Sop<sub>n</sub>s とは基質ポケットに結合した際のサブサイト +2 の構造や位置がかなり異なっていると言える。アクセプター基質として特に優れた触媒効率を示した *p*NP- $\alpha$ -glucoside が基質ポケットに結合する際は、アグリコン部分 (*p*NP) が疎水的なアミノ酸に囲まれた領域に収まっていた (Fig. 20)。そのため、比較的疎水的なアグリコンを持つ配糖体が高い親和性を示すと考えられる。また、フッ化糖を用いた解析からサブサイト-1 はグルコシドに特異的でガラクトシドに作

用しないことも明らかにしている。以上の機能構造解析から Sop<sub>2</sub> のグルコシドをグルコシド配糖体に転移する酵素として IaSGT の系統名を sophorose:alkyl/aryl-glucoside  $\beta$ -D-glucosyltransferase と命名することを提案する (Fig. 22)。

IaSGT は subsite -1 はグルコシドを特異的に認識しており、多くの GH35 酵素とは異なりガラクトシドは結合しない (Fig. 21)。グルコシドとガラクトシドの違いは 4 位および 6 位のヒドロキシ基の向きであるが、これらのヒドロキシ基と水素結合距離にあるアミノ酸残基 (E102、Y378) は IaSGT でも位置が高度に保存されている (Fig. 11, 23)。E102 は 4 位ヒドロキシ基と 6 位ヒドロキシ基両方と水素結合を形成するがこれらのヒドロキシ基がいずれの方向を向いていても水素結合を形成できる位置にある。Y378 は 4 位ヒドロキシ基が  $\alpha$  面を向いている場合、つまりガラクトシドではなくグルコシドの場合に 4 位ヒドロキシ基と水素結合を形成する (Fig. 23)。一方で、IaSGT の L100 の位置には他の GH35 酵素ではシステイン残基が存在しており高度に保存されている。このアミノ酸はサブサイト -1 のガラクトシドの 4 位ヒドロキシ基の方を向いている (Fig. 24)。IaSGT と GH35 酵素のサブサイト -1 のグルコシド部分とガラクトースを重ね合わせた時の IaSGT の L100 とガラクトースの 4 位ヒドロキシ基の酸素原子との距離は 3.0 Å 程度で炭素原子と酸素原子の距離としてはやや近いので、システインがロイシンに変化していることによる緩やかな立体障害でガラクトシドの結合を阻害している可能性が考えられる。

IaSGT と GH35 酵素とは基質ポケット形状が大きく異なっており、IaSGT では基質ポケットが狭いのに対し、他の GH35 酵素ではサブサイト +1 以降は開けた構造となっている (Fig. 25)。GH35 はアノマー保持型の酵素であり、基質と酵素が共有結合した反応中間体を経る反応機構に従う。この反応中間体に対して水分子が作用すると加水分解となり、水分子以外のアクセプター分子が作用すると転移反応となる。IaSGT の狭い基質ポケットには水分子が入りにくいため IaSGT は糖転移活性のみを示すと推測される。Fig. 25 の既知 GH35 酵素は全て加水分解酵素である。サブサイト +1 の認識残基は他の GH35 酵素で残基も位置も全く保存されていないことが IaSGT のユニークなアクセプター特異性の要因と考えられるが、他の GH35 酵素ではサブサイト +1 に基質が結合した構造が明らかになっておらず、構造学的に真の基質を証明しているとは言えない。IaSGT は基質切断部位を跨いだ基質結合を観察できた GH35 で初めての例であり、GH35 酵素の分子進化的な知見をさらに得るには既知 GH35 グループのミカエリス複合体が必要であろう。

IaSGT は様々な配糖体をアクセプター基質とすることができる (Table 3)。これは、IaSGT には可変領域があり、F180 のヘリックスなどが動けるようになって基質ポケットの大きさや形が少しずつ変化できるようになっているためだと考えられる。

推定される代謝系の図を Fig. 26 に示す。タンパク質の局在は PSORTb version 3.0.2 (65)、Gneg-mPLoc (66)、LipoP 1.0 Server (67)、TMHMM Server v. 2.0 を用いて推測した。IaSGT を含むクラスターのタンパク質の局在を元に代謝系を考えると、細胞外の  $\beta$ -1,2-グルカンをも SGL で Sop<sub>n</sub>s へ分解し、TonB dependent transporter でペリプラズムへ取り込み、さらに SGL



でより短い Sop<sub>ns</sub> へ分解し、ABC transporter でサイトプラズムへ取り込み、IaSGT やホスホリラーゼの基質として Sop<sub>ns</sub> が利用されると考えられる。

本研究で明らかとなった IaSGT と ChSGT の Sop<sub>ns</sub> に対しての糖転移活性 (Fig. 22) は今まで知られていなかった新規の活性である。さらに本研究ではこれらの酵素の機能や構造、反応機構などを明らかにしており、学術的に大変意義のあるものであると言える。

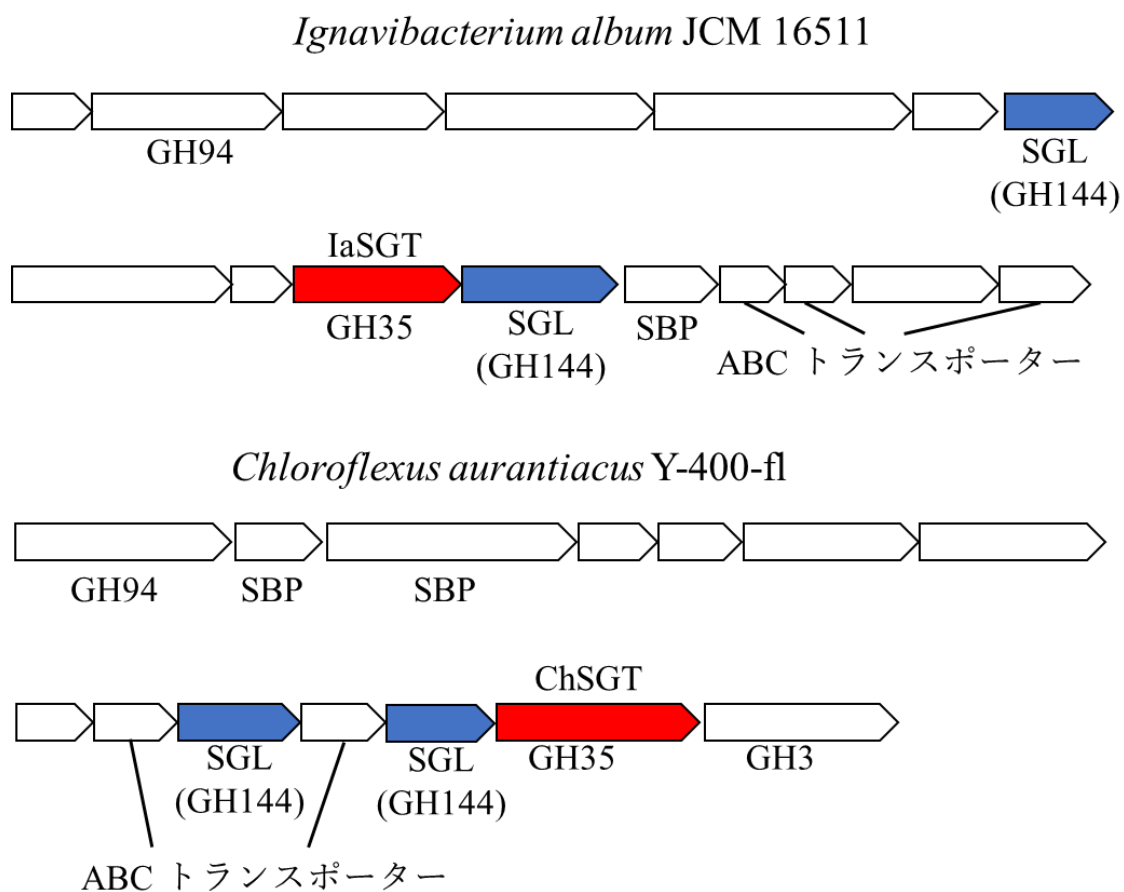
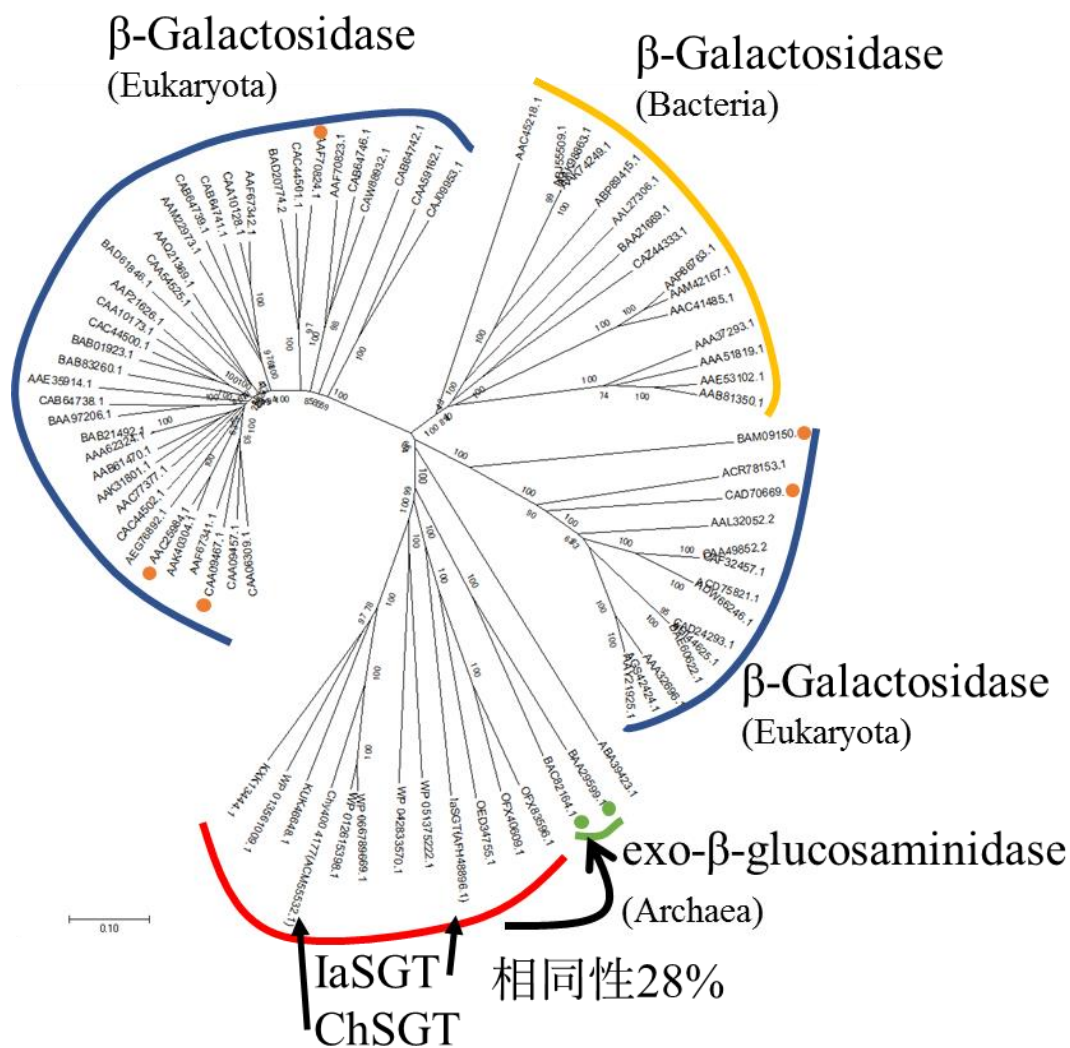


Fig. 1. *SGL* ホモログ遺伝子がコードされている遺伝子クラスター

*Ignavibacterium album* JCM 16511 と *Chloroflexus aurantiacus* Y-400-fl のゲノム上にコードされている *SGL* ホモログ遺伝子を含む遺伝子クラスター。GH144 の *SGL* の他にも GH とアノテーションされている配列を有する。また、SBP や ABC トランスポーターなどの糖輸送に関わる配列を有する。*SGL* ホモログを青、GH35 を赤で示した。



既知のGH35酵素の活性

$\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23)

● exo- $\beta$ -glucosaminidase (EC 3.2.1.165)

● exo- $\beta$ -1,4-galactanase (EC 3.2.1.-)

$\beta$ -1,3-galactosidase (EC 3.2.1.-)

Fig. 2. IaSGT および ChSGT と既知 (機能解析済み) の GH35 酵素の系統樹  
各酵素のアミノ酸配列を基にして ClustalW でアライメントを作製し、系統樹を作製した。  
図中の●は既知の GH35 酵素のうち、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性以外の活性 (緑:exo- $\beta$ -  
glucosaminidase、橙:exo- $\beta$ -1,4-ガラクトナーゼ) を示す。赤で示したクラスターは機能未知  
グループを示す。

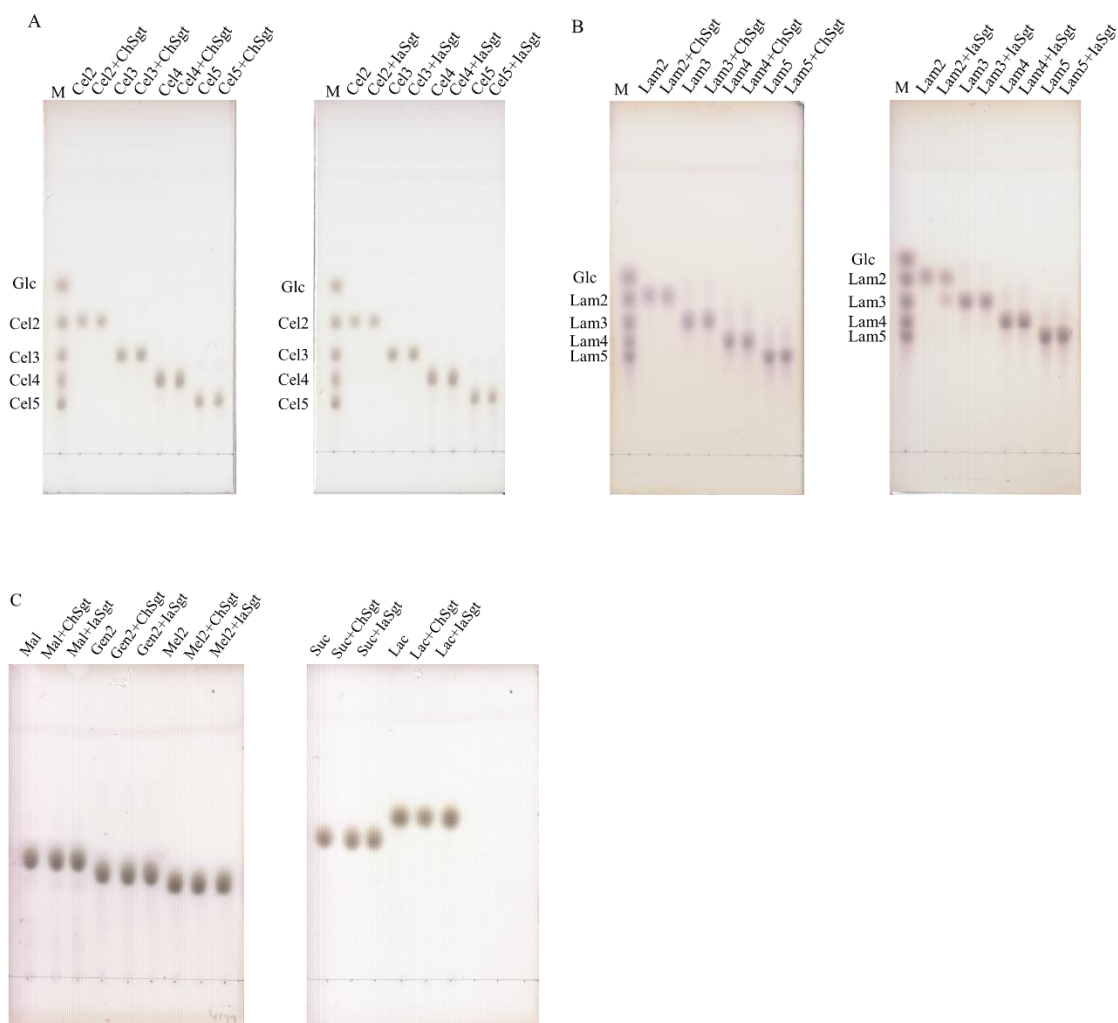


Fig. 3. ChSGT、IaSGT と各種糖鎖の反応液の TLC 解析

ChSGT と IaSGT を 50 mM NaOAc buffer, pH5.0 中でセロオリゴ糖 (Cel2-5,  $\beta$ -1,4-結合, A)、ラミナリオリゴ糖 (Lam2-5,  $\beta$ -1,3-結合, B)、マルトース (Mal,  $\alpha$ -1,2-結合)、ゲンチオビオース (Gen,  $\beta$ -1,6-結合, C)、スクロース (Suc,  $\alpha$ -Glc-1,2- $\beta$ -Fru, C)、ラクトース (Lac,  $\beta$ -Gal-1,4-Glc, C) と 37°C で一晩反応させ、TLC で解析した。サンプルは 0.5  $\mu$ L アプライし、75% アセトニトリルで展開した。

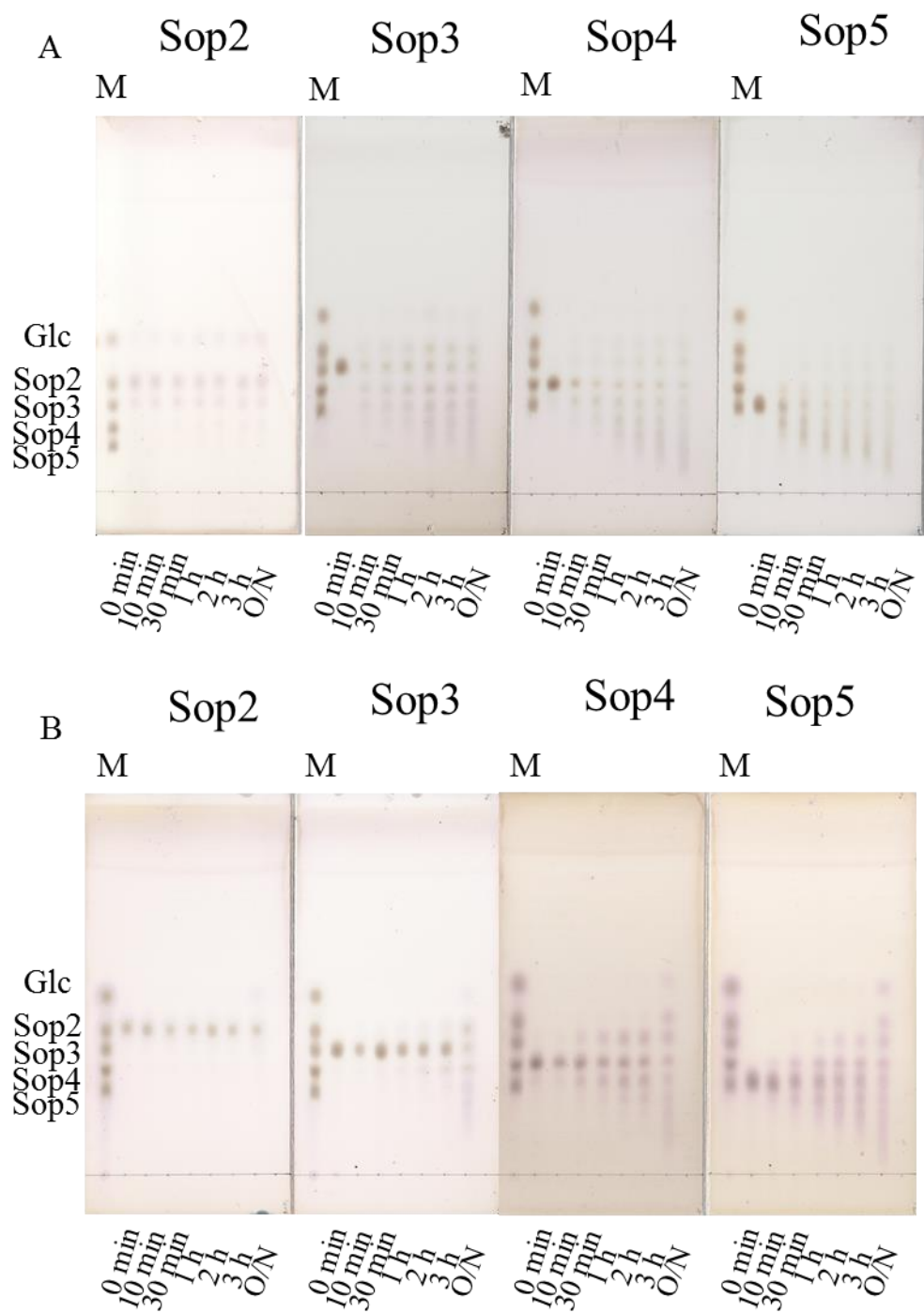
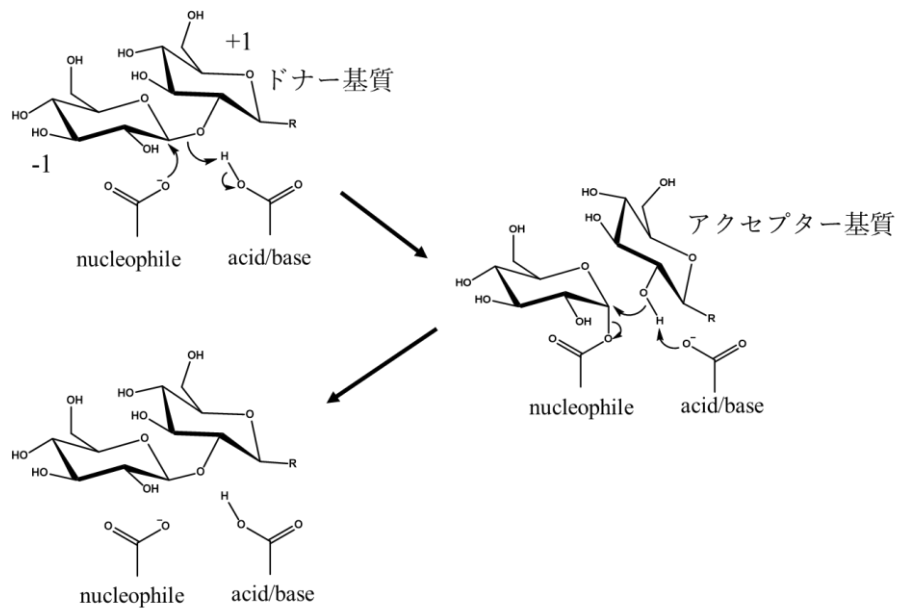


Fig. 4. IaSGT、ChSGT の Sop<sub>n</sub>s に対する活性

IaSGT (A)、ChSGT (B)の Sop<sub>n</sub>s に対する活性を TLC で評価した。サンプルは 0.5  $\mu$ L アプライし、75% アセトニトリルで展開した。

A



B

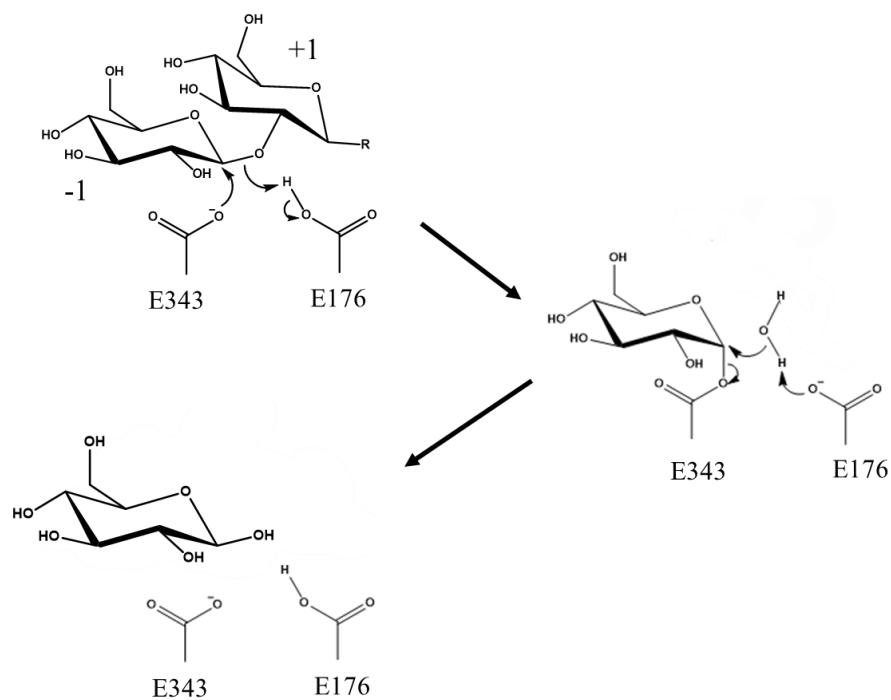


Fig. 5. 糖転移活性と加水分解活性の反応様式

糖転移活性 (A) と加水分解活性 (B) の反応様式を示す。糖転移反応では求核触媒残基の求核攻撃によってグリコシド結合が切断されて酵素と基質が共有結合した中間体が生成した後にアクセプター基質が、加水分解反応では水が C1 付近に接近することによってそれぞれ糖転移反応、加水分解反応が完了する。

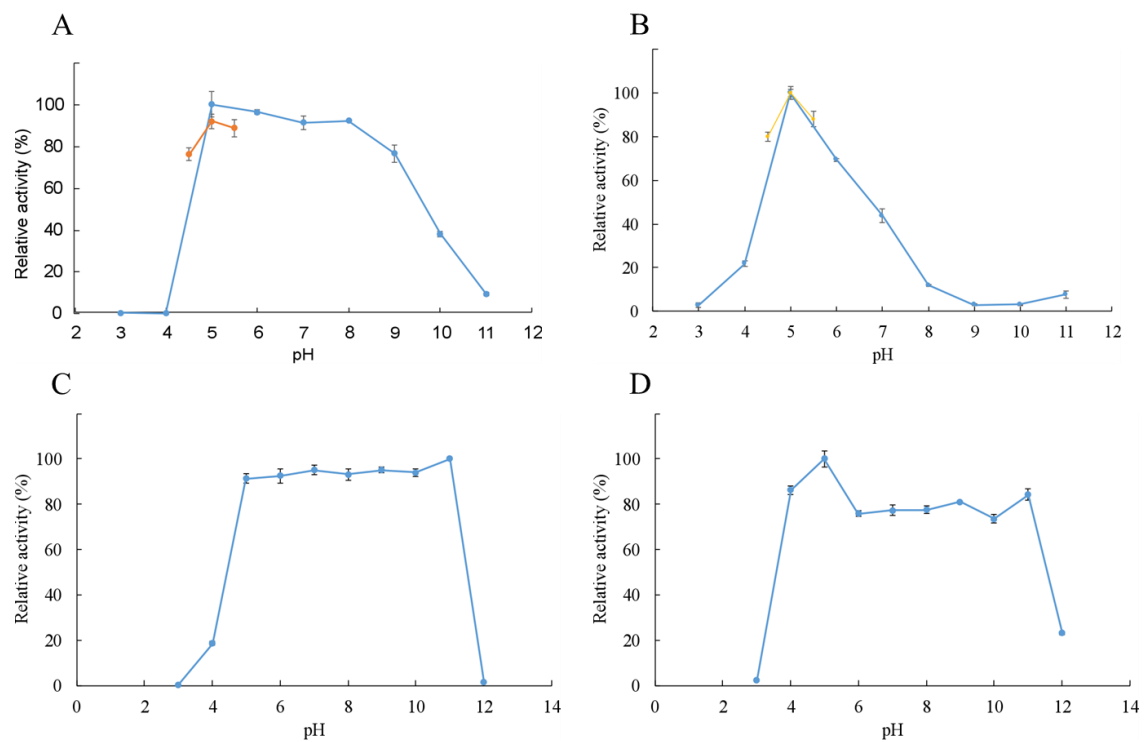


Fig. 6. IaSGT、ChSGT の pH プロファイル  
IaSGT、ChSGT に対する pH の影響。A, IaSGT の至適 pH、B, ChSGT の至適 pH、C, IaSGT の pH 安定性、D, ChSGT の pH 安定性。

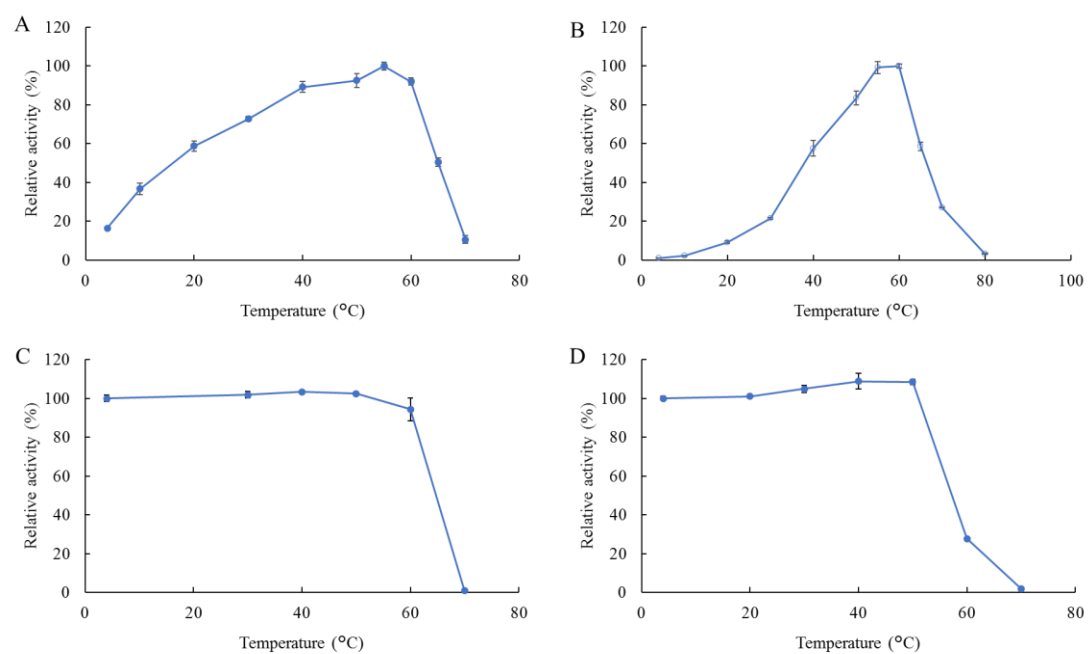
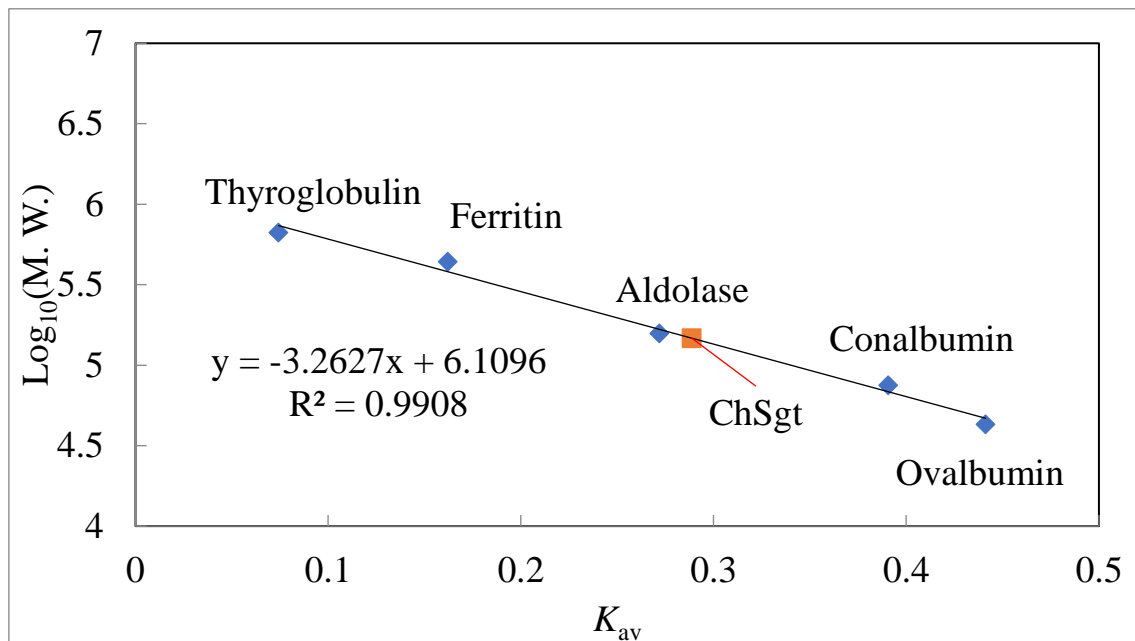


Fig. 7. IaSGT、ChSGT の温度プロフィール  
IaSGT、ChSGT に対する温度の影響。A, IaSGT の至適温度、B, ChSGT の至適温度、C, IaSGT の温度安定性、D, ChSGT の温度安定性。



A



B

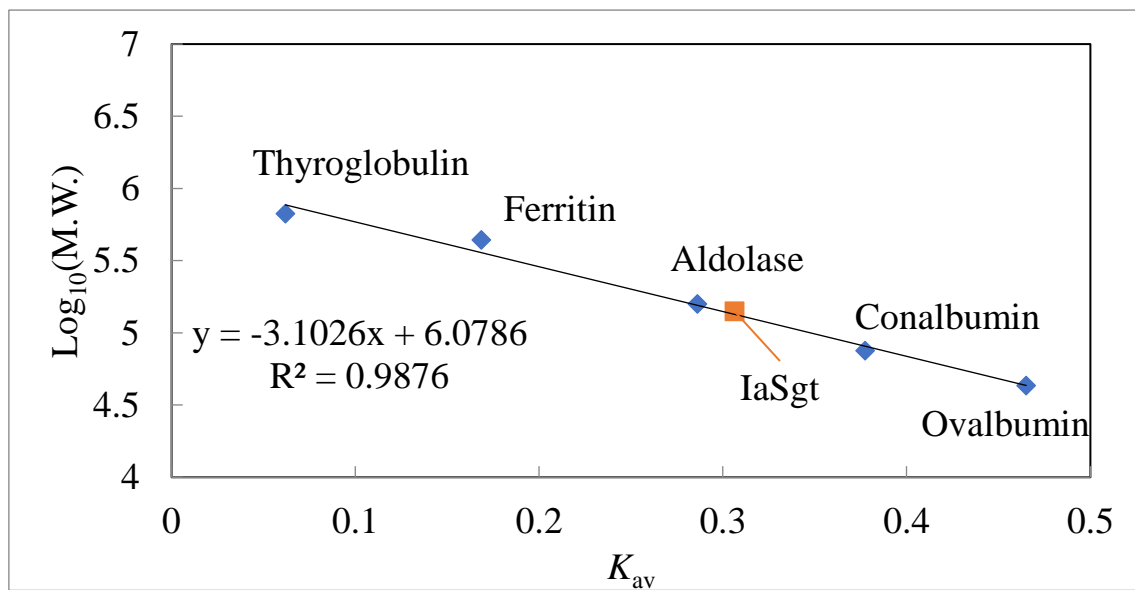


Fig. 8. ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定

A, ChSGT の溶出パターン。B, IaSGT の溶出パターン。グラフの値は、 $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$  の式に従って算出した。

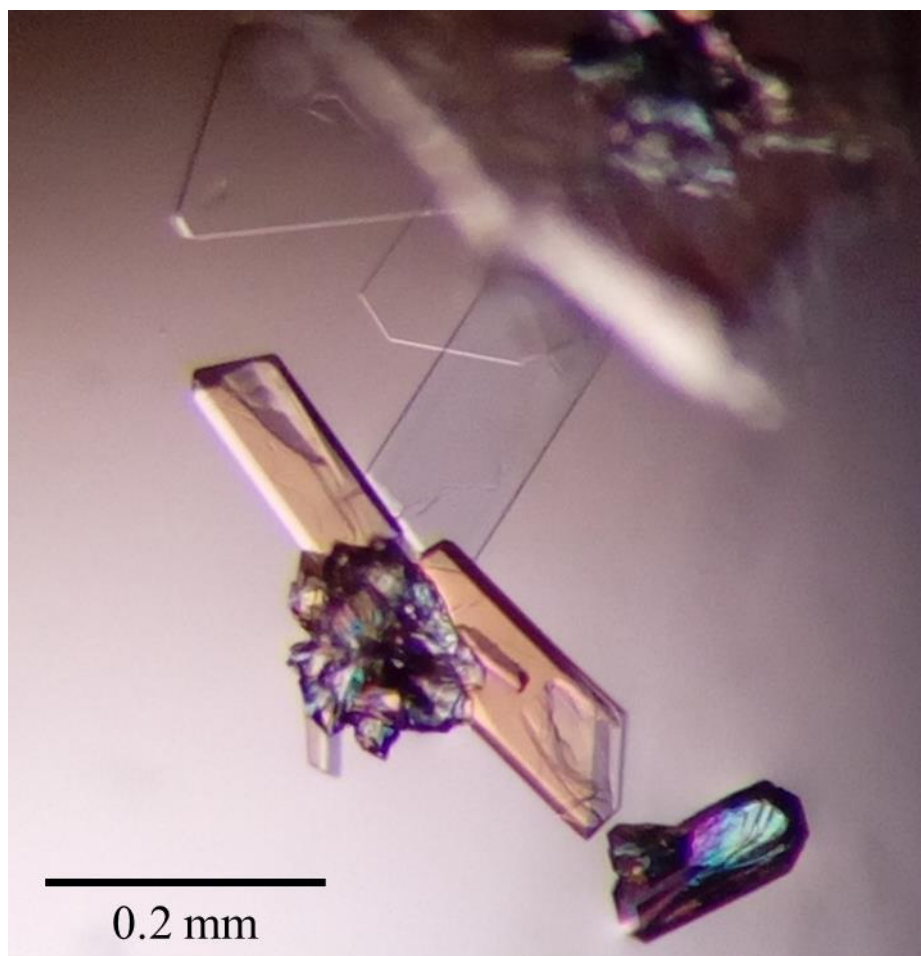


Fig. 9. IaSGT の結晶  
板状の結晶が IaSGT の結晶。長辺は 0.2 mm 程。

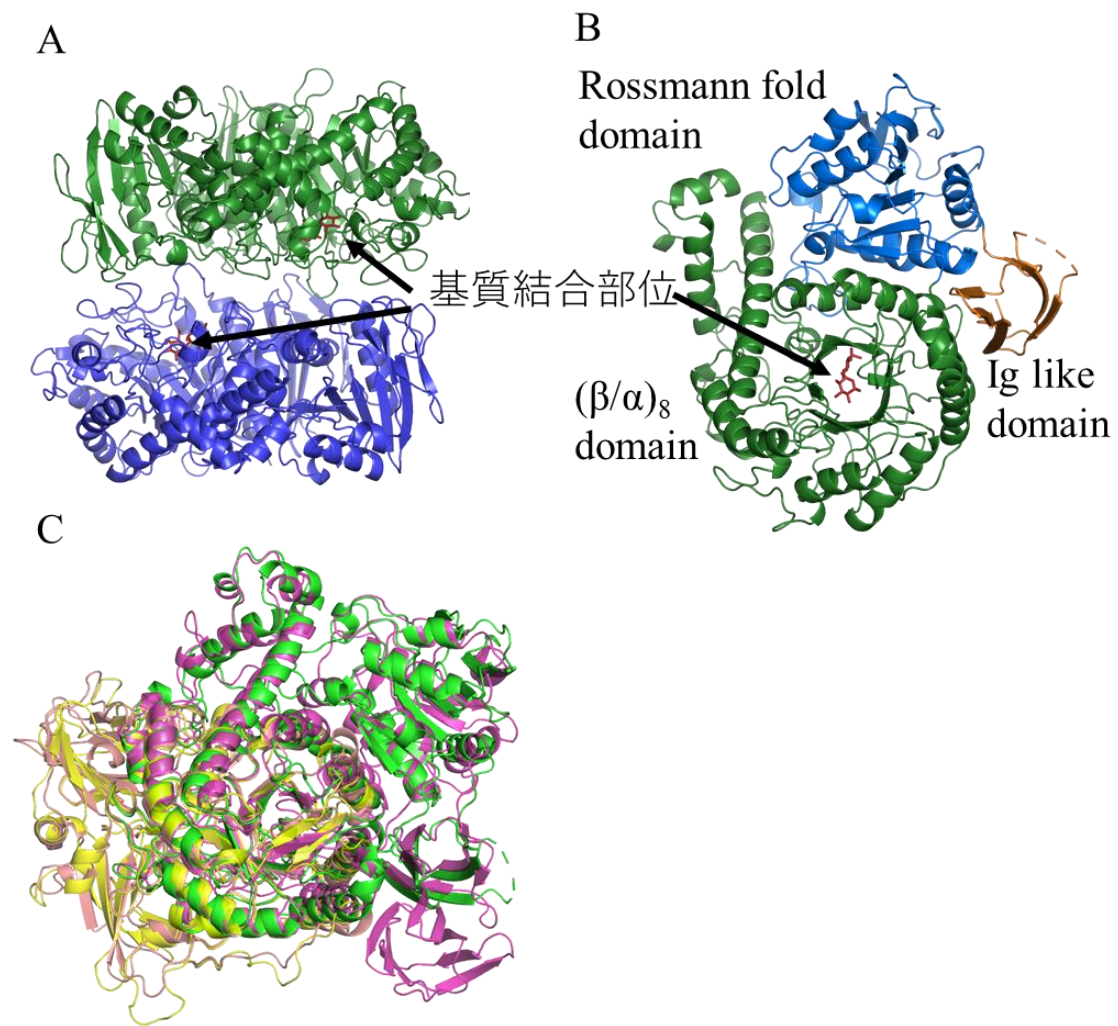
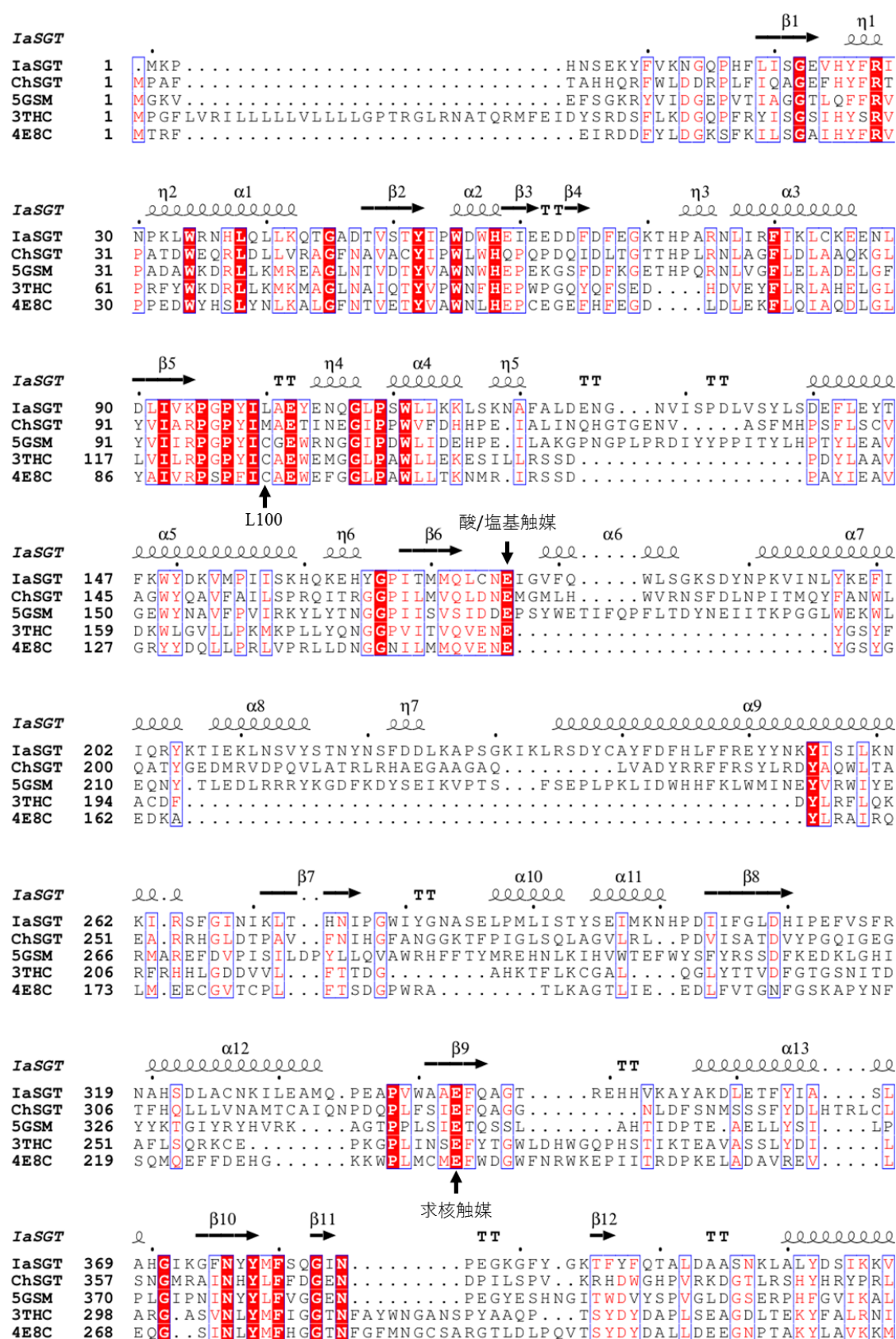


Fig. 10. IaSGT の全体構造

A, IaSGT の四次構造。B, IaSGT のドメイン構成、結合している基質は Sop<sub>2</sub>。C, IaSGT と既知の GH35 酵素の重ね合わせ。緑, IaSGT、紫, *Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来の  $\beta$ -glucosaminidase、ピンク, *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 由来の  $\beta$ -galactosidase、黄, *Homo sapiens* 由来の  $\beta$ -galactosidase。



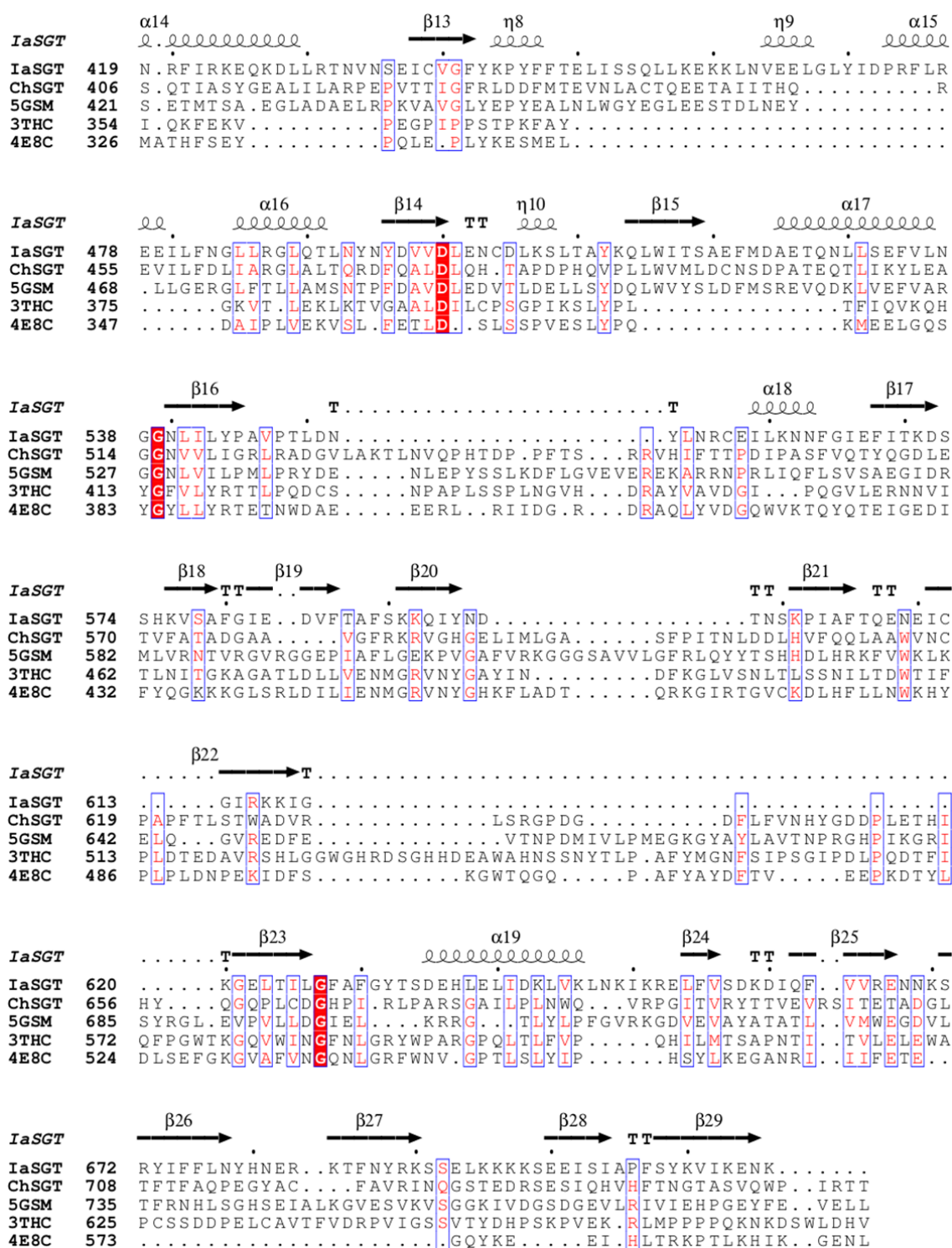


Fig. 11. IaSGT, ChSGT と既知の GH35 酵素のアミノ酸配列のアライメント

アライメントの作成には MUSCLE ver. 3.8、図の作成には ESPrnt 3.0 を使用した。IaSGT の酸/塩基触媒 E176、求核触媒 E343、L100 を矢印で示した。

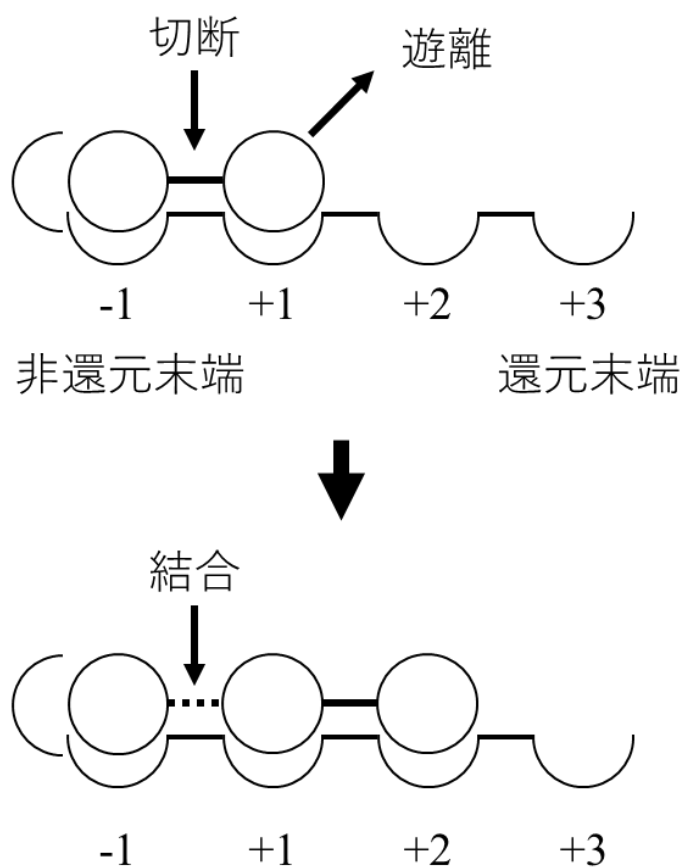
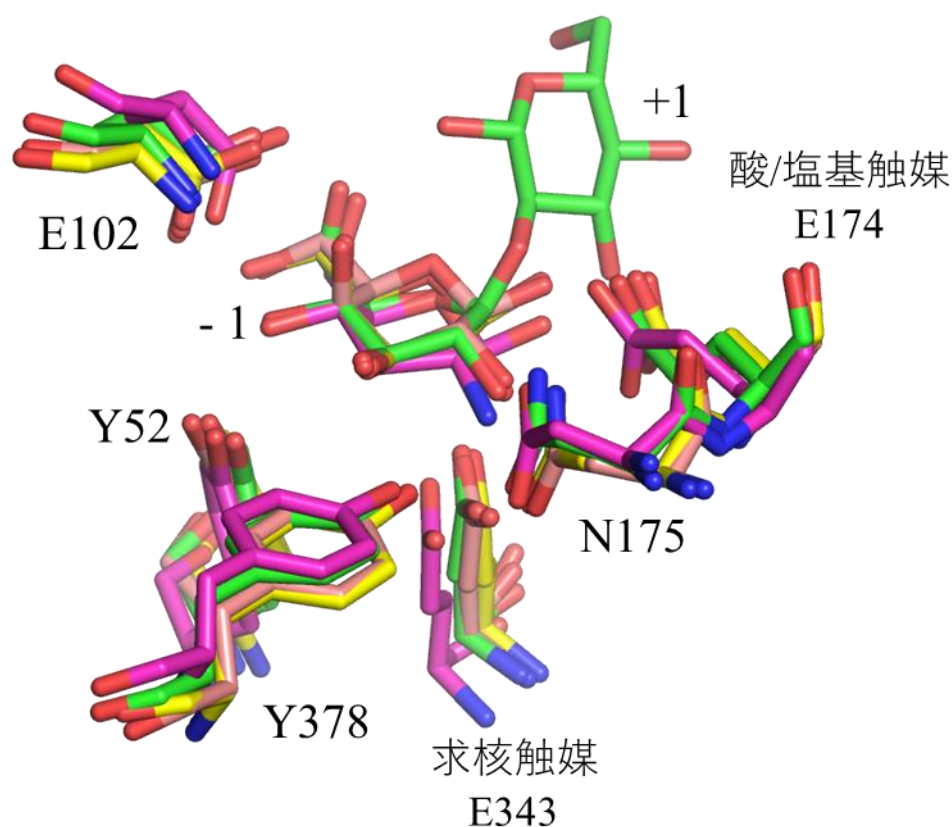


Fig. 12. 糖鎖を基質とする酵素のサブサイト

糖鎖を基質とする酵素では、グリコシド結合を切断する反応が起こる位置を0として、糖の結合部位を還元末端側へ順に+1, +2, +3 ..., 非還元末端側へ順に-1, -2, -3 ...と表す。図は糖転移酵素のサブサイトの例。






---

green	IaSGT
magenta	$\beta$ -glucosaminidase from <i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1
pink	$\beta$ -galactosidase from <i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4
yellow	$\beta$ -galactosidase from <i>Homo sapiens</i>

---

Fig. 13. 基質結合部位の重ね合わせ。

IaSGT と既知の GH35 酵素の基質結合部位周辺の重ね合わせ。色分けは図中に表記。推定酸塩基触媒および推定求核残基は GH35 酵素間で高度に保存されている。

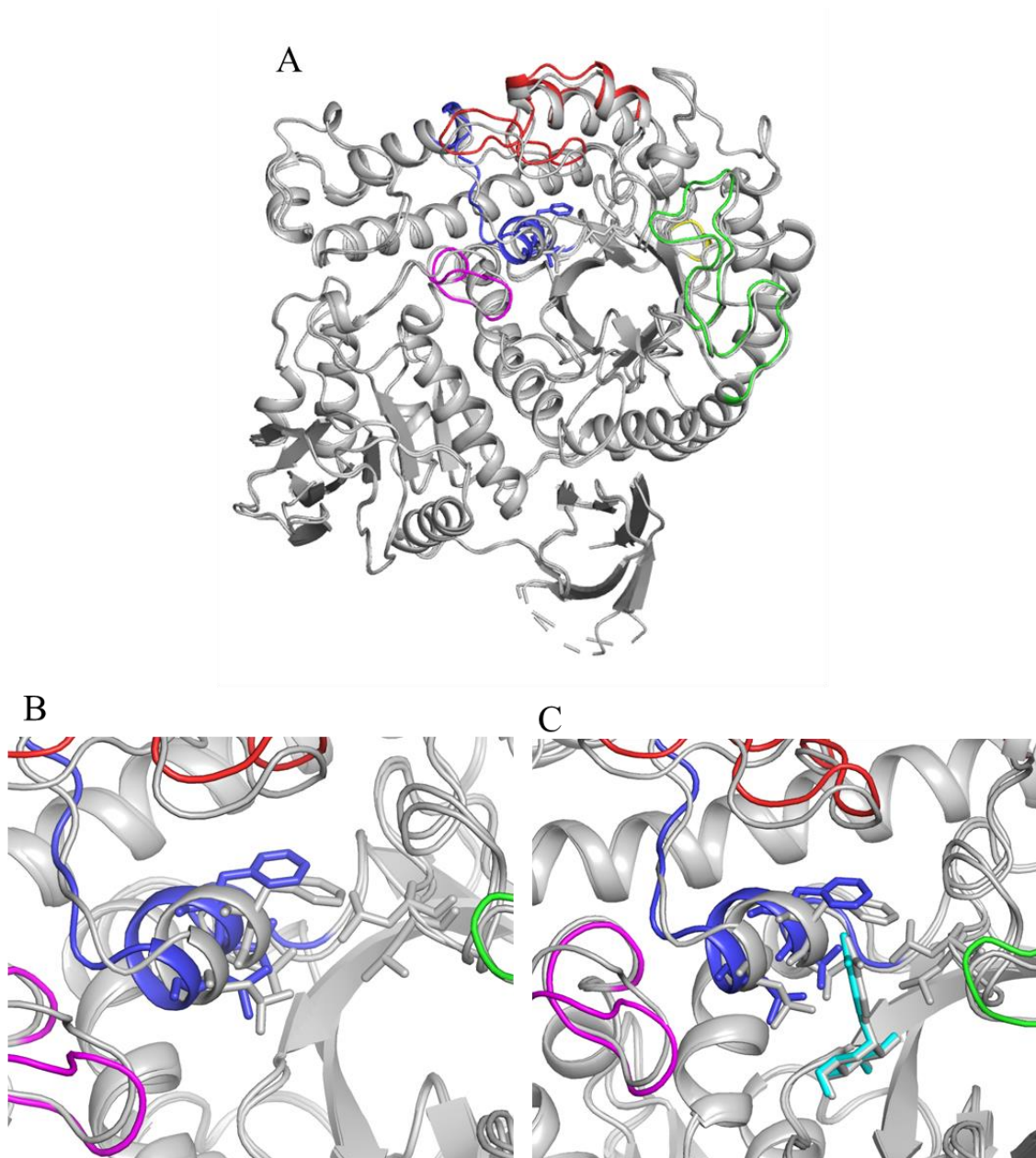


Fig. 14. IaSGT のサブユニット A, B の重ね合わせ

IaSGT のアポ構造 (A, B) と *p*NP- $\alpha$ -glucoside (シアン) とのホロ構造 (C) を用いて可変領域を示した。サブユニット B の可変領域に色づけした (赤：110–144、黄：162–168、青：176–195、緑：380–410、マゼンタ：450–460)。B, C は基質結合部位周辺の可変領域。p



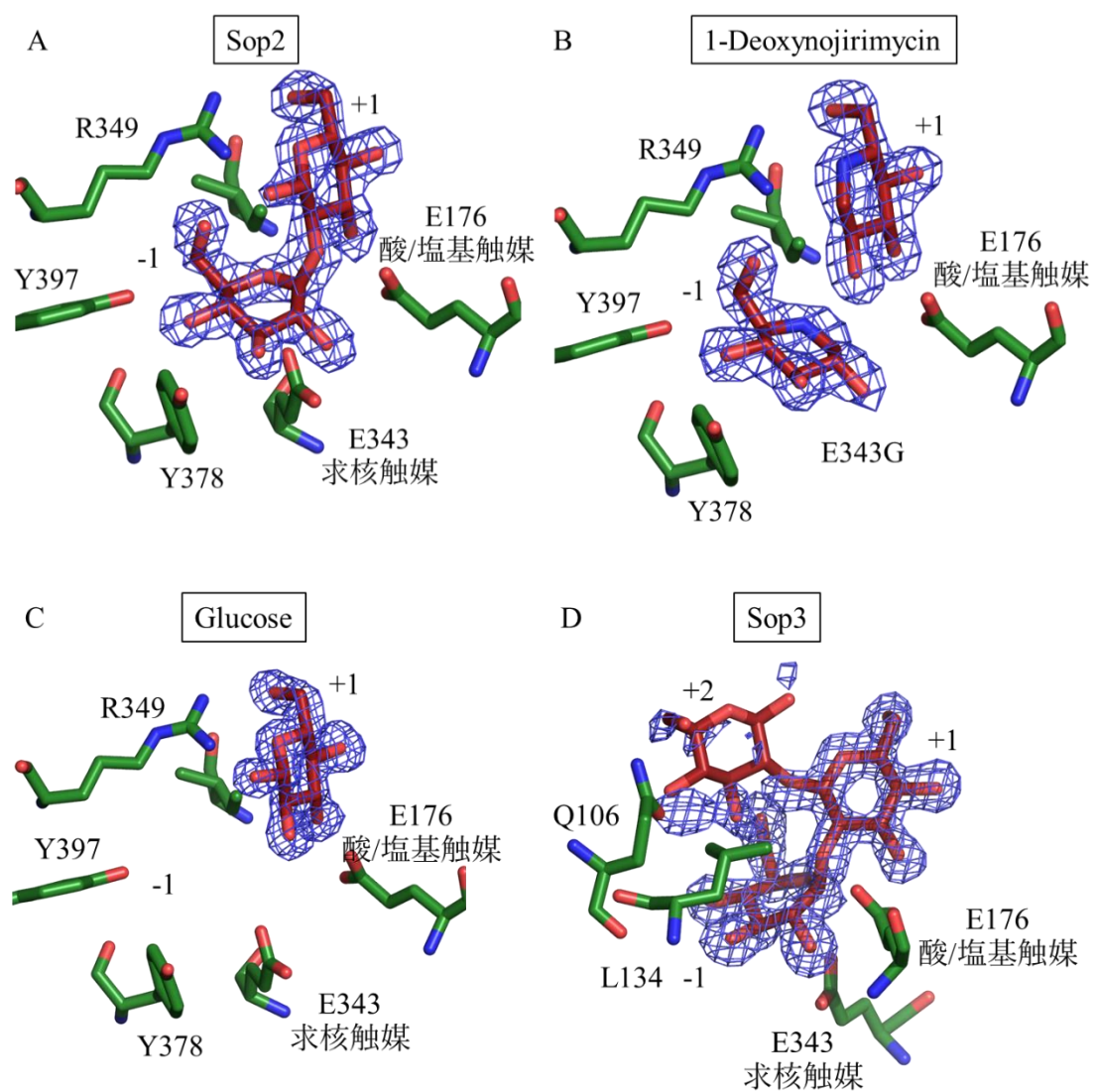


Fig. 15. IaSGT と各種リガンドとの複合体構造

X 線結晶構造解析で明らかとなった IaSGT と Sop2 (A)、DNJ (B)、グルコース(C)、Sop3(D) との複合体構造。青のメッシュは 3.0 $\sigma$  の電子密度( $2F_o - F_c$ )を示す。

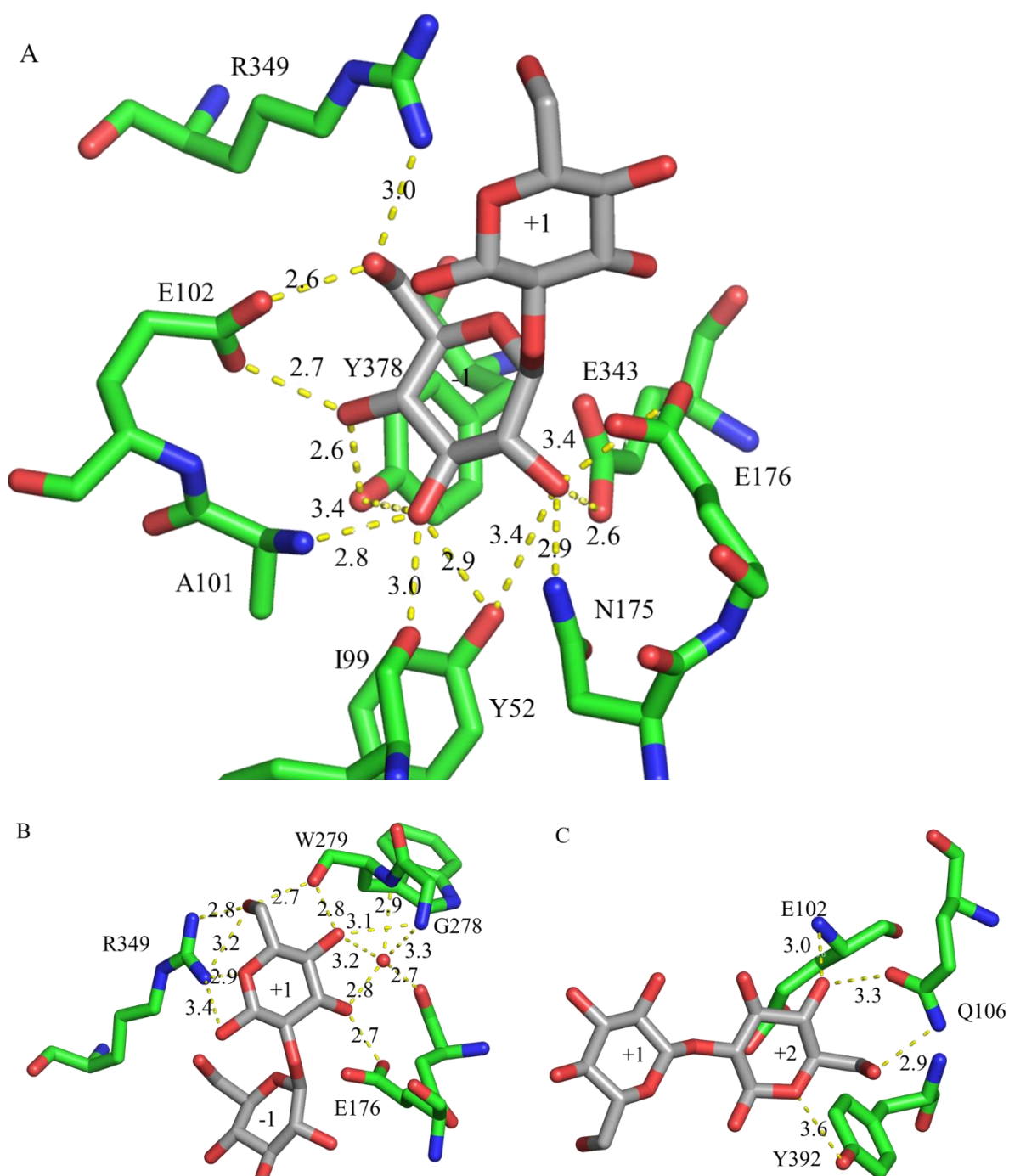


Fig. 16. サブサイト-1、+1、+2 の基質認識

サブサイト-1 (A)、+1 (B)、+2 (C)の基質との水素結合を示した。原子間の距離はÅで示した。アミノ酸は緑、基質は灰色で示した。A, B は IaSGT と Sop2 の複合体、C は IaSGT E343Q と Sop4 (電子密度が明瞭なのは Sop2 部分のみ) の複合体。

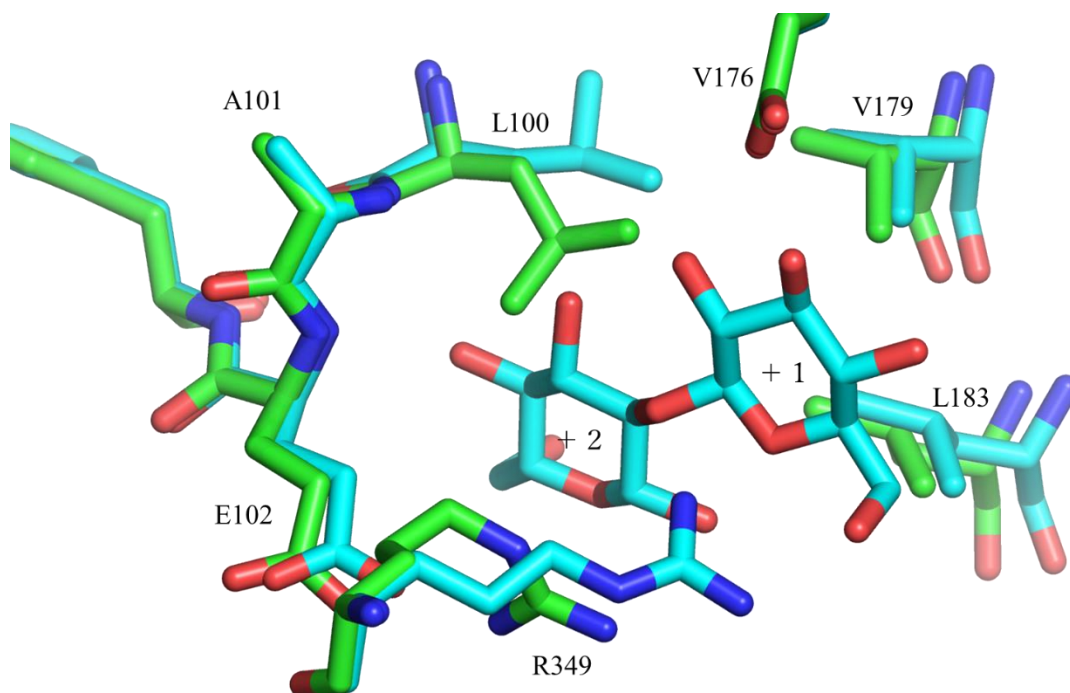


Fig. 17. IaSGT アポ構造と IaSGT E343Q-Sop<sub>4</sub> 複合体構造のサブサイト+2 周辺の比較  
 サブサイト+2 のグリコシドと L100 が干渉するため、複合体構造では L100 がサブサイト  
 +2 の反対側を向いている。

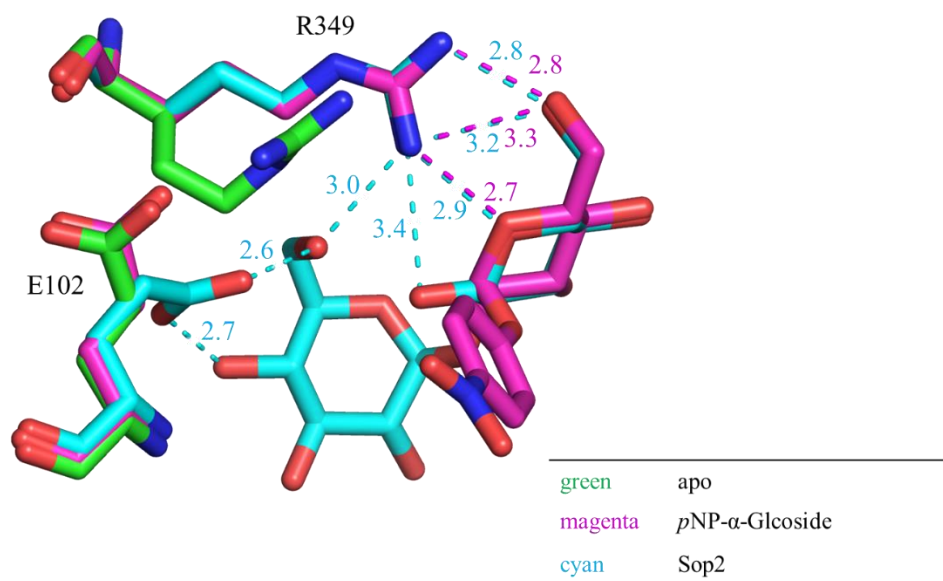
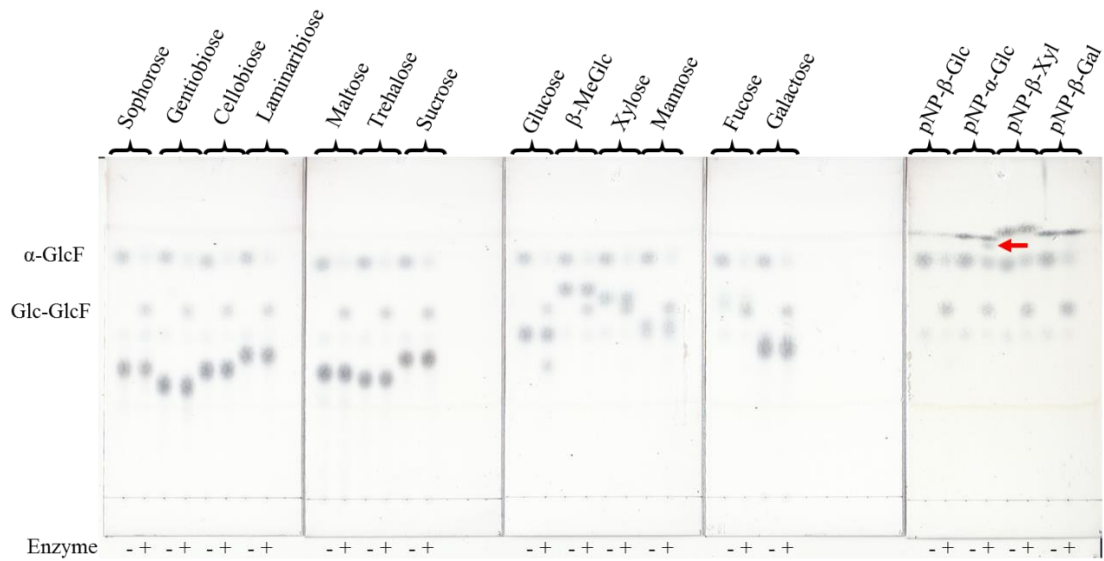


Fig. 18. IaSGT のアポ、*p*NP- $\alpha$ -glucoside、Sop<sub>2</sub> の基質結合部位周辺の重ね合わせ

A



B

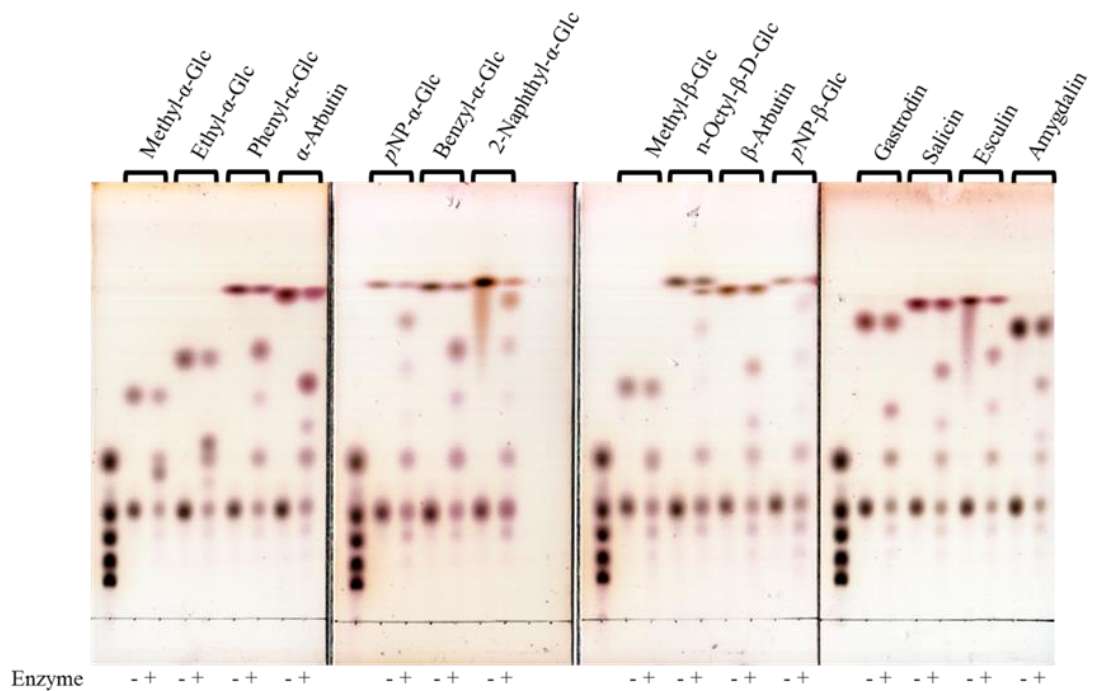


Fig. 19. IaSGT のアクセプター探索

A、グリコシンターゼを利用した IaSGT のアクセプター探索。B, Sop<sub>2</sub> と 15 種類の配糖体を反応させ、TLC で解析した。各サンプルを 0.5 μL ずつアプライし、80% アセトニトリルで展開した。図下部の-, +は酵素のなし、ありを示す。反応産物は赤い矢印もしくは四角で示す。

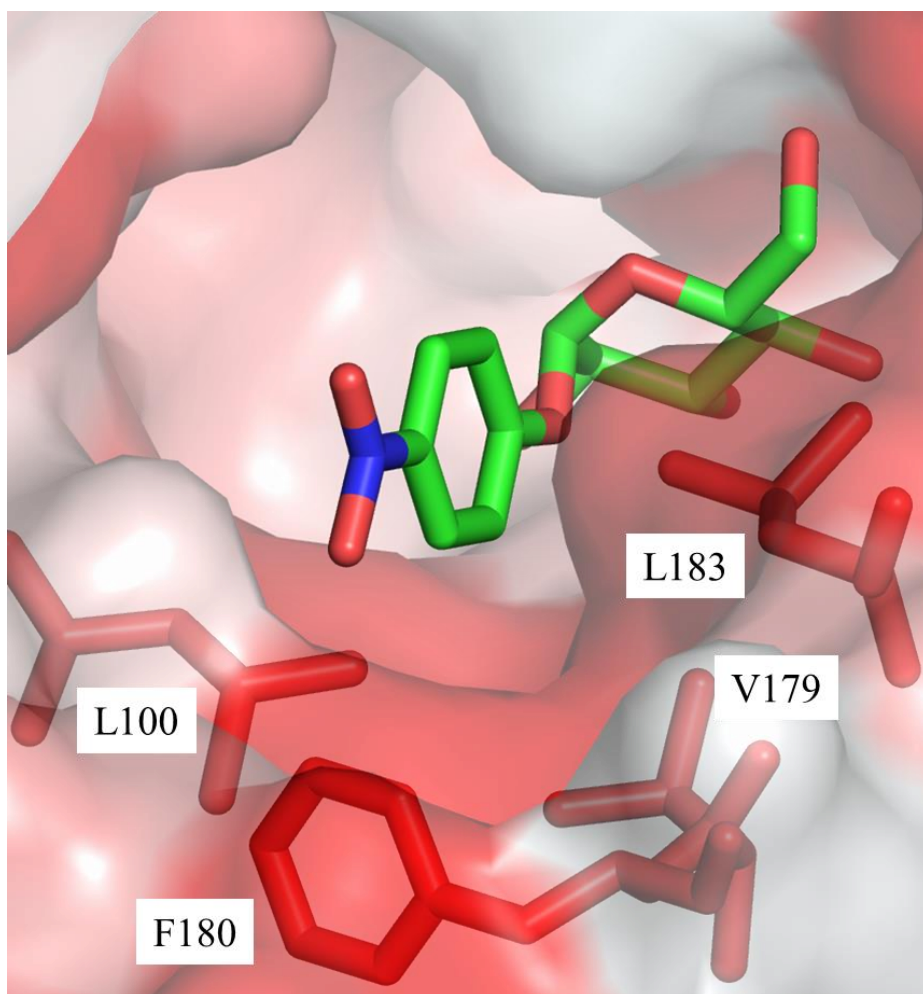


Fig. 20. IaSGT と *p*NP- $\alpha$ -glucoside の複合体構造

赤色が濃いほど疎水的であることを示す。表面構造は半透明で表示している。基質である *p*NP- $\alpha$ -Glucoside は緑色で示した。



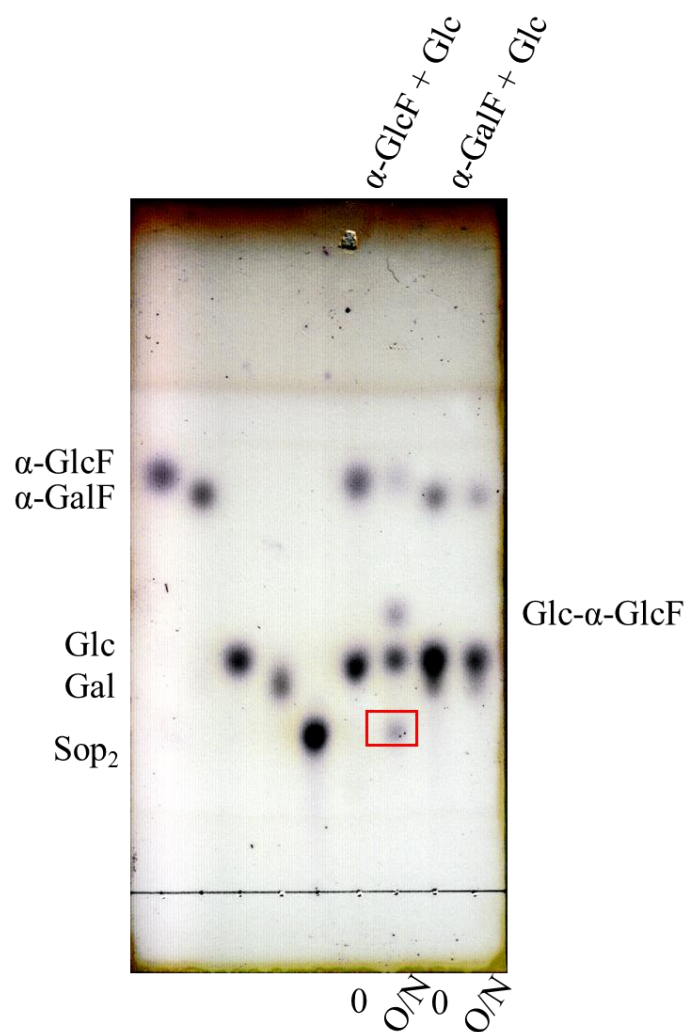


Fig. 21. グライコシンターゼ化した IaSGT (E343G)とフッ化糖の反応

IaSGT E343G を、10 mM グルコースをアクセプターとして 10 mM  $\alpha$ -GlcF と 10 mM  $\alpha$ -GalF をドナーとして反応させた。酵素濃度は終濃度が、70 mg/mL。各サンプルを 0.5  $\mu$ L ずつアプライし、80% アセトニトリルで展開した。本来の反応産物を赤い四角で示す。

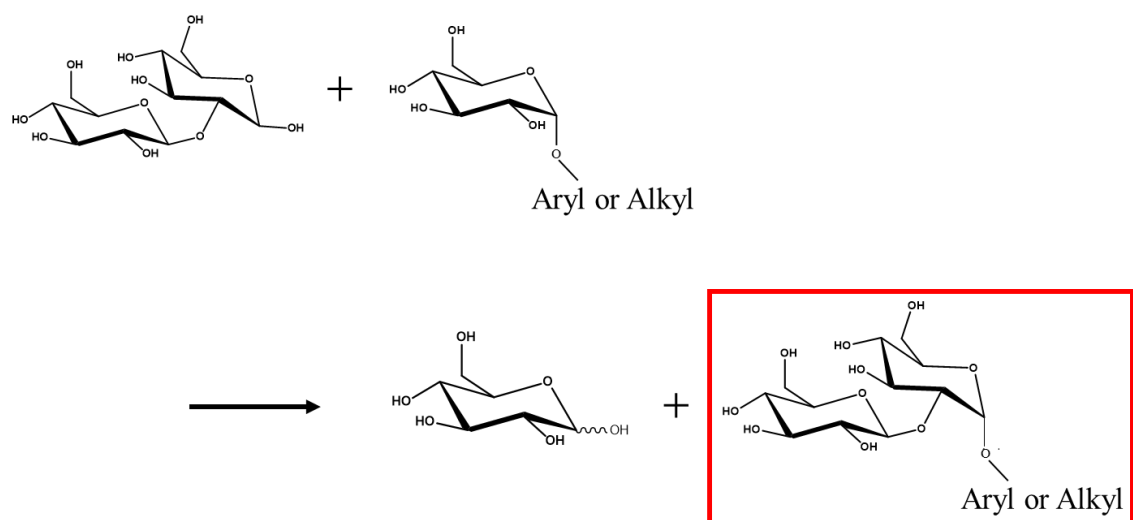


Fig. 22. IaSGT が触媒する反応

IaSGT が触媒する反応を模式図で示した。



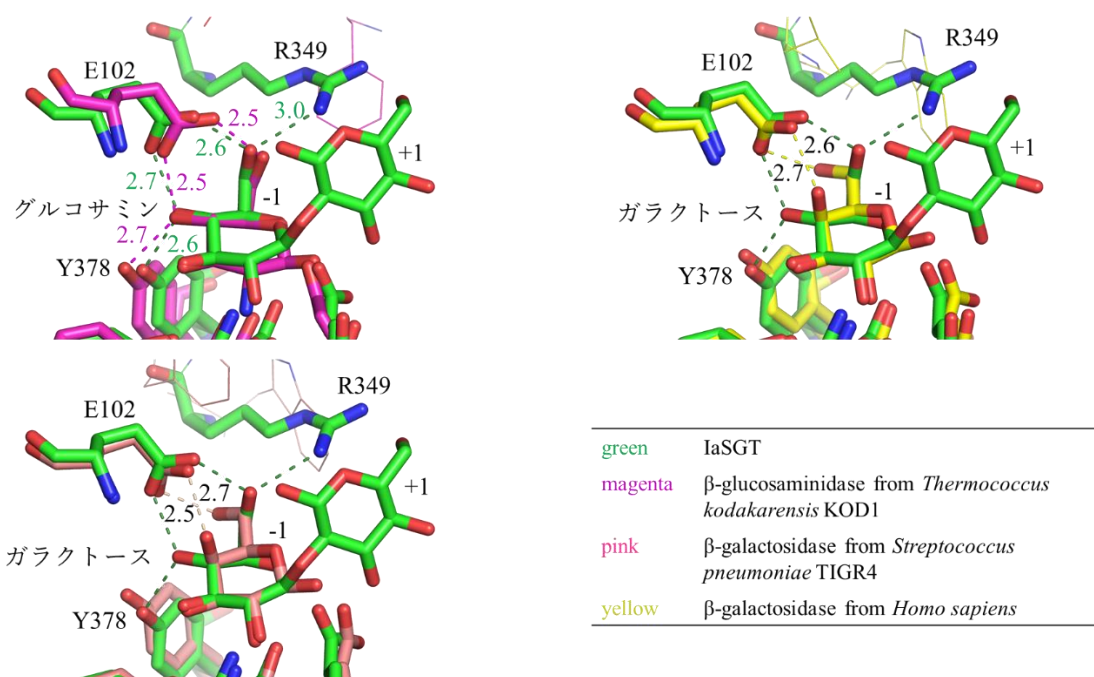


Fig. 23. IaSGT と既知の GH35 酵素の Subsite -1 周辺の構造

IaSGT と既知の GH35 酵素の subsite -1 の C4、C6 水酸基を認識する残基を示す。残基番号は IaSGT の残基番号。基質は、IaSGT は Sop<sub>2</sub>、それ以外は図に記載。

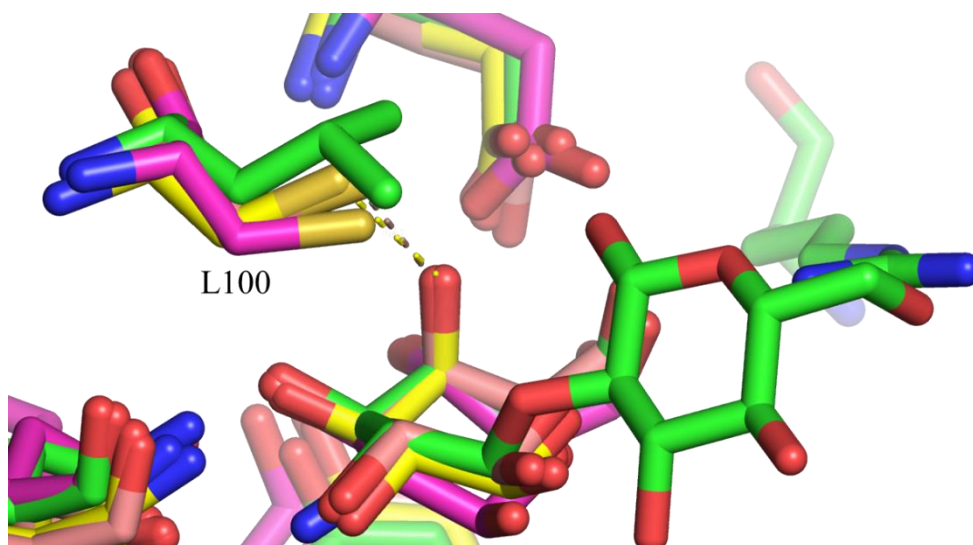


Fig. 24. IaSGT と他の GH35 酵素との L100 周辺の重ね合わせ  
色分け、基質は Fig. 13 と同様である。

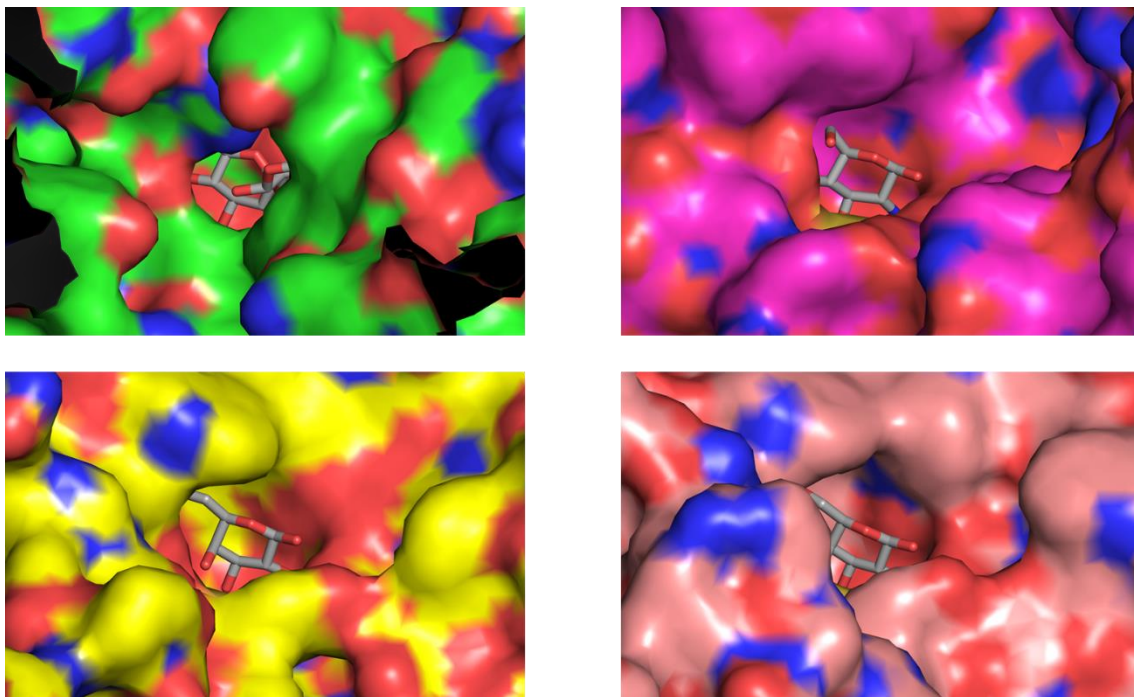


Fig. 25. IaSGT と他の GH35 酵素の基質ポケット周辺の表面構造  
 酵素の色分けは Fig. 13 と同様である。基質は灰色で示した。

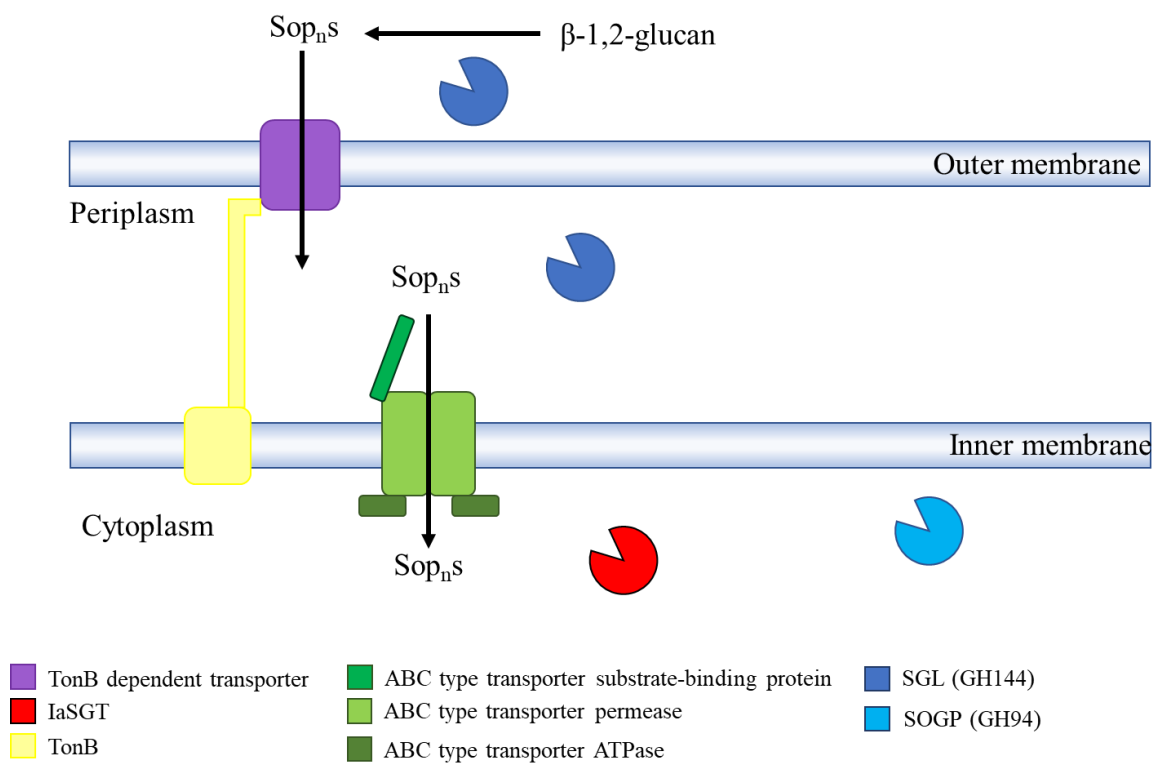


Fig. 26. 推定される IaSGT を含む代謝系

TonB dependent transporter, ABC type transporter, SGL, SOGP, IaSGT は同一のクラスター (Fig. 1) にコードされている。

表

Table 1. IaSGT、ChSGT の Sop<sub>n</sub>s に対する Kinetics

Enzyme	Substrate	$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{\text{m}}$ (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$
ChSGT	Sop <sub>2</sub>	0.127 ± 0.005	12.9 ± 1.27	0.010 ± 0.001
	Sop <sub>3</sub>	0.574 ± 0.028	16.0 ± 1.95	0.036 ± 0.003
	Sop <sub>4</sub>	1.76 ± 0.059	21.9 ± 1.75	0.080 ± 0.004
	Sop <sub>5</sub>	2.44 ± 0.099	69.4 ± 3.98	0.035 ± 0.001
IaSGT	Sop <sub>2</sub>	8.00 ± 0.860	115 ± 15.8	0.069 ± 0.002
	Sop <sub>3</sub>	17.6 ± 0.917	298 ± 18.9	0.059 ± 0.001
	Sop <sub>4</sub>	4.75 ± 0.142	15.0 ± 1.16	0.317 ± 0.015
	Sop <sub>5</sub>	1.72 ± 0.101	22.0 ± 2.61	0.078 ± 0.005

ChSGT の Sop<sub>4</sub> および IaSGT の Sop<sub>3</sub> は 5 – 80 mM、それ以外は 5 – 40 mM での基質濃度でアッセイを行った。フィッティングは Grafit で行った。

Table 2. X 線結晶構造解析データ

Data set	IaSGT apo	IaSGT Glc	IaSGT Sop <sub>2</sub>
<b>Data collection</b>			
Beamline	BL-5A	BL-5A	BL-5A
Space group	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2
Unit cell parameters (Å)	<i>a</i> = 164.65, <i>b</i> = 71.68, <i>c</i> = 129.98	<i>a</i> = 163.43, <i>b</i> = 71.62, <i>c</i> = 130.16	<i>a</i> = 163.53, <i>b</i> = 71.66, <i>c</i> = 129.82
Resolution (Å) <sup>a</sup>	65.33–1.75 (1.78–1.75)	57.23 - 1.56 (1.58 - 1.56)	57.14 – 2.00 (2.03–2.00)
Total reflections <sup>a</sup>	453,438 (20,881)	546,460 (27,863)	307,557 (15,661)
Unique reflections <sup>a</sup>	146,514 (7,086)	196,574 (10,000)	97,561 (4,817)
Completeness (%) <sup>a</sup>	99.4 (97.7)	95.6 (98.5)	99.9 (99.9)
Redundancy <sup>a</sup>	3.1 (2.9)	2.8 (2.8)	3.2 (3.3)
Mean <i>I</i> /σ( <i>I</i> ) <sup>a</sup>	17.7 (6.0)	8.5 (1.6)	9.4 (2.8)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%) <sup>a</sup>	3.8 (15.6)	7.2 (55.9)	10.0 (38.6)
<i>R</i> <sub>pim</sub> (%) <sup>a</sup>	3.7 (15.2)	5.9 (44.3)	9.4 (25.6)
<i>CC</i> <sub>1/2</sub> <sup>a</sup>	(0.957)	(0.630)	(0.787)
<b>Refinement</b>			
Resolution (Å)	65.41–1.75	48.01–1.56	55.31–2.00
No. of reflections	139,184	192,253	92755
No. of atoms	12,379	12,446	12,278
No. of water molecules	729	770	597
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	19.42/21.52	20.21/21.49	19.06/21.58
r.m.s.d. from ideal values			
Bond lengths (Å)	0.0032	0.0018	0.003
Bond angles (°)	0.8114	1.1408	0.8431
Average <i>B</i> -factors (Å <sup>2</sup> )			
Protein (chain A/B)	12.8/14.9	14.3/11.8	12.7/16.7
Ligand		10.4	12.4
Solvent	17.1	17.3	15.6
Ramachandran plot (%)			
Favored	97.0	97.0	97.0
Allowed	3.0	3.0	2.0
Outlier	0	0	0

Data set	IaSGT Sop4	IaSGT E343G DNJ	IaSGT pNP- $\alpha$ -glc
<b>Data collection</b>			
Beamline	BL-5A	AR-NW12A	BL-5A
Space group	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2
Unit cell parameters ( $\text{\AA}$ )	$a = 163.74, b = 71.58, c = 129.87$	$a = 162.66, b = 71.65, c = 129.52$	$a = 163.53, b = 71.66, c = 129.82$
Resolution ( $\text{\AA}$ ) <sup>a</sup>	57.16–1.56 (1.58–1.56)	47.58 – 2.00 (2.03 – 2.00)	57.14 – 2.00 (2.03-2.00)
Total reflections <sup>a</sup>	598,039 (29,199)	736,150 (36,393)	307,557 (15,661)
Unique reflections <sup>a</sup>	199,196 (9,390)	96,821 (4,809)	97,561 (4,817)
Completeness (%) <sup>a</sup>	96.8 (92.6)	100.0 (100.0)	99.9 (99.9)
Redundancy <sup>a</sup>	3.0 (3.1)	7.6 (7.6)	3.2 (3.3)
Mean $I/\sigma(I)$ <sup>a</sup>	8.6 (1.5)	15.0 (4.1)	9.4 (2.8)
$R_{\text{merge}}$ (%) <sup>a</sup>	7.8 (66.2)	10.5 (49.8)	10.0 (38.6)
$R_{\text{pim}}$ (%) <sup>a</sup>	7.3 (60.0)	6.2 (29.5)	9.4 (25.6)
$CC_{1/2}$ <sup>a</sup>	(0.526)	(0.909)	(0.787)
<b>Refinement</b>			
Resolution ( $\text{\AA}$ )	57.23–1.56	43.11-2.00	55.31-2.00
No. of reflections	189,346	91,873	92755
No. of atoms	12,514	12,190	12,278
No. of water molecules	750	540	597
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	20.62/22.38	19.35/21.18	19.06/21.58
r.m.s.d. from ideal values			
Bond lengths ( $\text{\AA}$ )	0.0020	0.0021	0.003
Bond angles ( $^{\circ}$ )	1.1760	1.1791	0.8431
Average $B$ -factors ( $\text{\AA}^2$ )			
Protein (chain A/B)	13.3/16.6	22.1/25.2	19.7/22.3
Ligand	19.2	18.7	23.0
Solvent	19.3	23.6	24.6
Ramachandran plot (%)			
Favored	98.0	97.0	97.0
Allowed	2.0	3.0	2.0
Outlier	0	0	0

<b>Data set</b>	<b>IaSGT E343Q Sop4</b>
<b>Data collection</b>	
Beamline	BL-5A
Space group	<i>C2</i>
Unit cell parameters (Å)	<i>a</i> = 164.87, <i>b</i> = 71.55, <i>c</i> = 129.95
Resolution (Å) <sup>a</sup>	79.68–1.76 (1.79–1.76)
Total reflections <sup>a</sup>	516,885 (20,273)
Unique reflections <sup>a</sup>	143,523 (6,843)
Completeness (%) <sup>a</sup>	99.7 (96.8)
Redundancy <sup>a</sup>	3.6 (3.0)
Mean <i>I</i> /σ( <i>I</i> ) <sup>a</sup>	8.6 (1.1)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%) <sup>a</sup>	11.1 (84.1)
<i>R</i> <sub>pim</sub> (%) <sup>a</sup>	10.3 (74.5)
<i>CC</i> <sub>1/2</sub> <sup>a</sup>	(0.418)
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)	79.80–1.76
No. of reflections	136,343
No. of atoms	12,415
No. of water molecules	731
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	20.52/22.86
r.m.s.d. from ideal values	
Bond lengths (Å)	0.0019
Bond angles (°)	1.148
Average <i>B</i> -factors (Å <sup>2</sup> )	
Protein (chain A/B)	13.3/16.6
Ligand	19.2
Solvent	19.3
Ramachandran plot (%)	
Favored	97.0
Allowed	3.0
Outlier	0

a カッコ内は最外殻(最高分解能)における解析値を示す。



Table 3. IaSGT の配糖体をアクセプターとした際の反応速度論量解析

Donor	Acceptor	$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{\text{m}}$ (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$
<b>Acceptor</b>				
1 mM Sop <sub>2</sub>	<b><math>\alpha</math></b>			
	Methyl- $\alpha$ -Glc	1.0 $\pm$ 0.070	0.20 $\pm$ 0.027	4.9 $\pm$ 0.36
	Ethyl- $\alpha$ -Glc	0.55 $\pm$ 0.016	0.044 $\pm$ 0.0041	13 $\pm$ 0.87
	Phenyl- $\alpha$ -Glc	1.8 $\pm$ 0.11	0.22 $\pm$ 0.027	8.1 $\pm$ 0.51
	$\alpha$ -Arbutin	8.7 $\pm$ 0.58	0.38 $\pm$ 0.041	0.023 $\pm$ 0.0011
	<i>p</i> NP- $\alpha$ -Glc	5.0 $\pm$ 0.27	0.13 $\pm$ 0.015	39 $\pm$ 2.8
	Benzyl- $\alpha$ -Glc	0.86 $\pm$ 0.042	0.096 $\pm$ 0.011	9.0 $\pm$ 0.69
	2-Naphthyl- $\alpha$ -Glc	3.9 $\pm$ 0.27	0.15 $\pm$ 0.022	26 $\pm$ 2.2
	<b><math>\beta</math></b>			
	Methyl- $\beta$ -Glc	1.9 $\pm$ 0.20	0.13 $\pm$ 0.025	14 $\pm$ 1.3
	n-Octyl- $\beta$ -D- Glc	-	-	-
	$\beta$ -Arbutin	1.4 $\pm$ 0.037	0.026 $\pm$ 0.0026	0.055 $\pm$ 0.0044
	<i>p</i> NP- $\beta$ -Glc	0.46 $\pm$ 0.013	0.040 $\pm$ 0.0038	0.012 $\pm$ 0.0008
	Gastrodin	0.49 $\pm$ 0.012	0.042 $\pm$ 0.0034	0.012 $\pm$ 0.0007
	Salicin	0.88 $\pm$ 0.027	0.021 $\pm$ 0.0027	0.043 $\pm$ 0.0046
	Esculin	1.32 $\pm$ 0.053	0.045 $\pm$ 0.0057	0.029 $\pm$ 0.0028
	Amygdalin	0.35 $\pm$ 0.019	0.15 $\pm$ 0.018	2.3 $\pm$ 0.51
1 mM Sop <sub>3</sub>	<i>p</i> NP- $\alpha$ -Glc	2.7 $\pm$ 0.057	0.12 $\pm$ 0.0056	23 $\pm$ 0.68
<b>Donor</b>				
Sop <sub>2</sub>	400 $\mu$ M <i>p</i> NP- $\alpha$ -Glc	70 $\pm$ 3.0	9.6 $\pm$ 1.2	7.3 $\pm$ 0.65
Sop <sub>3</sub>	400 $\mu$ M <i>p</i> NP- $\alpha$ -Glc	12 $\pm$ 0.60	22 $\pm$ 2.3	0.54 $\pm$ 0.033

Sop<sub>2</sub>、Sop<sub>3</sub> 濃度を 1 mM に固定し、配糖体濃度を 2.5 – 400  $\mu$ M とした際の活性と *p*NP- $\alpha$ -glucoside を 400  $\mu$ M に固定し、Sop<sub>2</sub>、Sop<sub>3</sub> を 2.5 – 80 mM とした際の活性を求めた。紙面の都合上、glucoside は Glc と略した。

Table 4. ChSGT の配糖体をアクセプターとした際の比活性

Donor	Acceptor	比活性 (U/mg)
Sop <sub>2</sub>	Sop <sub>2</sub>	0.039±0.0002
	$\alpha$	
	Methyl- $\alpha$ -Glc	0.048± 0.0013
	Ethyl- $\alpha$ -Glc	0.047±0.0007
	Phenyl- $\alpha$ -Glc	0.039±0.0008
	$\alpha$ -Arbutin	0.042±0.0007
	<i>p</i> NP- $\alpha$ -Glc	0.044±0.0005
	Benzyl- $\alpha$ -Glc	0.047±0.0006
	2-Naphthyl- $\alpha$ -Glc	0.044± 0.0024
	$\beta$	
	Methyl- $\beta$ -GLc	0.049±0.0002
	n-Octyl- $\beta$ -D-Glc	0.051±0.0010
	$\beta$ -Arbutin	0.040±0.0010
	<i>p</i> NP- $\beta$ -Glc	0.052±0.0021
	Gastrodin	0.042±0.0003
	Salicin	0.036±0.0006
	Esculin	0.028±0.0008
	Amygdalin	0.044± 0.0010

基質はそれぞれ 10 mM、50 mM NaOAc buffer, pH 5.0 中で、37°C、1 時間反応した。U は  $\mu$ /mol/min を示す。

## 総括

本論文は、今まで存在しなかった Sop<sub>n</sub>S の比色定量法を確立しており、さらに Sop<sub>n</sub>S を基質とした糖転移反応という全く新しい活性を持つ酵素の機能と構造を明らかにした。簡便で低コストな比色定量法は近年活発になってきている Sop<sub>n</sub>S 関連の研究に大いに貢献すると期待できる。また、新規酵素の機能のみならず様々な複合体構造を明らかにすることは学術的に大変意義のある結果であると言える。新しい活性を持つ酵素の発見は、様々な分野への応用が期待できる。今後の展望としては、これらの新規酵素の生体的な意義やクラスター内の酵素やタンパク質も含めた詳細な代謝経路が明らかになれば、複雑な糖代謝を解明する一助になるであろう。

## 参考文献

1. Zhang, M., Chekan, J. R., Dodd, D., Hong, P. Y., Radlinski, L., Revindran, V., Nair, S. K., Mackie, R. I., Cann, I. (2014) Xylan utilization in human gut commensal bacteria is orchestrated by unique modular organization of polysaccharide-degrading enzymes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **111**, E3708–E3717
2. Scheppach, W. (1994) Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function., *Gut*. **35**, 35-38
3. Yamashita, H., Fujisawa, K., Ito, E., Idei, S., Kawaguchi, N., Kimoto, M., Hiemori, M. & Tsuji, H. (2007) Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**:1236–1243.
4. Gobinath, D., Madhu, A.N., Prashant, G., Srinivasan, K., Prapulla, S.G. (2010) Beneficial effect of xylo-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Nutr.* **104**, 40–47
5. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B. (2014) The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* **42**, D490–D495.
6. Henrissat B., Davies G. J. (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Op. Struct. Biol.* **7**, 637-644
7. Selvendran, R.R. (1984) The plant cell wall as a source of dietary fiber: Chemistry and structure. *Am. J. Clin. Nut.* **39**, 320–337
8. Davies, G., Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases, *Structure* **3**, 853-859
9. Nakamura, A., Ishida, T., Samejima, M., Igarashi, K. (2015) Growth of a large crystal of inverting cellulase for neutron/X-ray structural analysis. *Nihon Kessho Gakkaishi* **57**, 59-65
10. Arantes, V., Saddler, J. N. (2012) The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnol Biofuels*. **4**, 36
11. Shia, L., Lia, Z., Tachikawab, H., Gaoa, X., Nakanishi, H. (2014) Use of Yeast Spores for Microencapsulation of Enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 4502-4510
12. Fei, X.Z., Qin, H.W., Si, J.J., Yu, L.Z., Gui, M.Z., Yan, H.M. (2014) Developing a xylanase XYNZG from *Plectosphaerella cucumerina* for baking by heterologously expressed in *Kluyveromyces lactis*. *BMC biotechnol.* **14**, 107
13. Kroon, P., Conesa, M. G., Fillingham, I., Hazlewood, G., Williamson, G. (1999) Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *J Sci Food Agric.* **79**, 428–434
14. Anbara, M., Gulb, O., Lamedc. R., Sezermanb, U. O., Bayera, E. A. (2012) Improved

Thermostability of *Clostridium thermocellum* Endoglucanase Cel8A by Using Consensus-Guided Mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3458-3464

15. Lo, J., Zheng, T., Hon, S., Olson, D., Lynda, L. (2015) The Bifunctional Alcohol and Aldehyde Dehydrogenase Gene, *adhE*, Is Necessary for Ethanol Production in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *J. Bacteriol.* **197**, 1386-1393
16. Breedveld, M. W., Miller, K. J. (1994) Cyclic  $\beta$ -Glucans of Members of the Family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* 145–161
17. Briones, G., Iannino, N. I., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P.S., Ugalde, R.A. (2001) *Brucella abortus* Cyclic  $\beta$ -1,2-Glucan Mutants Have Reduced Virulence in Mice and Are Defective in Intracellular Replication in HeLa Cells. *Infect. Immun.* **69**, 4528–4535
18. Gay-Fraret, J., Ardisson, S., Kambara, K., Broughton, W. J., Deakin, W. J., Le Quéré, A. (2012) Cyclic- $\beta$ -glucans of *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) sp. strain NGR234 are required for hypo-osmotic adaptation, motility, and efficient symbiosis with host plants. *FEMS Microbiol. Lett.* **333**, 28–36
19. Hisamatsu, M., Amemura, A., Matsuo, T., Matsuda, H., Harada, T. (1982) Cyclic (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D -Glucan and the Octasaccharide Repeating-unit of Succinoglycan Produced. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1873–1879.
20. Hisamatsu, M. (1992) Cyclic (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -d-glucans (cyclosophorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **231**, 137–146
21. Reyes Suárez, E., Bugden, S. M., Kai, F. B., Kralovec, J. A., Nosedá, M. D., Barrow, C. J., Grindley, T. B. (2008) First isolation and structural determination of cyclic  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-glucans from an alga. *Chlorella pyrenoidosa*. *Carbohydr. Res.* **343**, 2623–2633
22. Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyón, I., Gorvel, J. P. (2005) Cyclic  $\beta$ -1,2-glucan is a *brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat. Immunol.* **6**, 618–625
23. Javvadi, S., Pandey, S. S., Mishra, A., Pradhan, B. B., Chatterjee, S. (2018) Bacterial cyclic  $\beta$ -(1,2)-glucans sequester iron to protect against iron-induced toxicity. *EMBO Rep.* **19**, 172–186.
24. Rigano, L. A., Payette, C., Brouillard, G., Marano, M. R., Abramowicz, L., Torres, P. S., Yun, M., Castagnaro, A. P., El Oirdi, M., Dufour, V., Malamud, F., Dow, J. M., Bouarab, K., Vojnov, A. A. (2007) Bacterial Cyclic  $\beta$ -(1,2)-Glucan Acts in Systemic Suppression of Plant Immune Responses. *Plant Cell.* **19**, 2077–2089
25. Lee, S., Seo, D., and Kim, H. (2001) Investigation of inclusion complexation of paclitaxel by cycloheptakis-(1 $\rightarrow$ 2)-( $\beta$ -D-glucopyranosyl), by cyclic-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucans (cyclosophoraoses), and by cyclomaltoheptaoses ( $\beta$ --cyclodextrins). **334**, 119–126
26. Trinder, P. (1969) Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* **6**, 24–27

27. Somogyi, M. (1952) Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19–23
28. Jue, C. K., Lipke, P. N., (1985) Determination of reducing sugars in the nanomole range with tetrazolium blue. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **11**, 109–115
29. Park, J.T., Johnson, M.J. (1949) A submicrodetermination of glucose. *J. Biol. Chem.* **181**, 149–151
30. Raju, T. S., Nayak, N., Briggs, J., O'Connor, J. V., Lerner, L. (1999) A convenient microscale colorimetric method for terminal galactose on immunoglobulins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 196–201
31. Lever, M. (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal. Biochem.* **47**, 273–279
32. Miller, G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428
33. Hauser, T. R., Cummins, R. L. (1964) Increasing Sensitivity of 3-Methyl-2-Benzothiazolone Hydrozone Test for Analysis of Aliphatic Aldehydes in Air. *Anal. Chem.* **36**, 679–681
34. Nebel, G. (1981) Determination of total aliphatic aldehydes in auto exhaust by a modified 2-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone method. **1709**, 1708–1709
35. Anthon, G. E., Barrett, D. M. (2002) Determination of reducing sugars with 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone. *Anal. Biochem.* **305**, 287–289
36. Honda, S., Yoshiko, N., Hirokazu, C., Kazuaki, K. (1981) Determination of carbohydrates by condensation with 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone. *Anal. Chim. Acta.* **131**, 239–296
37. Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. (2004) A reliable reducing end assay for chito-oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* **56**, 35–39
38. Reese, E. T., Parrish, F. W. and Mandels, M. (1961)  $\beta$ -D-1,2-Glucanases in fungi. *Can. J. Microbiol.* **7**, 309–317
39. Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., Singh, R. M. M. (1966) Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry.* **5**, 467–477
40. Vogel, S. N., Sultan, T. R., Ten Eyck, R. P. (1981) Cyanide poisoning, *Clin. Toxicol.* **18**, 367–383
41. Hunig, S. and Fritsch, K. H. (1957) Azofarbstoffe Durch Oxydative Kupplung III. Tetra - aza - pentamethincyanine und Dehydro - formazane. *Ann. Chem.* **609**, 172–180
42. Nakajima, M., Imamura, H., Shoun, H., Horinouchi, S., Wakagi, T. (2004) Transglycosylation Activity of *Dictyoglomus thermophilum* Amylase A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 2369–2373
43. Abe, K., Sunagawa, N., Terada, T., Takahashi, Y., Arakawa, T., Igarashi, K., Samejima, M., Nakai, H., Taguchi, H., Nakajima, M., Fushinobu, S. (2018) Structural and thermodynamic insights into  $\beta$ -1,2-glucooligosaccharide capture by a solute-binding protein in *Listeria innocua*. *J. Biol. Chem.* **293**, 8812–8828
44. Nakajima, M., Yoshida, R., Miyanaga, A., Abe, K., Takahashi, Y., Sugimoto, N. , Toyozumi, H.,

- Nakai, H., Kitaoka, M., Taguchi, H. (2016) Functional and structural analysis of a  $\beta$ -glucosidase involved in  $\beta$ -1,2-glucan metabolism in *Listeria innocua*. *PLoS One*. **11**, 1–19
45. Ishiguro, R., Tanaka, N., Abe, K., Nakajima, M., Maeda, T., Miyanaga, A., Takahashi, Y., Sugimoto, N., Nakai, H., Taguchi, H. (2017) Function and structure relationships of a  $\beta$ -1,2-glucooligosaccharide-degrading  $\beta$ -glucosidase. *FEBS Lett.* **591**, 3926–3936
  46. Shimizu, H., Nakajima, M., Miyanaga, A., Takahashi, Y., Tanaka, N., Kobayashi, K., Sugimoto, N., Nakai, H., and Taguchi, H. (2018) Characterization and structural analysis of a novel exo-type enzyme acting on  $\beta$ -1,2-glucooligosaccharides from *Parabacteroides distasonis*. *Biochemistry*. 10.1021/acs.biochem.8b00385
  47. Plutman, E. W., Potter, A. L., Hodgson, R., Hassid, W. Z., (1950) *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 5024
  48. Kitahata, S. and Edagawa, S. (1987) Cyclic (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucan-hydrolyzing enzymes from *Acremonium* sp. 15 purification and some properties of *endo*-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-glucanase and  $\beta$ -D-glucosidase. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2701–2708
  49. Mendoza, N.S., and Amemura, A. (1983) (1,2)- $\beta$ -D-Glucan-hydrolyzing enzymes in *Cytophaga rvensicola*: partial purification some properties of *endo*-(1,2)- $\beta$ -glucanase and  $\beta$ -D-glucosidase specific for (1,2)-and (1,3)-linkages. *J. Ferment. Technol.* **61**, 473–481
  50. Abe, K., Nakajima, M., Yamashita, T., Matsunaga, H., Kamisuki, S., Nihira, T., Takahashi, Y., Sugimoto, N., Miyanaga, A., Nakai, H., Arakawa, T., Fushinobu, S., and Taguchi, H. (2017) Biochemical and structural analyses of a bacterial *endo*- $\beta$ -1,2-glucanase reveal a new glycoside hydrolase family. *J. Biol. Chem.* **292**, 7487–7506
  51. Nakajima, M., Toyozumi, H., Abe, K., Nakai, H., Taguchi, H., Kitaoka, M. (2014) 1,2- $\beta$ -oligoglucan phosphorylase from *Listeria innocua*. *PLoS One*. **9**, 10.1371/journal.pone.0092353
  52. Nakajima, M., Tanaka, N., Furukawa, N., Nihira, T., Kodutsumi, Y., Takahashi, Y., Sugimoto, N., Miyanaga, A., Fushinobu, S., Taguchi, H., and Nakai, H. (2017) Mechanistic insight into the substrate specificity of 1,2- $\beta$ -oligoglucan phosphorylase from *Lachnoclostridium phytofermentans*. *Sci. Rep.* **7**, 1–11
  53. Abe, K., Sunagawa, N., Terada, T., Takahashi, Y., Arakawa, T., Igarashi, K., Samejima, M., Nakai, H., Taguchi, H., Nakajima, M., and Fushinobu, S. (2018) Structural and thermodynamic insights into -1,2-glucooligosaccharide capture by a solute-binding protein in *Listeria innocua*. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.RA117.001536
  54. Abe, K., Nakajima, M., Kitaoka, M., Toyozumi, H., Takahashi, Y., Sugimoto, N., Nakai, H., and Taguchi, H. (2015) Large-scale Preparation of 1,2- $\beta$ -Glucan Using 1,2- $\beta$ -Oligoglucan Phosphorylase. *J. Appl. Glycosci.* **62**, 47–52
  55. Foley, M. H., Cockburn, D. W., and Koropatkin, N. M. (2016) The Sus operon: a model system for starch uptake by the human gut Bacteroidetes. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 2603–2617
  56. Leslie, A. G. W. (1992) Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter Protein Crystallography. **26**

57. Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132
58. Vagin, A., and Teplyakov, A. (2010) Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25
59. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255
60. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
61. DeLano, W. L. (2002) *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA
62. Mine, S., Watanabe, M., Kamachi, S., Abe, Y., and Ueda, T. (2017) The structure of an archaeal  $\beta$ -glucosaminidase provides insight into glycoside hydrolase evolution. *J. Biol. Chem.* **292**, 4996–5006
63. 1. Ohto, U., Usui, K., Ochi, T., Yuki, K., Satow, Y., and Shimizu, T. (2012) Crystal structure of human  $\beta$ -galactosidase: Structural basis of G M1 gangliosidosis and morquio B diseases. *J. Biol. Chem.* **287**, 1801–1812
64. 1. Cheng, W., Wang, L., Jiang, Y. L., Bai, X. H., Chu, J., Li, Q., Yu, G., Liang, Q. L., Zhou, C. Z., and Chen, Y. (2012) Structural insights into the substrate specificity of *Streptococcus pneumoniae*  $\beta$ (1,3)-galactosidase BgaC. *J. Biol. Chem.* **287**, 22910–22918
65. Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S.C., Ester, M., Foster, L.J., Brinkman, F.S.L. (2010) PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* **26** (13), 1608-1615
66. Chou, K. and Shen, H. (2010) Cell-PLoc 2.0: an improved package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms, *Natural Science.* **2**, 1090-1103
67. Juncker, A. S., Willenbrock, H., von Heijne, G., Nielsen, H., Brunak, S. and Krogh, A. (2003) Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* **12**(8):1652-62



## 謝辞

本研究に対し指導及び助言を下された田口速男教授及び中島将博講師に感謝いたします。また、本実験に使用した直鎖状  $\beta$ -1,2-glucan や  $\beta$ -1,2-結合オリゴ糖を調製しご提供くださった東京大学の阿部紘一博士に感謝いたします。Sopns 基質を調製及びご提供くださった中井博之准教授、仁平高則特任助教、新正浩暉学士、杉本直久博士研究員、高橋侑汰修士に感謝いたします。基質調製に関してご協力いただいた農業・食品産業技術総合研究機構の北岡本光研究領域長及び環状  $\beta$ -1,2-glucan を提供してくださった三重大大学の久松眞教授及び磯野直人准教授に感謝いたします。構造解析に関して有用な助言及びご協力くださった東京工業大学宮永顕正助教に感謝いたします。また、X 線回折データの収集にご協力いただいた高エネルギー加速器研究機構の全てのスタッフに感謝いたします (Proposal number、2016G619)。