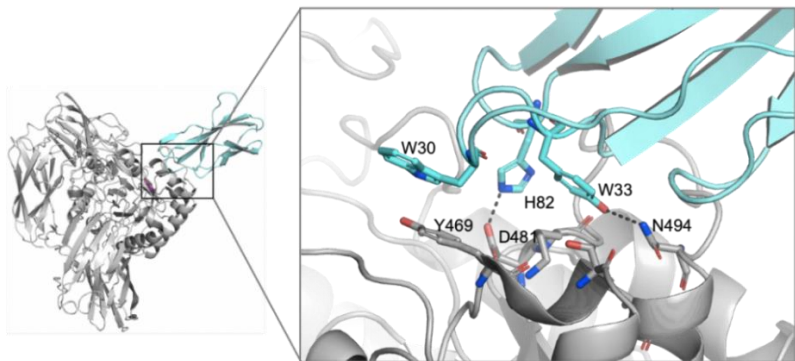
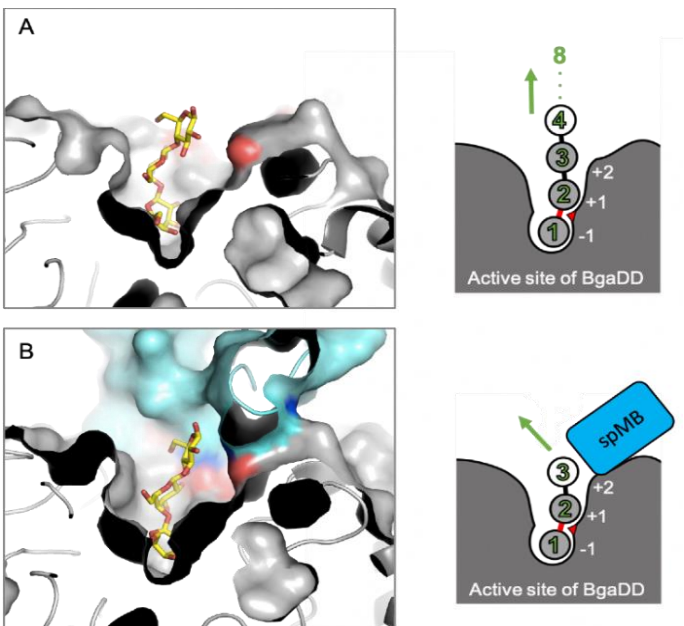
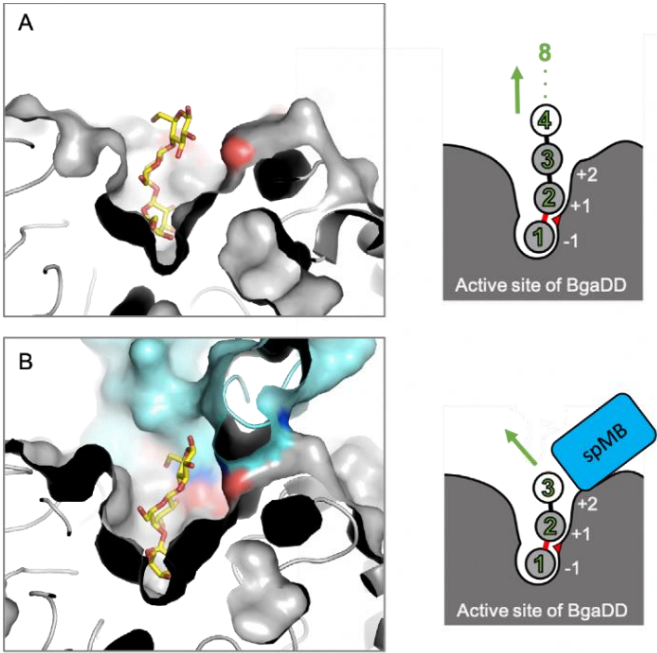


令和3年度京都府公立大学法人若手研究者・地域未来づくり支援事業研究成果報告書

	(所属)	(職名・学年)	(氏名)
研究者 (研究代表者)	京都府立大学大学院 生命環境科学研究科	准教授	田中 俊一
研究の名称	独自のタンパク質工学技術で切り開く、次世代型プレバイオティクスの生産基盤		
研究のキーワード	プレバイオティクス、ガラクトオリゴ糖、タンパク質工学、酵素、人工結合タンパク質		
研究の概要・ 背景	<p>ミルクオリゴ糖には様々な結合様式と重合度のものがあり、その種類は200を超える。この構造的多様性こそが、数多のプレバイオティクスとしての生理機能を発揮する基盤となっている。一方、ミルクオリゴ糖を模倣する食品素材としてガラクトオリゴ糖 (GOS) が利用されているが、その製造に使われる微生物由来β-ガラクトシダーゼは主に直鎖型GOSを作るため、構造的多様性に乏しいのが現状である。そこで本研究では、GOSの機能をよりミルクオリゴ糖に近づけることを志向し、分枝型GOSを効率的に産生するような改変型酵素の作出を目指した。</p> <p>図1. 産生ガラクトオリゴ糖の構造を改変する人工結合タンパク質 (水色) とガラクトオリゴ糖合成酵素 (灰色) との複合体構造</p>  <p>図2. 本研究で明らかとなった、人工結合タンパク質 (水色) による産生ガラクトオリゴ糖構造の改変メカニズム</p> 		

<p>研究手法</p>	<p>先行研究から、人工結合タンパク質（spMB）を<i>Bacillus circulans</i>由来β-ガラクトシダーゼ（BcBga）の基質結合部位周辺に結合させることで産生GOSを直鎖型β-1,4から分枝型β-1,3に改変できうることが分かっている。この知見を基に、本研究ではまず、spMBがBcBgaの特異性を改変するメカニズムを解明するために、spMBとBcBga、さらに産生物であるGOSを加えた3者複合体の結晶化ならびにX線結晶構造解析を行った。X線回折データの取得は大型放射光施設SPring-8にて実施した。その後、得られた構造情報に基づく変異体設計によって、分枝型GOSの産生能が向上した改変型酵素の創出に取り組んだ。なお、酵素反応によって産生されたGOSの解析には、ULTRON AF-HILIC-CDカラム（信和化工）を設置したLC-20AD HPLCシステム（島津製作所）を用いた。</p>
<p>研究の成果</p>	<p>本研究対象であるBcBgaとspMB、GOSの3者複合体のX線結晶構造解析に成功した。その構造から、spMBはBcBgaの活性中心近傍に結合しており、GOSの3糖目および4糖目部分の結合に対して立体的な障害を与えていることが確認された。図1 Aに示すように、野生型BcBgaにおいては、GOSは触媒中心から糖結合ポケットの外側へ直線的に結合しており、産生されるGOSは直線的なもの（つまり直鎖型GOS）に限定されると考えられる。一方で、図1 Bに示すように、spMBの活性中心近傍への結合は、GOSの3糖目および4糖目部分の結合に対して立体的な障害を与えており、そのためにGOSは直線的ではなく曲がった状態で結合していた。つまり、直鎖型糖よりも分枝型糖の産生に適した反応場が、spMBの結合によって作り出されていることが明らかとなった。</p> <p>得られた構造情報を基に、分枝型糖への特異性をさらに高めるような改良型spMBの創出を検証した。spMBの構成アミノ酸のうち、GOSの3糖目ならびに4糖目部分に立体障害を与えているアミノ酸（Y31、S83）を選択し、嵩高いアミノ酸へと置換した。その結果、表1に示すように、spMB/S83Y（spMB/SY）、spMB/S83W（spMB/SW）はその側鎖の大きさに応じて分枝型糖（β-1,3結合）の比率を向上させた。つまり、より大きな立体的障害を設計することで、分枝型糖への特異性を大きく向上させることに成功した。</p> <p>図1. spMBによるBcBgaの基質特異性改変メカニズム。GOS（黄色スティック）周辺の構造を示す。 A 野生型BcBgaによるGOS産生 B spMBが結合した状態でのBcBgaによるGOS産生</p> 

	<p>表1. 産生GOSの直鎖型と分枝型の比率</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2"></th> <th>BgaDD</th> <th>BgaDD</th> <th>BgaDD</th> <th>BgaDD</th> </tr> <tr> <th colspan="2"></th> <th></th> <th>+spMB</th> <th>+spMB/SY</th> <th>+spMB/SW</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">3 糖 GOS</td> <td>直鎖型</td> <td>92%</td> <td>60%</td> <td>37%</td> <td>28%</td> </tr> <tr> <td>分枝型</td> <td>8%</td> <td>40%</td> <td>63%</td> <td>72%</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">4 糖 GOS</td> <td>直鎖型</td> <td>95%</td> <td>40%</td> <td>38%</td> <td>26%</td> </tr> <tr> <td>分枝型</td> <td>5%</td> <td>60%</td> <td>62%</td> <td>74%</td> </tr> </tbody> </table>			BgaDD	BgaDD	BgaDD	BgaDD				+spMB	+spMB/SY	+spMB/SW	3 糖 GOS	直鎖型	92%	60%	37%	28%	分枝型	8%	40%	63%	72%	4 糖 GOS	直鎖型	95%	40%	38%	26%	分枝型	5%	60%	62%	74%
		BgaDD	BgaDD	BgaDD	BgaDD																														
			+spMB	+spMB/SY	+spMB/SW																														
3 糖 GOS	直鎖型	92%	60%	37%	28%																														
	分枝型	8%	40%	63%	72%																														
4 糖 GOS	直鎖型	95%	40%	38%	26%																														
	分枝型	5%	60%	62%	74%																														
今後の期待	<p>本研究では、産生される分枝型糖としてβ-1,3結合のものに焦点を当てたが、人工結合タンパク質が結合する部位によっては産生されるGOSの曲がり方をまた別の方向へと変えること、すなわち分枝のパターンをβ-1,2結合やβ-1,6結合のものへと変えることができると考えられる。</p> <p>現在、これらの可能性について検証を進めており、その先には、本研究の最終目標である『ガラクトオリゴ糖の機能をよりヒトミルクオリゴ糖の生理的機能に近づけるという意味での次世代型プレバイオティクスの生産基盤の構築』を目指していきたいと考えている。</p>																																		
研究発表	<ol style="list-style-type: none"> 第21回日本蛋白質科学会、2021年6月16-18日、「人工設計タンパク質を利用する新たな酵素機能改変戦略」、<u>田中俊一</u>、雨坂心人、高野和文 第471回光ナノサイエンス特別講義・第16回マテリアル特別講義（奈良先端科学技術大学院大学）、2021年12月7日、「人工結合タンパク質を利用する新たな酵素機能改変戦略」、<u>田中俊一</u> 																																		