

## 【成果情報名】 オリゴ糖ライブラリーの調製と利用

【要 約】 糖質関連酵素の基質認識を解明することを目的としてオリゴ糖ライブラリー調製、ライブラリーを利用した糖質関連酵素の機能解析、および新規なライブラリー調製法の開発を行った。まず、 $\beta$ 1,4 結合と  $\beta$ 1,3 結合が混在したヘテログルコオリゴ三～五糖完全ライブラリーを構築した。機能解析では、グルコ/キシロオリゴ糖ライブラリーを用いて見いだした新規酵素である還元末端特異性エキソオリゴキシラナーゼ(REX)の構造解析を行い、反応特性を示す構造基盤を明らかにした。調製法の開発では、四種類の GH10 キシラナーゼを  $\alpha$ -キシロピオシルフルオリドをドナーとしキシロオリゴ糖をアクセプターとした合成反応を触媒するグライコシターゼに変換した。

【部 署】 食品総合研究所・生物機能開発部・酵素機能研究室

【連絡先】 酵素機能研究室 029-838-8071

【成果区分】 参考

【キーワード】 キシラナーゼ、糖鎖合成、グライコシターゼ

---

## 【背景・ねらい】

酵素反応の高い基質特異性は、酵素が基質を特異的に認識・結合して反応を行うことにより得られる。特に糖質関連酵素は基質中に多数存在する水酸基の内の一部あるいは全部が対応するアミノ酸残基と相互作用することにより基質認識を行っている。これらの基質認識は、酵素の基質特異性情報と X 線結晶解析の結果を参照することにより、明確に理解することが可能である。しかしながらオリゴ糖並びに多糖に作用する酵素に関しては、天然に得られるオリゴ糖の種類が極めて限られることから、詳細な基質認識情報を得る方法が難しかった。本研究では基本骨格からわずかに異なる構造を持つオリゴ糖を個々に調製することによりオリゴ糖ライブラリーを構築し、それらに対する酵素の作用を網羅的に調べることにより基質認識の基質側の情報を詳細に得ることを目的とする。

## 【成果の内容・特徴】

1. セロデキストリンホスホリラーゼおよびラミナリピオースホスホリラーゼを用いることにより、 $\beta$ 1,4 結合と  $\beta$ 1,3 結合が混在したヘテログルコオリゴ糖の三～五糖の完全ライブラリーを構築した(図1)。
2. グルコ-キシロオリゴ糖ライブラリーにより特性の解明された還元末端キシロース遊離エキソキシラナーゼ(REX)の構造を解析し、還元末端特異性機構を与える構造基盤を解明した(図2)。
3. 糖加水分解酵素ファミリー10に属する四種類のキシラナーゼをグライコシターゼに変換した。得られた変異酵素は  $\alpha$ -キシロピオシルフルオリド( $X_2F$ )をドナーとし、キシロオリゴ糖をアクセプターとした合成反応を触媒した。 $X_2F$ のみを基質としたときはキシロースが  $\beta$ 1,4 結合したホモポリマーを生成した(図3)。アクセプター特異性は酵素により異なり重合度2以上のキシロオリゴ糖に作用する酵素(図4:酵素1,4)と重合度3以上でないとは作用しない酵素(図4:酵素2,3)に分類された。

## 【成果の活用面・留意点】

本研究で作成したオリゴ糖ライブラリーは生理活性研究に転用することが可能である。ライブラリーの中から生理活性の高い特定のオリゴ糖を見いだすことができれば大量調製も可能である。

## [ 具体的データ ]

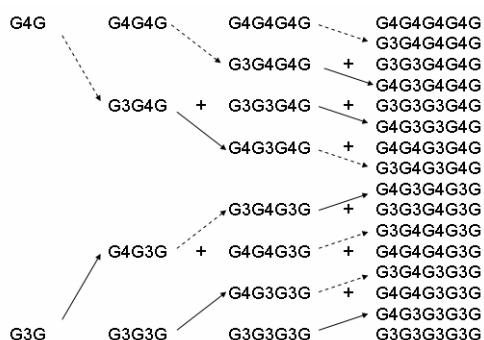


図 1 . 1,4 結合と 1,3 結合が混在したヘテロ  
グルコオリゴ糖の合成

実線 : セロデキストリンホスホリラーゼ

破線 : ラミナリビオースホスホリラーゼ

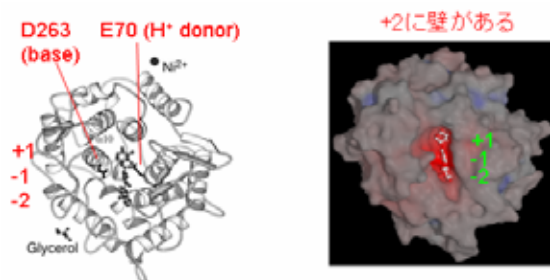


図 2 . 還元末端キシロース遊離エキソキシラ  
ナーゼ(REX)の立体構造

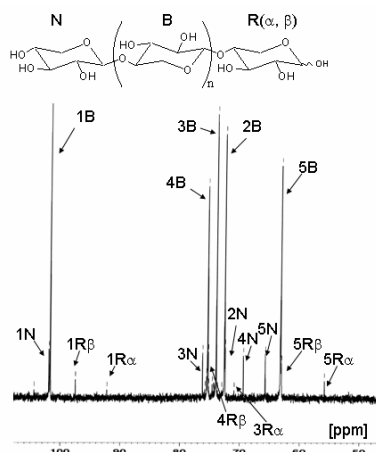


図 3 . GH10 グライコシンターゼにより生成  
したポリマーの <sup>13</sup>C-NMR スペクトル

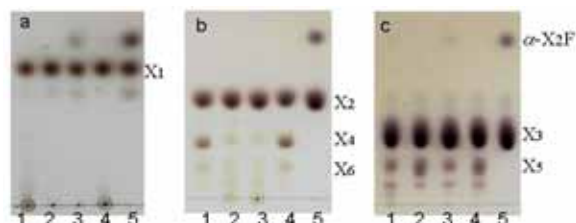


図 4 . アクセプター存在下での 4 種の GH10 グ  
ライコシンターゼの反応

a, X<sub>1</sub>; b, X<sub>2</sub>; c, X<sub>3</sub>

1, *Thermotoga maritima* XynB

2, *Clostridium thermocellum* XynB

3, *Bacillus halodurans* XynA

4, *Cellulomonas fimi* Cex

## [ その他 ]

研究課題名 : オリゴ糖ライブラリーを活用した酵素-糖質の分子間相互作用機構の解明

予 算 区 分 : 運営交付金プロジェクト・形態生理

研究 期 間 : 2004 ~ 2005 年度 ( 2005 年度 )

研究担当者 : 北岡本光

発表論文等 :

- 1 ) M. Sugimura *et al.*, Characterization of glycosynthase mutants derived from glycoside hydrolase family 10 xylanases, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2006) (in press)
- 2 ) S. Fushinobu *et al.*, Structural basis for the specificity of the reducing-end-xylose releasing exo-oligoxylanase from *Bacillus halodurans* C-125, *J. Biol. Chem.*, **280** (17), 17180-17186 (2005)