

## オリゴ糖異性化酵素の機能解明と有用オリゴ糖の効率合成への展開

北海道大学大学院農学研究院 佐分利 亘



### 【略歴】

- 2001年3月 北海道大学農学部応用生命科学科卒業
- 2006年3月 北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻博士課程修了
- 2006年4月～2010年9月 日本食品化工株式会社研究所 研究員
- 2010年10月～現在 北海道大学大学院農学研究院生物化学研究室 助教

### はじめに

ウシなどの反芻動物の第一胃（ルーメン）は、共生微生物による植物多糖の分解の場である。ルーメン細菌の一種である偏性嫌気性細菌 *Ruminococcus albus* は多数のセルロース分解酵素を有する。1967年に Tyler と Leatherwood によって見出されたセロビオース 2-エピメラーゼ（CE）は、セロビオースを 4-O-β-D-グルコシル-D-マンノースに異性化するユニークな反応を触媒する<sup>1)</sup>。酵素の単離は40年近く行われてこなかったが、近年、我々は *R. albus* から酵素を単離し、遺伝子をクローニングすることに成功した<sup>2)</sup>。組換え酵素を用いた解析により CE はセロビオース以外にもラクトースや β-1,4-マンノビオースを基質とすることが明らかになった。本酵素は β-1,4 結合からなる基質の還元末端側のグルコース残基もしくはマンノース残基に広く作用できる。ラクトースに CE を作用させることで得られるエピラクトースは良好なプレバイオティクスであり、CE は機能性オリゴ糖の合成酵素として有望である。本研究では、CE の X 線結晶構造解析、CE の糖質代謝における機能解明、およびエピラクトースの実用的合成法の開発を行った。

### X 線結晶構造解析による CE の反応機構と基質認識メカニズムの解明

*R. albus* 由来 CE は (α/α)<sub>6</sub> バレル構造からなる触媒ドメインを有していた<sup>3)</sup>。この構造は、CE が低いながらも配列類似性を示すアシルグルコサミン 2-エピメラーゼ (AGE) やアルドースケトースイソメラーゼ (AKI) と同様であった。これらの酵素では二つの His 残基が一般酸触媒および一般塩基触媒として働くと考えられているが、CE においても相当部位に His が存在していた。AGE は他酵素と異なり、2 位にアセトアミド基を有する N-アセチルグルコサミンに作用する。AGE の構造と CE および AKI の構造を比較すると、AKI と CE にのみ基質の 2 位の水酸基と水素結合する His が存在していた。すなわち、2 位が水酸基の基質に作用する酵素では 3 つ目の His が水酸基と水素結合することで 2 位の脱プロトン化を促していると考えられた。*R. albus* 由来 CE の基質結合部位ポケットの入口付近に存在する Trp369 は CE にのみ存在し、単糖に作用する AGE および AKI には相当するアミノ酸残基が見られない。CE は、単糖に作用する AGE および AKI と異なり、二糖に特異的に作用することから、本 Trp は還元末端から二番目の糖残基との結合に重要であると考えられた。この構造解析により見出された His と Trp については、他のアミノ酸に置換することにより活性が完全に失われることを確認した。

### CE と糖質ホスホリラーゼによるマンナン代謝メカニズム

*R. albus* 由来 CE の配列を基に *Bacteroides fragilis* にも CE 遺伝子が見出されている<sup>4)</sup>。*B. fragilis* では CE 遺伝子が β-マンナーゼ様遺伝子と 4-O-β-D-マンノシル-D-グルコース (Man-Glc) を加リン酸分解するホスホリラーゼ (MP) とオペロンを形成している<sup>5)</sup>。*R. albus* のゲノムの MP ホモログを探索すると、2 つのホモログが見出された。片方 (RaMP1) は *B. fragilis* 由来 MP との配列同一性 59% と高く、もう一方 (RaMP2) は 27% と低い。これら二つの MP 遺伝子をクローニングし、組換え酵素の諸性質を明らかにした<sup>6)</sup>。RaMP1 は Man-Glc に高い特異性を示したが、RaMP2 は Man-Glc よりむしろ重合度 3 以上のマンノオリゴ糖に高い加リン酸分解活性を示した。このことから、重合度 3 以上のものは RaMP2 によりマンノビオースまで加リン酸分解を受け、マンノビオースは CE により Man-Glc に異性化されて

RaMP1 により加リン酸分解を受けると考えられた。RaMP2 は様々なオリゴ糖のマンノシル化が可能であることから、広範なマンノース含有オリゴ糖合成での応用が期待された。

### 好気性微生物由来 CE の探索とエピラクトースの効率的酵素合成法の開発

工業的なスケールでの反応には、酵素の大量生産も必要となる。また反応液の雑菌汚染を防ぐ意味でも高温での反応が可能な耐熱性酵素が好ましい。偏性嫌気性細菌では大規模培養が困難であることから、CE によるエピラクトース生産を実用化するには好気性微生物由来の酵素が必要であると考えた。そこで、*R. albus* 由来 CE のアミノ酸配列を基に種々の好気性細菌から CE 様遺伝子を探査し、組換え酵素を用いた機能解析を行った<sup>7,8)</sup>。調べた酵素はいずれも CE であることが確認された。*Rhodothermus marinus* 由来 CE (RmCE) は耐熱性が高く、非酵素的異性化が起こりにくい弱酸性で最大活性を示した。また、本酵素はセロビオースよりもラクトースに対して高い反応効率を示した。このため、RmCE がエピラクトース合成に最適と考えられた。次に、RmCE を固定化したバイオリクターによるエピラクトースの連続生産を検討した<sup>9)</sup>。陰イオン交換樹脂の Duolite A568 に RmCE を固定化した。得られた固定化酵素を用いて 10%ラクトースを基質とした連続反応を行った。50°C における連続反応では、13 日間エピラクトースへの変換率が維持された。13 日間固定化酵素による反応を行った場合、遊離酵素での反応を 3.8 日間とした場合と酵素使用量が同等であった。

### まとめ

ユニークな反応を触媒する CE の研究は新規な糖質代謝経路や有用糖質の発見につながった。CE を利用したエピラクトースの製造では克服すべき課題がまだまだ多いが、新規な食品素材として実用化されることを期待している。

### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、興味深いテーマに携わる機会を与えて下さった北海道大学 松井 博和 名誉教授を始めとした生物化学研究室の卒業生、在校生の方々、ならびに共同研究者の日本食品化工株式会社 元研究員 小島 晃代 博士に感謝申し上げます。また、酵素の X 線結晶構造解析で協力いただいた北海道大学 姚 関 教授、藤原 孝彰博士に御礼申し上げます。

### 参考文献

- 1) Tyler, T.R. and Leatherwood, J.M. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 363-367.
- 2) Ito, S., Hamada, S., Yamaguchi, K., Umene, S., Ito, S., Matsui, H., Ozawa, T., Taguchi, H., Watanabe, J., Wasaki, J., and Ito, S. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **360**, 640-645.
- 3) Fujiwara, T., Saburi, W., Inoue, S., Mori, H., Matsui, H., Tanaka, I., and Yao, M. (2012) *FEBS Lett.*, in press.
- 4) Senoura T., Taguchi, H., Ito, S., Hamada, S., Matsui, H., Fukiya, S., Yokota, A., Watanabe, J., Wasaki, J., and Ito, S. (2009) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 400-406.
- 5) Senoura, T., Ito, S., Taguchi, H., Higa, M., Hamada, S., Matsui, H., Ozawa, T., Jin, S., Watanabe, J., Wasaki, J., and Ito, S. (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **408**, 701-706.
- 6) Kawahara, R., Saburi, W., Odaka, R., Taguchi, H., Ito, S., Mori, H., and Ito, S. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 42389-42399.
- 7) Ojima, T., Saburi, W., Sato, H., Yamamoto, T., Mori, H., and Matsui, H. (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 2162-2168.
- 8) Ojima, T., Saburi, W., Yamamoto, T., Mori, H., and Matsui, H. (2013) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 189-193.
- 9) Sato, H., Saburi, W., Ojima, T., Taguchi, H., Mori, H., and Matsui, H. (2012) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1587-1587.