Characterization and Application of 1,3-β-Glucan Phosphorylase from *Ochromonas danica**

Ochromonas danica 由来 1,3-β-グルカンホスホリラーゼの特性と応用*

(2015 年 2 月 16 日受付；2015 年 3 月 2 日受理)

磯野直人^{1,*}, 山本 豊¹, 西尾昌洋¹, 梅川逸人¹, 久松 眞¹

(いその なおと, やまもと ゆたか, にしお まさひろ, うめかわ はやと, ひさまつ まこと)

Naoto Isono,^{1,*} Yutaka Yamamoto,¹ Masahiro Nishio,¹ Hayato Umekawa¹ and Makoto Hisamatsu¹

¹ 三重大学大学院生物資源学研究科
514-8507 津市栗真町屋町 1577

¹ Graduate School of Bioresources, Mie University
Tsu 514-8507, Japan

要旨：1,3-β-グルカンホスホリラーゼ (BGP) は 1,3-β-グルコシド結合の加リン酸分解を可逆的に触媒する酵素である。BGP は 40 年以上前に発見された酵素であるが、研究報告がほとんどなく、詳細な性質が明らかにされてこなかった。本研究では *Ochromonas danica* 由来 BGP (OdBGP) の特性と一次構造を調べた。本酵素は三糖以上のラミナリオリゴ糖からラミナリンまで、幅広い分子量の糖質の加リン酸分解とその逆反応 (合成反応) を触媒した。反応平衡は合成方向に傾いていることがわかった。α-グルコース 1-リン酸とラミナリビオースを基質として OdBGP の反応を行ったところ、直鎖 1,3-β-グルカンが合成された。また、OdBGP とスクロースホスホリラーゼを併用した反応では、スクロースとグルコースを出発材料として 1,3-β-グルカンを一ポット合成することができた。酵素合成グルカンを高眼圧 (緑内障) モデルラットの硝子体に投与したところ、網膜神経節細胞の保護効果が認められた。OdBGP の一次構造中には既知の保存領域は認められなかったが、予測二次構造は GH 94 ファミリーのホスホリラーゼと類似していた。

キーワード：1,3-β-グルカン, ホスホリラーゼ, 酵素合成, 緑内障, 網膜保護***

1. はじめに

ホスホリラーゼは多糖やオリゴ糖の非還元末端のグリコシド結合を加リン酸分解し、糖 1-リン酸エステルを生成する酵素である¹⁾。これまでに 20 種類以上のホスホリラーゼが発見されている²⁾。また、ホスホリラーゼの反応は可逆であるため、糖 1-リン酸エステルを基質として反応を行うと、多糖、オリゴ糖、配糖体を合成することが可能である¹⁾。

1,3-β-グルカンは真菌、藻類、細菌などが生産する多糖である³⁾。1,3-β-グルカンには様々な種類があり、直鎖多糖であるカードランやパラミロン、1,6-β-結合によるグルコース分岐を有するシゾフィランやレンチナンなどが知られている。1,3-β-グルカンには免疫賦活、抗酸化、ゲル化、

整腸など種々の有用な機能があることが知られており、食品、化粧品、医薬品など幅広い分野で利用されている。

1,3-β-グルコシド結合を加リン酸分解するホスホリラーゼ [(1,3-β-グルコシル)_n + 無機リン酸 (Pi) ⇌ (1,3-β-グルコシル)_{n-1} + α-グルコース 1-リン酸 (α-G1P)] には、ラミナリビオースホスホリラーゼ (LBP, EC 2.4.1.31)、ラミナリデキストリンホスホリラーゼ (LDP, EC 2.4.1.30)、1,3-β-グルカンホスホリラーゼ (BGP, EC 2.4.1.97) の 3 種類がある¹⁾。LBP と LDP はいずれもミドリムシから発見された酵素である^{4,5)}。近年、LBP については、細菌 *Paenibacillus* sp. と *Acholeplasma laidlawii* にも存在することが報告された^{6,7)}。これらの 3 種類のホスホリラーゼは基質特異性が異なる。LBP はラミナリビオースの加リン酸分解 (およびその逆反応) を触媒する酵素であるが、三糖以上のラミナリ

*本原稿は、日本応用糖質科学会平成 26 年度大会応用糖質科学シンポジウムで一部発表された。

**連絡先 (Tel. 059-231-9613, Fax. 059-231-9684, E-mail: isono@bio.mie-u.ac.jp)

*** Key words: 1,3-β-glucan, phosphorylase, enzymatic synthesis, glaucoma, retinal protection

略記: BGP, 1,3-β-glucan phosphorylase; α-G1P, α-glucose 1-phosphate; LBP, laminaribiose phosphorylase; LDP, laminaridextrin phosphorylase; OdBGP, BGP from *Ochromonas danica*; Pi, inorganic phosphate; SP, sucrose phosphorylase.

オリゴ糖に対する活性は高くない⁶⁻¹⁰⁾。一方、LDPは三糖以上のラミナリオリゴ糖に対する活性が高い^{5,10)}。BGPは1969年にドイツのKauss博士らによって黄金色藻の*Poteroiochromonas malhamensis* (旧学名：*Ochromonas malhamensis*) から発見された酵素である¹¹⁾。本酵素に関する知見は発見当初に発表された2報の短い論文の内容に限られていた^{11,12)}。本酵素はLBPやLDPと異なり、多糖であるラミナリンに対して合成反応や分解反応を示す。また、グルコースをアクセプターとした合成活性が観察されないことが特徴である。しかし、ラミナリオリゴ糖に対する反応、酵素の分子量、反応産物の構造などをはじめとする酵素の基本的な情報については、当時の研究では明らかにされなかった。

本総説では微細藻類 *Ochromonas danica* 由来 BGP (OdBGP) の性質と一次構造に関する知見を紹介する。また、OdBGPを利用して、安価な低分子糖質から機能性 1,3-β-グルカン合成する方法を概説する。

2. OdBGP の特性¹³⁾

2.1 *O. danica* の培養と OdBGP の精製

O. danica は不等毛植物門黄金色藻綱に属する大きさ 10 μm ほどの淡水性単細胞藻類である。光独立栄養でも従属栄養でもどちらでも成長が可能な微細藻で、*P. malhamensis* と同様に細胞内の液胞に貯蔵多糖であるクリソラミナリンという 1,3-β-グルカン蓄積する特徴がある。*P. malhamensis* と比較すると、*O. danica* の方が培養は容易であり、かつ BGP を多く生産することがわかったため、研究材料として用いることにした。

人工気象器 (12 時間明期-12 時間暗期, 22°C) を用いて、*O. danica* NIES-2142 株を 7 日間種培養した。続いて、1.5% (w/v) グルコースを含む培地に種培養液を加え、光を照射せずに 30°C で 3 日間振とう培養した。

得られた細胞を超音波破碎したのち、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーで OdBGP を精製した。精製酵素を SDS-PAGE で解析したところ、3 本のバンド (113, 118, 124 kDa) が観察された。他のクロマトグラフィーによる精製を試みたが、これらのポリペプチドを分離することはできなかった。サイズ排除クロマトグラフィーでは 250 kDa の位置に酵素が溶出されたため、これらのポリペプチドがホモダイマーやヘテロダイマーを形成していることが示唆された。なお、N 末端アミノ酸配列や内部アミノ酸配列に違いがみられなかったため、3 種類のポリペプチドは同一遺伝子産物であると思われる。

2.2 OdBGP の酵素特性

はじめに、精製した OdBGP の加リン酸分解反応における基質特異性を調べた (表 1)。OdBGP はラミナリンのほか、三糖以上のラミナリオリゴ糖を加リン酸分解した。し

表 1. OdBGP の基質特異性^a

基質 (1 mM) ^b	相対分解活性 (%) ^c	相対合成活性 (%) ^c
グルコース	0	0
ラミナリビオース	0	69
ラミナリトリオース	70	81
ラミナリペンタオース	100	100
ラミナリン	89	359
セロビオース	0	3
セロテトラオース	0	9
ソホロース	0	2
ゲンチオビオース	0	0

^a文献 13) より改変して転載。^bラミナリンについては 10 mg/mL。^cラミナリペンタオースに対する活性をそれぞれ 100% とした。

かし、ラミナリビオースや、ラミナリオリゴ糖以外のオリゴ糖に対しては分解活性を示さなかった。次に、α-G1P をドナーとした合成反応における OdBGP のアクセプター特異性を調べた (表 1)。OdBGP は様々な大きさのラミナリオリゴ糖やラミナリンに対して高い合成活性を示した。また、セロオリゴ糖やソホロースに対しても低い活性を示した。しかし、グルコースをアクセプターとした場合は合成活性が観察されなかった。このように、ラミナリンに対して活性を示す点と、ラミナリビオースをほとんど合成・分解できない点が、LBP や LDP の基質特異性と大きく異なっていた。また、LDP と同様、三糖以上のラミナリオリゴ糖の合成・分解において高い活性を示すことが明らかとなった。合成反応における OdBGP の至適 pH は 5.5 で、pH 4.7 から 9.1 の間で酵素は安定であった。至適温度は 30°C 付近であった。また、40°C で長時間保持しても OdBGP は失活しなかった。また、分解反応の pH・温度特性は合成反応の場合とほぼ同様であった。

様々な濃度のラミナリトリオースと Pi を基質としたときの加リン酸分解速度を測定した。その結果、ラミナリトリオースに対する K_m は 4.1 mM、Pi に対する K_m は 4.4 mM、 k_{cat} は 400 s⁻¹ と計算された。また、LBP^{6,7,9)} と同様に、OdBGP の加リン酸分解反応は逐次 Bi Bi 機構にしたがって進行すると考えられた。

至適条件 (pH 5.5, 30°C) における反応の平衡を調べるために、分解反応時の α-G1P と Pi の経時変化を調べた (図 1 (A))。10 mM ラミナリトリオース (あるいはラミナリペンタオースやラミナリン) と 10 mM Pi を基質とした場合、α-G1P の増加量や Pi の減少量は非常に少なく、すぐに反応が平衡に達した。したがって、この条件では分解方向の反応はほとんど進行しないことが明らかとなった。次に、合成反応時の α-G1P と Pi の経時変化を調べた (図 1 (B))。10 mM ラミナリトリオース (あるいはラミナリペンタオースやラミナリン) と 10 mM α-G1P を基質とした場合、Pi 濃度がすぐに増加し、それに伴い α-G1P 濃度が大きく減少した。つまり、合成方向の反応は迅速に進行することがわかった。また、平衡時の α-G1P : Pi は 1 : 10 であった。

以上のように OdBGP の合成反応では様々な長さのラミナリオリゴ糖や 1,3- β -グルカンがアクセプターとなった。また、反応の平衡は合成方向に大きく傾いていることがわかった。これらのことから、OdBGP の合成反応を繰り返し行えば、低分子の基質 (例えばラミナリビオースと α -G1P) から、高分子の 1,3- β -グルカンを合成できるのではないかと考えた。

図 1. 酵素反応中の Pi 濃度と α -G1P 濃度の変化

各基質 (10 mM, ラミナリンのみ 20 mg/mL) に OdBGP (50 mU/mL) を作用させた後、反応液の Pi 濃度 (○, △, □) と α -G1P 濃度 (●, ▲, ■) を調べた。(A) ○と●, ラミナリトリオース + Pi; △と▲, ラミナリペンタオース + Pi; □と■, ラミナリン + Pi; (B) ○と●, ラミナリトリオース + α -G1P; △と▲, ラミナリペンタオース + α -G1P; □と■, ラミナリン + α -G1P。文献 13) より改変して転載。

3. OdBGP を用いた 1,3- β -グルカンの合成^{13,14)}

3.1 α -G1P を基質とした合成

α -G1P とラミナリビオースを基質として OdBGP の反応を行い、反応産物を経時的に TLC で調べた (図 2 (A))。反応の初期ではラミナリトリオース, ラミナリテトラオース, ラミナリペンタオースなどの生成が観察された。その後、反応時間が長くなるにつれて、より大きなオリゴ糖ができ、基質であるラミナリビオースを含む小さなオリゴ糖が消失した。さらに反応を続けると、TLC の原点の位置に濃いスポットが観察されるようになった。これらの結果から、OdBGP にはラミナリオリゴ糖を伸長するはたらきがあることが示唆された (図 2 (B))。また、短時間反応 (例えば 1 時間以下の反応) では、種々の小さなオリゴ糖 (主に三糖から九糖) が合成され、その間は高分子の産物が生じないことから、OdBGP の伸長様式は非プロセス型であると推測された。

一晚、OdBGP の反応を行ったところ、大量の沈澱物が生じた。この沈澱物は水にはほとんど溶けなかったが、アルカリやジメチルスルホキシドには溶解した。反応産物を 1,3- β -グルカン特異的蛍光色素であるアニリンブルー¹⁵⁾で染色したところ、直鎖 1,3- β -グルカンであるカードランやパラミロンと同等の蛍光強度が観察された。また、¹³C-NMR 分析やメチル化分析からも、沈澱物は直鎖の 1,3- β -グルカンであることが示された。合成収率は最大 80% と高かった。また、沈澱物を走査型電子顕微鏡写真で観察し

図 2. OdBGP による 1,3- β -グルカンの合成

(A) 100 mM α -G1P と 2.5 mM ラミナリビオースを基質として、OdBGP (50 mU/mL) の反応 (pH 5.5, 30°C) を行った。反応産物を経時的に回収し、脱塩・濃縮した後、TLC で解析した。M, マーカー (グルコース, ラミナリビオース, ラミナリトリオース, ラミナリテトラオース, ラミナリペンタオース, ラミナリヘキサオース, ラミナリヘプタオース)。文献 13) より改変して転載。(B) OdBGP による 1,3- β -グルカン鎖の伸長反応。(C) 酵素合成 1,3- β -グルカンの走査型電子顕微鏡写真。

たところ、多数の平板状六角形粒子やドーナツ状粒子が観察された(図2(C))。このような特徴的な形状の粒子は過去の1,3-β-グルカンの研究でも観察されている^{16,17)}。

OdBGPによって合成された1,3-β-グルカンの分子量分布をサイズ排除クロマトグラフィーで調べた。その結果、ドナーであるα-G1Pと合成反応のプライマーであるラミナリビオースの濃度比を大きくすると、長鎖の1,3-β-グルカン(最大で平均重合度100程度)が合成される傾向が認められた。このため、反応条件を最適に設定すれば、合成グルカンの平均鎖長を調節することができることがわかった。1,3-β-グルカンの機能性は鎖長によって異なることがあるため¹⁸⁾、任意の鎖長の1,3-β-グルカンを合成できることは有用であると思われる。

3.2 スクロースを基質とした合成

OdBGPを用いるとα-G1Pとラミナリビオースを基質として、1,3-β-グルカンを人工的に合成できることが明らかとなった。しかしながら、α-G1Pとラミナリビオースはいずれも高価な基質である。そこで、もっと安価な基質を用いて1,3-β-グルカンを合成することができないか検討した。

2種類のホスホリラーゼを組み合わせて反応を行うと、高価な糖リン酸エステルではなく、安価な糖質を原料として、多糖やオリゴ糖を合成できることが一般的に知られている¹⁹⁾。α-G1Pはスクロースをスクロースホスホリラーゼ(SP, 2.4.1.7)で加リン酸分解することで得られる。したがって、OdBGPとSPの反応を同時に行えば、市販のα-G1Pではなく安価なスクロースを出発材料として1,3-β-グルカンを合成できるのではないかと考えた(図3)。スクロース、ラミナリビオース、Piの混合液にOdBGPと乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* 由来のSPを加えて一晩反応を行ったところ、予想通り、1,3-β-グルカンの沈澱が生じた。また、スクロースとラミナリビオースの濃度比を大きくすると、長鎖の1,3-β-グルカンを得ることができた。

上述のように、グルコースを基質とした場合にはOdBGPは合成活性をほとんど示さない。しかし、アクセプターとしてグルコースを全く利用できないわけではな

く、高濃度(100 mM以上)のグルコースとα-G1Pの存在下でOdBGPを長時間反応させると、1,3-β-グルカンが合成されることを見出した。グルコースの濃度が高いほど、短鎖の1,3-β-グルカンが合成された。また、OdBGPとSPを併用した場合は、グルコースとスクロースを出発材料として1,3-β-グルカンをワンポット合成することができた。

4. 酵素合成1,3-β-グルカンの機能性²⁰⁾

以上のように、安価な基質から簡単な操作で直鎖の1,3-β-グルカンを酵素合成する方法を確立した。また、反応系には限られた成分しか存在しないため、沈澱物を水で洗浄するだけで高純度の1,3-β-グルカンを調製することが可能であった。長鎖の酵素合成グルカンはマクロファージ活性化能を示した²¹⁾。重合度50以上の直鎖1,3-β-グルカンには高い抗腫瘍活性があることも以前の研究で報告されている²²⁾。また、酵素合成1,3-β-グルカンには気管支喘息モデルマウスの気管支平滑筋の肥厚を抑制する効果があることを最近見出した²³⁾。ここでは、酵素合成1,3-β-グルカンの網膜保護効果について紹介する。

緑内障は眼圧の上昇とともに網膜の神経節細胞がゆっくりと死滅し、視野障害や視力障害が生じる眼疾患である。症状が進行すると失明に至る病気で、日本人の失明原因の第1位を占めている。緑内障には高眼圧緑内障と正常眼圧緑内障がある。高眼圧緑内障は欧米人に多いタイプの緑内障で、何らかの理由で眼圧が上がり、網膜や視神経が圧迫されダメージを受ける。一方、眼圧が正常値でも緑内障になることがあり、この症状を正常眼圧緑内障と呼ぶ。これは日本人に多いタイプの緑内障で、発症前の眼圧が低いことや、視神経や網膜が脆弱であることが原因として考えられている。いずれのタイプの緑内障においても点眼や手術で眼圧を下げる治療が最も良く行われている。しかし、これらの方法だけでは治療効果が不十分で、緑内障の進行が止まらないことがある。このため、眼圧降下以外の治療アプローチも必要とされるようになってきており、特に網膜神経保護薬による治療が注目されている。酵母の細胞壁粗

図3. スクロースを基質とした1,3-β-グルカンの合成

画分であるサイモサンを視神経圧迫時の硝子体に投与すると、網膜視神経の軸索再生が起こることが報告されている²⁴⁾。サイモサンは β -グルカン、マンナン、キチン、糖タンパク質、糖脂質の混合物である。これらのうち、網膜神経保護に寄与している成分は実験的には特定されていなかった。そこで、酵素合成 1,3- β -グルカンの網膜保護効果について評価した。

一過性高眼圧処置により網膜虚血を施したモデルラットの硝子体に、ジメチルスルホキシドに溶かした酵素合成 1,3- β -グルカン (ピークトップ分子量 11,000, 5 μ g) を注射で投与した。7日後、眼球を摘出し、網膜の切片を HE 染色して観察した (図 4 (A))。1,3- β -グルカンを投与していない高眼圧ラットの網膜内網状層は、正常ラットの内網状層の 70% 程度に薄化した。また、網膜の神経節細胞数も大きく減少していることがわかった。一方、酵素合成 1,3- β -グルカンを投与した高眼圧ラット網膜の内網状層厚や神経節細胞数は、正常ラットと同程度の値であった。また、TUNEL 染色した網膜切片を観察したところ、1,3- β -グルカン非投与高眼圧ラットの神経節細胞はアポトーシスで死滅していることが明らかとなった。一方、酵素合成 1,3- β -グルカンを投与したラットでは、正常ラットと同じく、アポトーシス細胞が検出されなかった。さらに、網膜に光を照射したときのニューロンの活動を評価する網膜電図測定を行った (図 4 (B))。1,3- β -グルカン非投与高眼圧ラットでは、網膜の双極細胞とグリア細胞の活動を示す b 波の振幅が、正常ラットとくらべて 30% 以上減少していた。しかし、酵素合成 1,3- β -グルカンを投与したラットでは正常ラットと同等の b 波振幅が観察されたため、網膜ニューロ

ンの反応が維持されていることがわかった。以上のように、酵素合成 1,3- β -グルカンに網膜神経節細胞を保護する作用があることが明らかとなった。1,3- β -グルカンで活性化された眼内マクロファージやグリア細胞が神経栄養因子を分泌し、それによって細胞のアポトーシスが抑制され、軸索伸長が促進される作用メカニズムがあるのではないかと推測している。

5. OdBGP の一次構造

OdBGP の N 末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列からプライマーを設計し、RT-PCR によって OdBGP の完全長 cDNA をクローニングした。得られた cDNA には 1,205 残基のタンパク質をコードする ORF が含まれていた。また、N 末端アミノ酸配列解析の結果から、OdBGP は 79 残基のシグナルペプチドを持つ前駆体タンパク質として翻訳されることが推定された。成熟タンパク質は 1,126 残基のアミノ酸からなり質量は 125 kDa と計算され、SDS-PAGE から推定された質量と同等の値であった。前述のように、精製 OdBGP の SDS-PAGE 解析では同一遺伝子産物と思われる 3 種類のポリペプチドが観察されたが、これらの分子種の構造の違いについては不明であった。OdBGP のアミノ酸配列中にはデータベースに登録されている既知の保存領域は認められなかった。しかし、GH94 ファミリーの酵素である *Paenibacillus* sp. の LBP⁶⁾ とは 30% の配列類似性を示した。また、GH94 ファミリーのホスホリラーゼと OdBGP を比較すると、予測された二次構造や触媒残基の周辺配列が似ていることがわかった。最近、数種類の原核生物

図 4. 酵素合成 1,3- β -グルカンの網膜保護効果

(A) HE 染色した網膜切片。矢印は内網状層厚を示す。(B) 網膜電図。矢印は b 波の振幅を示す。文献 20) より改変して転載。

図5. OdBGP と類似タンパク質の系統樹

(*Paenibacillus polymyxa* や *Fervidobacterium pennivorans* など) に BGP がコードされていることを見出した²¹⁾(図5)。これらの BGP はいずれも約 125 kDa の酵素であり, OdBGP と 50% 程度の配列類似性を示した。このうち, *F. pennivorans* の組換え BGP の至適温度は 80°C であり, 高温下での 1,3-β-グルカン合成に有用であることが示唆された。

6. おわりに

OdBGP を用いると, 安価な糖質素材から高純度の直鎖 1,3-β-グルカンを簡単に調製できる。天然物としてほとんど存在しない鎖長のグルカンや, カードランの加水分解で得ることが難しい鎖長のグルカンを調製することも可能である。これらには, 天然物の 1,3-β-グルカンと異なる機能や使用方法があることが期待される。また, 将来的には BGP と分岐酵素等を組み合わせて, 抗がん剤として利用されているシズフィランやレンチナンのような分岐 1,3-β-グルカンを合成することも可能になるかもしれない。

40 年以上, BGP の研究は全く行われてこなかった。これほどまでに本酵素に興味を持たれなかった理由は良くわからない。OdBGP の研究開始当初, 微細藻の培養方法や酵素活性測定方法を確立するまでは, 酵素の存在自体に疑問を抱くこともあったが, 杞憂であった。研究を進めていくと, 黄金色藻の限られた種だけでなく, いくつかの原核生物にも BGP が存在することがわかってきた。これらの生物における BGP の生理的役割についても興味を持たれる。

謝辞

アミノ酸配列解析にご協力くださいました日本食品化工株式会社の山本健博士ならびに佐分利亘博士 (現・北海道大学) に御礼申し上げます。また, 本研究にご協力くださ

いました三重大学大学院生物資源学研究科食品資源工学研究室と栄養機能工学研究室の皆様に感謝申し上げます。本研究の一部は独立行政法人科学技術振興機構「研究成果展開事業研究成果最適展開支援プログラム」の助成を受けて行われたものです。

文献

- 1) M. Kitaoka and K. Hayashi: Carbohydrate-processing phospholytic enzymes. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **14**, 35–50 (2002).
- 2) 仁平高則, 宮嶋双葉, 知久和寛, 北岡本光, 中井博之, 大坪研一: ニゲラン代謝に関わる *Clostridium phytofermentans* 由来の新規ホスホリラーゼの発見. *応用糖質科学*, **4**, 147–153 (2014).
- 3) B.A. Stone: Chemistry of β-glucans. in *Chemistry, Biochemistry and Biology of (1→3)-β-Glucans and Related Polysaccharides*, A. Basic, G.B. Fincher and B.A. Stone, eds., Academic Press, San Diego, pp. 5–46 (2009).
- 4) L.R. Maréchal and S.H. Goldemberg: Laminaribiose phosphorylase from *Euglena gracilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **13**, 106–109 (1963).
- 5) L.R. Marechal: β-1,3-Oligoglucan:orthophosphate glucosyltransferases from *Euglena gracilis*. I. Isolation and some properties of a β-1,3-oligoglucan phosphorylase. *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 417–430 (1967).
- 6) M. Kitaoka, Y. Matsuoka, K. Mori, M. Nishimoto and K. Hayashi: Characterization of a bacterial laminaribiose phosphorylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 343–348 (2012).
- 7) T. Nihira, Y. Saito, M. Kitaoka, M. Nishimoto, K. Otsubo and H. Nakai: Characterization of a laminaribiose phosphorylase from *Acholeplasma laidlawii* PG-8A and production of 1,3-β-D-glucosyl disaccharides. *Carbohydr. Res.*, **361**, 49–54 (2012).
- 8) S.H. Goldemberg, L.R. Marechal and B.C. De Souza: β-1,3-Oligoglucan:orthophosphate glucosyltransferase from *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.*, **241**, 45–50 (1966).
- 9) M. Kitaoka, T. Sasaki and H. Taniguchi: Purification and properties of laminaribiose phosphorylase (EC 2.4.1.31) from *Euglena gracilis* Z. *Arch. Biochem. Biophys.*, **304**, 508–514 (1993).
- 10) L.R. Marechal: β-1,3-Oligoglucan:orthophosphate glucosyltransferases from *Euglena gracilis*. II. Comparative studies between laminaribiose- and β-1,3-oligoglucan phosphorylase. *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 431–442 (1967).

- 11) H. Kauss and C. Kriebitzsch: Demonstration and partial purification of a β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan phosphorylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 926–930 (1969).
- 12) G.J. Albrecht and H. Kauss: Purification, crystallization and properties of a β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan phosphorylase from *Ochromonas malhamensis*. *Phytochemistry*, **10**, 1293–1298 (1971).
- 13) Y. Yamamoto, D. Kawashima, A. Hashizume, M. Hisamatsu and N. Isono: Purification and characterization of 1,3- β -D-glucan phosphorylase from *Ochromonas danica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1949–1954 (2013).
- 14) Mie University, N. Isono, Y. Yamamoto and W. Saburi: Beta-1,3-glucan manufacturing method, *U.S. Patent* 8,530,202, 2013-09-10.
- 15) P.J. Wood and R.G. Fulcher: Specific interaction of aniline blue with (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan. *Carbohydr. Polym.*, **4**, 49–72 (1984).
- 16) T. Harada, Y. Kanzawa, K. Kanenaga, A. Koreeda and A. Harada: Electron microscopic studies on the ultrastructure of curdian and other polysaccharides in gels used in foods. *Food Struct.*, **10**, 1–18 (1991).
- 17) M. Hrmova, T. Imai, S.J. Rutten, J.K. Fairweather, L. Pelosi, V. Bulone, H. Driguez and G.B. Fincher: Mutated barley (1,3)- β -D-glucan endohydrolases synthesize crystalline (1,3)- β -D-glucans. *J. Biol. Chem.*, **277**, 30102–30111 (2002).
- 18) 久松 真: カードランとサクシノグリカン. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan* (FFI ジャーナル), **208**, 944–954 (2003).
- 19) 北岡本光: ホスホリラーゼ組み合わせ反応を用いた実用的オリゴ糖調製. *応用糖質科学*, **1**, 286–290 (2011).
- 20) M. Nishio, Y. Kumita, Y. Uji, N. Isono and H. Umekawa: β -1,3-Glucan attenuates neuronal cell death after transient retinal ischemia and reperfusion. *Food Sci. Technol. Res.*, **19**, 485–489 (2013).
- 21) 磯野直人, 伊藤翔子: *Fervidobacterium pennivorans* 由来の耐熱性 β -1,3-グルカンホスホリラーゼの機能解析. 日本農芸化学学会大会講演要旨集, 1720 (2014).
- 22) T. Sasaki, N. Abiko, Y. Sugino and K. Nitta: Dependence on chain length of antitumor activity of (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, IFO 13140, and its acid-degraded products. *Cancer Res.*, **38**, 379–383 (1978).
- 23) 中川奈美, 西尾昌洋, 松井亜衣, 磯野直人, 梅川逸人: 重合度の異なる β -1,3-グルカンの気管支喘息モデルマウスに対する影響. 日本農芸化学学会大会講演要旨集, 731 (2014).
- 24) T. Okada, M. Ichikawa, Y. Tokita, H. Horie, K. Saito, J. Yoshida and M. Watanabe: Intravitreal macrophage activation enables cat retinal ganglion cells to regenerate injured axons into the mature optic nerve. *Exp. Neurol.*, **196**, 153–163 (2005).

質疑応答

[質問] 農研機構・食総研 北岡
酵素の平衡が他のホスホリラーゼに比較してやや合成側に傾いているが、これは pH の影響か β -1,3-グルカンの安定性によるものか。

[回答]

至適 pH が中性域にある細菌由来の BGP では、平衡時の α -G1P/Pi の値が OdBGP よりも高いので、pH の影響ではないかと考えています。

[質問] 農研機構・食総研 徳安

① β -1,3-1,6-グルカンを基質として合成反応を行うと、 β -1,6-グルカンに β -1,3-グルカンが合成されるか。

② β -1,3-グルカン結晶の密度は、パラミロンのように高いのか。

[回答]

①分子の非還元末端の構造が OdBGP のアクセプターとして認識されれば、可能ではないかと思います。ただし、1,6- β -グルコシド結合の分岐が多い糖をアクセプターとして合成したことはまだありません。

②結晶密度については調べておりません。

[質問] 天野エンザイム 森
アクセプターとしてのグルコース濃度を上げたとき、生成物の DP が低くなる理由は。

[回答]

グルコース濃度が高くなるにつれて BGP の反応速度が上昇するため、一定時間に生成されるラミナリビオースの量が増加すると思われます。ラミナリビオースは 1,3- β -グルカン合成の良いプライマーであり、 α -G1P/ラミナリビオースの比が小さいほど短鎖の 1,3- β -グルカンが合成されます。したがって、高いグルコース濃度で反応した場合には生成物の DP が小さくなると考えています。グルコースに対する BGP の活性はラミナリビオースと比べると著しく低いです。そのため、ラミナリビオースが合成された後は、大半の α -G1P がラミナリビオースをプライマーとする伸長反応に使われ、BGP がグルコースに作用することはほとんどないと思われます。

[質問] 秋田県立大 鈴木

① *in vitro* 合成したグルカンの電顕像と同様の構造が生物内にもみられるか。

②酵素のシグナル配列は、小胞体輸送のためのものか。

③クリソラミナランは液胞に局在しているのか。

[回答]

①私たちは *O. danica* を顕微鏡観察していませんが、過去の論文ではそのような構造の粒子の存在は報告されていないようです。

②予測プログラムでは小胞体移行シグナルであることを示す結果は得られていません。しかし、BGP はクリソラミナリンが蓄積されている液胞 (クリソラミナリン胞) で働くと思われますので、このシグナルペプチドには液胞移行のための機能があると考えています。

③そのように報告されています。

[質問] 信州大 天野

反応は合成に偏っているようだが、細胞内では分解反応を行うのか。

[回答]

生体内は Pi 濃度が高いので、クリソラミナリンの分解に関与しているのではないかと考えています。ただし α -G1P の供給量によっては、高濃度の Pi 存在下でもグルカンが合成されるかもしれません。BGP 遺伝子欠損株を用いた実験などで検証する必要があると思います。