

## [成果情報名] 新規糖質ホスホリラーゼの発見とそれらを利用したオリゴ糖製造技術

**[要 約]** 糖質ホスホリラーゼはオリゴ糖の合成に利用できる有用酵素であるが、これまで報告されている種類は多くない。今回、新たに4種の酵素を同定した。これらの新規ホスホリラーゼを利用して、種々の $\alpha$ グルコシド及び $\beta$ マンノシドを効率的に合成できる。

**[キーワード]** オリゴ糖、ホスホリラーゼ、実用的製造技術、N-結合型糖鎖、セロビオン酸

**[担当]** 加工流通プロセス・食品生物機能利用

**[代表連絡先]** 電話 029-838-7991

**[研究所]** 食品総合研究所・食品バイオテクノロジー研究領域

**[分類]** 研究成果情報

### [背景・ねらい]

通常良く行われている糖質加水分解酵素を利用したオリゴ糖製造では原料と同じ結合を持つオリゴ糖しか製造することができない。一方糖質ホスホリラーゼを用いたオリゴ糖製造法では原料と異なる結合のオリゴ糖を製造することが可能である。しかしながら、ホスホリラーゼの種類が少ないこと及びホスホリラーゼを利用する反応系の開発が進んでいないことから製造可能なオリゴ糖のバリエーションが少なかった。これらの難点を解消するために、新規なホスホリラーゼの探索とそれら酵素を利用するオリゴ糖合成複合酵素系の構築を行った。

### [成果の内容・特徴]

1. 腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* から発見した Man $\beta$ 1,4GlcNAc ホスホリラーゼ (表 1) は N 結合型糖タンパク糖鎖のコア構造に含まれる二糖の Man  $\beta$ 1,4GlcNAc を特異的に加リン酸分解する酵素である。 $\beta$  マンノシドは化学合成の難しい糖として知られており、本酵素の利用により生化学的に重要な二糖である Man $\beta$ 1,4GlcNAc を効率的に製造することが可能である。
2. 植物病原性細菌 *Xanthomonas campestris* および糸状菌 *Neurospora crassa* ゲノム中に確認された新規酵素セロビオン酸ホスホリラーゼ (表 1) はセロビオン酸及び Glc $\beta$ 1,3GlcUA を加リン酸分解する。セロビオン酸はいくつかの糸状菌によるセルロース分解の過程においてセロビオースデヒドロゲナーゼにより生成することが知られていたが、セロビオン酸自体の代謝過程は不明であった。本酵素の利用により、糸状菌によるセルロース分解に関する理解が進むとともに、セロビオン酸の合成が容易となる。
3. 塩湖土壌に生息する細菌 *Bacillus selenitireducens* には 2-O- $\alpha$ -グルコシルグリセロールホスホリラーゼ、また、非病原性リステリア属細菌 *Listeria innocua* には 1,2- $\beta$ -マンノビオースホスホリラーゼといった新規ホスホリラーゼをコードする新規遺伝子が見いだされる。(表 1)
4.  $\alpha$ -グルコース 1-リン酸を  $\alpha$ -マンノース 1-リン酸または  $\beta$ -グルコース 1-リン酸に変換する酵素系を開発した。 $\alpha$ -マンノース 1-リン酸および  $\beta$ -グルコース 1-リン酸生成型ホスホリラーゼを組み合わせることで、蔗糖・澱粉・セロビオース等の安価な糖資源を出発原料として  $\alpha$  グルコシド及び  $\beta$  マンノシドを調製することができる。(図 1)

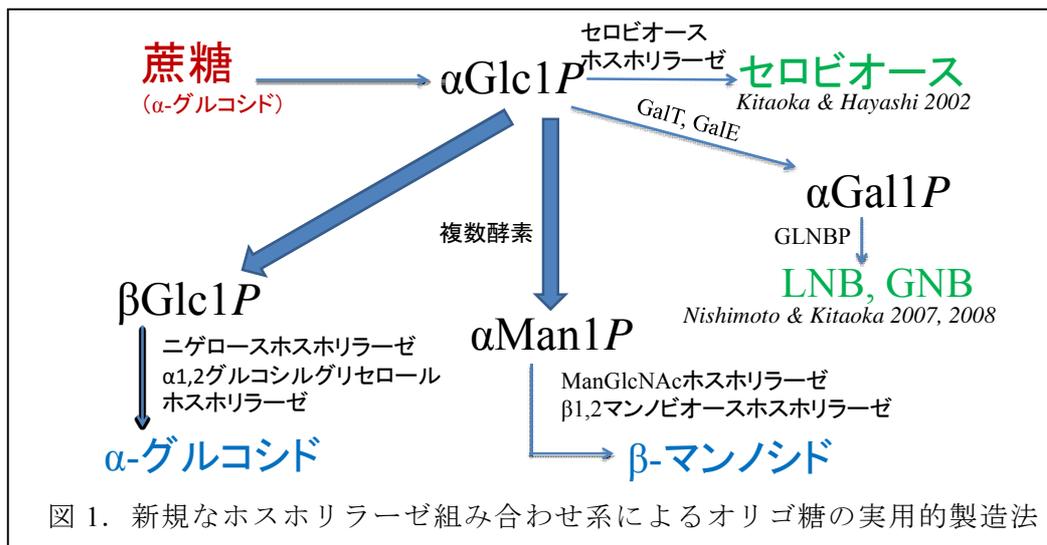
### [成果の活用面・留意点]

1. 本研究で見いだされたホスホリラーゼをスクロースホスホリラーゼとの組み合わせ反応を行うことにより、Man $\beta$ 1,4GlcNAc、セロビオン酸などの有用なオリゴ糖を実用的に製造することが可能である。

[具体的データ]

EC番号	酵素名	反応機構	生成物	ファミリー
2.4.1.1	グリコーゲンホスホリラーゼ	保持型	$\alpha$ -Glc1P	GT35
2.4.1.7	スクロースホスホリラーゼ	保持型	$\alpha$ -Glc1P	GH13
2.4.1.8	マルトースホスホリラーゼ	反転型	$\beta$ -Glc1P	GH65
2.4.1.20	セロビオースホスホリラーゼ	反転型	$\alpha$ -Glc1P	GH94
2.4.1.30	1,3- $\beta$ -オリゴグルカンホスホリラーゼ	反転型	$\alpha$ -Glc1P	NI
2.4.1.31	ラミナリビオースホスホリラーゼ	反転型	$\alpha$ -Glc1P	GH94
2.4.1.49	セロデキストリンホスホリラーゼ	反転型	$\alpha$ -Glc1P	GH94
2.4.1.64	トレハロースホスホリラーゼ (反転型)	反転型	$\beta$ -Glc1P	GH65
2.4.1.97	1,3- $\beta$ -グルカンホスホリラーゼ	反転型	$\alpha$ -Glc1P	NI
2.4.1.211	1,3- $\beta$ -Gal-HexNAcホスホリラーゼ	反転型	$\alpha$ -Gal1P	GH112
2.4.1.216	トレハロース6-リン酸ホスホリラーゼ	反転型	$\beta$ -Glc1P	GH65
2.4.1.230	コージビオースホスホリラーゼ	反転型	$\beta$ -Glc1P	GH65
2.4.1.231	トレハロースホスホリラーゼ (保持型)	保持型	$\alpha$ -Glc1P	GT4
2.4.1.247	1,4- $\beta$ -D-Gal-L-Rhaホスホリラーゼ	反転型	$\alpha$ -Gal1P	GH112
2.4.1.279	ニゲロースホスホリラーゼ	反転型	$\beta$ -Glc1P	GH65
2.4.1.280	<i>N,N'</i> -ジアセチルキトビオースホスホリラーゼ	反転型	$\alpha$ -GlcNAc1P	GH94
2.4.1.281	1,4- $\beta$ -Man-Glcホスホリラーゼ	反転型	$\alpha$ -Man1P	GH130
2.4.1.282	1,3- $\alpha$ -D-Glc-L-Rhaホスホリラーゼ	反転型	$\beta$ -Glc1P	GH65
2.4.1.*	$\beta$ -1,4-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼ	反転型	$\alpha$ -Man1P	GH130
2.4.1.*	Man $\beta$ 1,4GlcNAcホスホリラーゼ	反転型	$\alpha$ -Man1P	GH130
2.4.1.*	セロビオン酸ホスホリラーゼ	反転型	$\alpha$ -Glc1P	GH94
2.4.1.*	1,2- $\alpha$ -グルコシルグリセロールホスホリラーゼ	反転型	$\beta$ -Glc1P	GH65
2.4.1.*	1,2- $\beta$ -マンノピオースホスホリラーゼ	反転型	$\alpha$ -Man1P	GH130

表 1.  
既知のホスホリラーゼ  
太字：過去に筆者らの見つけた酵素  
赤字：今回発見した酵素  
\*酵素番号未確定



(北岡本光)

[その他]

中課題名：新需要創出のための生物機能の解明とその利用技術の開発  
 中課題番号：330d0  
 予算区分：交付金、委託プロ（農食事業）  
 研究期間：2011～2013年度  
 研究担当者：北岡本光・西本完  
 発表論文等：1) Nihira T. et al. (2014) PLoS ONE, 9(1):, e86548  
 2) Nihira T. et al. (2013) FEBS Lett., 587(21): 3556-3561  
 3) Nihira T. et al. (2013) J. Biol. Chem., 288(38): 27366-27374