

NEWS RELEASE

**三重大学大学院生物資源学研究科 磯野直人 准教授らの研究グループ
新しい酵素を発見**

- 細菌 *Paenibacillus borealis* から糖質分解酵素「3-O-β-D-グルコピラノシル-β-D-グルクロニドホスホリラーゼ」が発見された。
- この酵素は細菌や植物由来の多糖や配糖体の分解に関与していると予想される。
- 2023 年 1 月に国際生化学・分子生物学連合 (IUBMB) によって新規酵素と認められ、EC 番号*1 2.4.1.392 が割り振られた。

【概要】

三重大学大学院生物資源学研究科の磯野 直人 准教授、勝崎 裕隆 准教授、北海道大学大学院農学研究院の佐分利 亘 准教授らが発見した酵素「3-O-β-D-グルコピラノシル-β-D-グルクロニドホスホリラーゼ」が国際生化学・分子生物学連合 (IUBMB) によって新規酵素と認められ、新しい EC 番号(酵素番号: Enzyme Commission number)が割り振られました (<https://www.enzyme-database.org/query.php?ec=2.4.1.392>)。この酵素は細菌 *Paenibacillus borealis* から発見されたもので、「グルクロン酸*2」という酸性糖*3 を含む多糖や配糖体の分解に関与していると思われます。

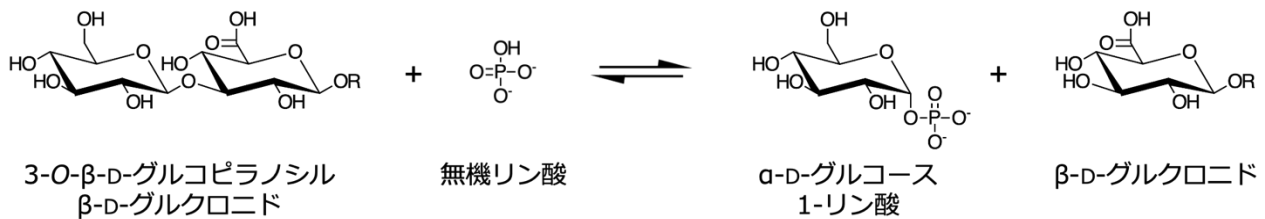
【背景】

糖質ホスホリラーゼ(GP)は炭水化物の加リン酸分解とその逆反応を触媒する酵素です。新規 GP の発見はその酵素を有する生物の代謝メカニズムの解明に寄与するほか、有用なオリゴ糖や多糖の合成法の開発にも役立ちます。近年、次世代シーケンス技術の発展により膨大な遺伝子配列情報がデータベースに蓄積されるようになりましたが、まだ多くの遺伝子の機能は明らかになっておらず、未知遺伝子の中には酵素をコードしているものも多く存在すると考えられています。糖質加水分解酵素ファミリー*4 94 (GH94) には、β-グリコシド結合の加リン酸分解を可逆的に触媒する GP が 8 種類含まれています(論文発表前)。現在、5,000 以上のタンパク質(アミノ酸配列)が GH94 ファミリーに分類されていますが、その触媒機能が実験的に確認されたタンパク質は 1 % 以下に過ぎません。そこで、本研究では GH94 に属する新規 GP の探索を行うことにしました。

【研究内容】

Paenibacillus borealis DSM 13188 株はフィンランドの酸性腐植土から単離された細菌で、そのゲノム DNA には合計 8 種類の GH94 タンパク質がコードされています。このうちの一つ、PBOR_13355 タンパク質のアミノ酸配列は、GH94 に属する既知の GP と低い類似性(15-31 %)しか示しませんでした。そこで PBOR_13355 タンパク質の機能を調べるために、大腸菌を用いて組換え酵素を生産し、精製しました。α-グルコース 1-リン酸をドナー基質とした合成反応(加リン酸分解の逆反応)では、酸性糖であるグルクロン酸、あるいはグルクロン酸の配糖体 (p-ニトロフェニル β-グルクロニド)をアクセプター基質とした場合にのみ、酵素活性が観察されました。このような基質特異性を示す酵素はこれまでに報告されていなかったため、グルクロン酸をアクセプター基質とした時に生じた化合物を精製し、核

磁気共鳴分光法と質量分析法により化学構造を決定しました。その結果、PBOR_13355 タンパク質の生成物は「3-O-β-D-グルコピラノシル-D-グルクロン酸」であることが明らかとなりました。これらの結果から、PBOR_13355 タンパク質を新規酵素「3-O-β-D-グルコピラノシル-β-D-グルクロニドホスホリラーゼ」と命名しました(図)。



PBOR_13355 遺伝子のすぐ下流にある PBOR_13360 遺伝子には、GH2 ファミリーに属する糖質加水分解酵素がコードされています。組換えタンパク質を用いて PBOR_13360 タンパク質の機能を調べたところ、D-グルクロン酸のβ型配糖体のグリコシド結合を加水分解するβ-グルクロニダーゼ (EC 3.2.1.31) であることが分かりました。そのため、今回発見した新規酵素 3-O-β-D-グルコピラノシル-β-D-グルクロニドホスホリラーゼ (PBOR_13355 タンパク質) とβ-グルクロニダーゼ (PBOR_13360 タンパク質) は協調して、-Glc(β1-3)GlcA-(グルコースとグルクロン酸がβ-1,3-グリコシド結合した二糖)の構造を含む炭水化物の分解を行う役割があると推察されました。このような構造の炭水化物は細菌の菌体外多糖や莢膜多糖体、菌類の酸性多糖、高等植物の配糖体に存在することが報告されています。*Paenibacillus borealis* は PBOR_13355 タンパク質や PBOR_13360 タンパク質を用いて、これらの炭水化物を分解して、生じた単糖をエネルギー生産や物質生産に利用していると考えられました。

酵素は触媒する反応の種類により国際生化学・分子生物学連合(IUBMB)により分類され、EC 番号(酵素番号)が与えられます。本研究に関する論文を発表した後、IUBMB に対して新酵素の提案を行っていましたが、2023 年 1 月に 3-O-β-D-グルコピラノシル-β-D-グルクロニドホスホリラーゼが新規酵素であると認められ、EC 番号 2.4.1.392 が付与されました(<https://www.enzyme-database.org/query.php?ec=2.4.1.392>)。

【今後の展望】

Paenibacillus borealis における酸性糖の代謝のメカニズムについて、さらに理解を深めるためには PBOR_13355 遺伝子の周辺にコードされている溶質結合タンパク質や多糖分解酵素の機能解析も必要だと思われます。また、今回発見した 3-O-β-D-グルコピラノシル-β-D-グルクロニドホスホリラーゼを利用すると希少な酸性オリゴ糖を製造することができます。この生理機能についても興味深いと考えています。

【用語解説】

*1 EC 番号(酵素番号:Enzyme Commission number):

酵素をその特性(反応特異性と基質特異性)によって系統的に分類するための番号で、EC で始まる 4 組の数字より成る。国際生化学・分子生物学連合が管理しており、1961 年から使用されている。現在、約 6,700 の酵素に EC 番号が割り当てられている。

*2 グルクロン酸:

グルコースの 6 位の炭素が酸化された構造の酸性糖。ウロン酸の一種。動物のヒアルロン酸、植物のヘミセルロース(細胞壁成分)、細菌多糖、植物配糖体など、様々な炭水化物の構成糖である。

*3 酸性糖

プロトン供与体となる単糖(ウロン酸など)や、その単糖を構成糖に含む炭水化物。

*4 糖質加水分解酵素ファミリー:

アミノ酸配列の類似性に基づいて、進化的に近い関係にある酵素同士をファミリーとした分類法。現在、174 のファミリーに分類されている。糖質ホスホリラーゼの多くは糖質加水分解酵素ファミリーに属している。

【論文情報】

掲載誌: Biochemical and Biophysical Research Communications

掲載日: 2022 年 10 月 15 日

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.07.098>

論文タイトル: Functional characterization of a novel GH94 glycoside phosphorylase, 3-*O*- β -D-glucopyranosyl β -D-glucuronide phosphorylase, and implication of the metabolic pathway of acidic carbohydrates in *Paenibacillus borealis*

著者: Naoto Isono, Emi Mizutani, Haruka Hayashida, Hirotaka Katsuzaki, and Wataru Saburi

<本件に関するお問合せ>

三重大学大学院生物資源学研究科 准教授

磯野直人(いそのなおと)

E-mail: isono@bio.mie-u.ac.jp