

*Ruminococcus albus* NE1 株が生産する  
2 つの 4-*O*- $\beta$ -D-mannosyl-D-glucose phosphorylase  
アイソザイムの酵素化学的諸性質の解明  
食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学分野  
川原 良介

(背景と目的)

4-*O*- $\beta$ -D-mannosyl-D-glucose phosphorylase (MP) は、4-*O*- $\beta$ -D-mannosyl-D-glucose (mannosylglucose) を $\alpha$ -D-mannose 1-phosphate (Man1P) と D-glucose に加リン酸分解する反応を触媒する。本酵素は通性嫌気性細菌 *Bacteroides fragilis* において、cellobiose 2-epimerase (CE) と協調してマンナン代謝に関与することが知られている。*B. fragilis* と同様に CE を有する偏性嫌気性細菌である *Ruminococcus albus* 7 株のゲノム上には、既報の MP とアミノ酸配列レベルでそれぞれ 60% および 25% 同一な 2 つのタンパク質 RaMP1 および RaMP2 をコードする遺伝子が存在する。本研究では、これら 2 つの MP の酵素化学的諸性質の解明を目的とした。

(結果および考察)

*R. albus* 7 株の近縁種である *R. albus* NE1 株より、RaMP1 および RaMP2 をクローニングした。得られた遺伝子配列は、*R. albus* 7 株と完全に一致した。定法により大腸菌を用いて生産した組換え RaMP1 および RaMP2 の比活性はそれぞれ 55.2 および 1.07 U/mg であり、RaMP1 は RaMP2 に比べて約 50 倍高い値を示した。両酵素は pH 6.5 で最大活性を示し、RaMP1 の至適温度は 45°C、RaMP2 では 40°C であった。両酵素による反応は基質が酵素とすべて結合してから生成物が遊離される Sequential Bi Bi 機構に従い、mannosylglucose とリン酸の結合順序がランダムであることが明らかになった。加リン酸分解反応における RaMP1 の mannosylglucose に対する  $K_m$  は 0.308 mM であり、RaMP2 に比べて 1/64 と低い値を示した。両酵素はマンノシドに対してのみ活性を示したことから、サブサイト-1 はマンノシル基に対して高い特異性を有すると考えられた。RaMP1 は逆合成反応において、D-glucose および D-xylose を受容体として、それぞれ mannosylglucose および 4-*O*- $\beta$ -D-mannosyl-D-xylose を生成した。D-glucose に対する活性の高さから、RaMP1 は mannosylglucose の加リン酸分解に特化した酵素であることが示唆された。一方、RaMP2 は、逆合成反応の受容体として、D-glucose の他にも多くの糖を認識し、中でも  $\beta$ -1,4-mannobiose に対する活性が最も高かった。また、 $\beta$ -1,4-mannobiose、cellobiose および *N,N'*-diacetylchitobiose を基質として、4 糖以上の高重合度のオリゴ糖も生成した。このことから、RaMP2 は重合度が 3 以上のマンノオリゴ糖を真の基質とする酵素であることが示唆された。以上のことから、機能の異なる 2 つの MP によるマンナンの代謝メカニズムを推定した。マンナンは、菌体外  $\beta$ -mannanase によりマンノオリゴ糖に分解される。生じた重合度 3 以上のオリゴ糖は RaMP2 により、 $\beta$ -1,4-mannobiose と Man1P に分解される。 $\beta$ -1,4-mannobiose は、CE による異性化を受け、mannosylglucose へと変換される。この mannosylglucose は RaMP1 により加リン酸分解され、D-glucose と Man1P が生成する。このマンナン代謝経路は、いずれの酵素も基質を奪い合うことがなく、ATP を消費せずに糖リン酸を生成できるため、嫌気的環境で生育する上で効率的なエネルギー獲得メカニズムと言える。