

*Eubacterium cellulosolvens* NE13 株由来  
セロビオース 2-エピメラーゼ遺伝子の単離  
および組換え酵素の諸性質

食品安全・機能性開発講座 機能性食品変換学分野  
坂本 寿代

[背景と目的] Cellobiose 2-epimerase (CE) は、本研究室で *Ruminococcus albus* NE1 株より単離され、細胞内でセロビオースから 4-O-β-D-グルコピラノシル-D-マンノースに可逆的異性化反応を触媒することが知られている。ルーメン細菌の一つである *Eubacterium cellulosolvens* にも同様の CE 活性が確認されているため、組換え CE の酵素学的特徴の解明および変異導入による活性部位の推定を試みた。

[方法] *E. cellulosolvens* のゲノム DNA 上から ce 遺伝子を単離し、大腸菌発現系を構築した。大腸菌に発現させた組換え酵素を精製するため、培養液 2 L から得られた菌体を破砕した。その後、粗酵素液を 2 段階のカラムクロマトグラフィーで精製した。TLC による活性測定と SDS-PAGE により、目的の活性画分を回収した。精製した酵素液で諸性質を HPLC による活性測定で評価した。基質特異性は TLC による活性の有無で評価した。すでに構造が解明されているブタ腎臓由来 *N*-アセチル-D-グルコサミン 2-エピメラーゼ (AGE) で明らかになっている推定活性残基に該当する Arg52, His259, Glu324, His389 に PCR 法で部位特異的変異を導入し変異酵素を取得した。変異酵素の CE 活性の有無は TLC を用いて定性的に評価した。

[結果] *E. cellulosolvens* 由来 CE (CE13) の塩基配列解析の結果、本酵素はアミノ酸 405 残基からなる分子量 46963.3Da の酵素であることが解った。この精製された酵素は最適温度 35°C、至適 pH は 7.5 付近、pH 4.0-7.7、30-50°C の範囲で安定だった。基質特異性の検証の結果、セロビオース、ラクトース、マルトース、セロオリゴ糖を基質とすることが明らかになった。金属イオンの影響を確認したところ、1 mM の Cu<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> で完全に活性が消失し、Zn<sup>2+</sup> で 74.1% の活性低下が見られた。また、CE13 に対する化学修飾試薬の影響を確認したところ、0.1 mM EDTA を加えた場合、活性が 109% に上昇していた。また、PCMB を 0.5 mM の濃度で加えた場合、完全に活性が失われた。ブタ腎臓由来 *N*-アセチル-D-グルコサミン 2-エピメラーゼ (AGE) と CE13 のアミノ酸配列を比較したところ、同様の触媒機構を有することが示唆された。推定活性残基 (Arg52, His259, Glu324, His389) に部位特異的変異を導入し、活性測定を行った結果、変異酵素の活性が TLC において確認されなかった (8.68 × 10<sup>-3</sup> U/mg) 未満であることが解った。

[考察] CE13 を組み換え大腸菌に発現させ精製し諸性質を明らかにした。*E. cellulosolvens* NE13 株由来 CE13 は *R. albus* NE1 株由来の CE とは異なり α-1,4 結合からなるマルトースにも作用することが明らかになった。現在、結晶構造既知のブタ腎臓由来 AGE の推定活性残基について部位特異的変異を導入したところ活性が認められないことから、CE13 はブタ腎臓由来 AGE と類似した反応形態を有すると考えられた。