

# *Ruminococcus albus* NE1 株由来 cellodextrin phosphorylase の 酵素化学的諸性質

食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学分野

澤野 達也

## (研究背景)

cellodextrin phosphorylase (CDP) は重合度 3 以上のセロオリゴ糖の非還元性末端のグリコシド結合を加リン酸分解し,  $\alpha$ -glucose 1-phosphate (Glc1P) を遊離する。*R. albus* の菌体内においてセロオリゴ糖の主要な代謝酵素の一つとして存在が認められていたが, その詳細な性質については明らかではなかった。本研究では, 組換え酵素を用いて *R. albus* NE1 株由来 CDP の酵素化学的諸性質の解析を行った。

## (結果および考察)

*R. albus* NE1 株に近縁でゲノム配列が明らかにされている *R. albus* 7 株の *cdp* 様遺伝子 (Rumal\_2403) の塩基配列に基づきプライマーを作製し, *R. albus* NE1 株のゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。得られた遺伝子は *R. albus* 7 株の Rumal\_2403 の配列と完全に一致した。大腸菌にて発現させたところ, 無細胞抽出液中に cellotriose の加リン酸分解活性が確認された。このことから, 取得した遺伝子が CDP をコードすることが確認された。

本酵素による cellotriose の加リン酸分解活性は, cellotriose, リン酸の順に酵素に結合し, cellobiose, Glc1P の順に生成物が遊離する ordered bi bi 機構に従った。ordered bi bi 機構の速度式より算出された速度パラメータは,  $k_{cat}$  は  $91.2 \pm 3.4 \text{ s}^{-1}$ , cellotriose に対する  $K_m$  は  $5.41 \pm 0.88 \text{ mM}$  であり, リン酸に対する  $K_m$  は  $124 \pm 12 \text{ mM}$  と高値を示した。

重合度 6 までのセロオリゴ糖を基質とし, 分解反応 (正反応) および合成反応 (逆反応) における見かけの速度パラメータを測定した。分解反応では基質の重合度の上昇に伴い触媒効率が増加した。一方, 合成反応では重合度 5 の cellopentaose までは重合度の上昇に伴い触媒効率が増加したが, cellohexaose に対する触媒効率は cellopentaose の 1/2 程度であった。このことより, 本酵素のサブサイトは切断部位より還元末端側に少なくとも 5 つ存在すると考えられた。合成反応では, セロオリゴ糖以外に, sophorose, laminaribiose, xylobiose, mannobiose および cellobitol をアクセプターとした。xylobiose と mannobiose をアクセプターとしたことから, サブサイト+1 におけるグリコシル基の 2-OH と 6-OH に対する認識が緩いことが示された。

cellobiose と Glc1P を基質とした逆合成反応では, 反応が進むにつれて高重合度のセロオリゴ糖が順次合成されるのが確認された。反応後期には不溶性生成物の析出が顕著に見られた。この不溶性生成物は,  $^1\text{H-NMR}$  解析においてセルロース加水分解物のスペクトルと完全に一致したことから, セロオリゴ糖であった。還元末端と非還元末端の 1H のピーク面積比より平均重合度は 8 であると見積もられた。

本酵素では類縁酵素と異なり, リン酸との相互作用に重要である His が Gln (Gln648) であったことから, これを His に置換した変異酵素を作製した。この変異酵素は, リン酸および Glc1P に対して野生型酵素の 1/2 程度の見かけの  $K_m$  値を示したことから, 本酵素におけるリン酸への高  $K_m$  に Gln648 が寄与することが明らかになった。