

# *Ruminococcus albus* NE1 株由来 cellobiose phosphorylase の 構造と機能に関する研究

食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学分野

羽村 健

(背景と目的) phosphorylase の逆反応は糖質の効率的合成に有用である. しかし, 現在見出されている phosphorylase の種類が少なく, 合成可能な糖質の種類が限られるため, 新規酵素の探索や既知酵素の基質特異性の改変などが試みられている. 本研究では, cellobiose を加リン酸分解する *Ruminococcus albus* NE1 株由来 cellobiose phosphorylase (RaCBP) の構造と機能の関係を明らかにし, 有用糖質の合成に応用することを目的とした.

(結果と考察) RaCBP の cellobiose 合成では, 受容体による基質阻害が認められた. この時 D-glucose が  $\alpha$ -D-glucose 1-phosphate (Glc1P) とサブサイト-1 を奪い合う競争阻害剤としてだけでなく, ternary complex に結合して不活性型とする不競争阻害剤としても働くことが明らかとなった. RaCBP は合成反応において, D-glucose の他, 2 位や 6 位の水酸基が置換された糖を受容体とした. 本酵素と類縁酵素間では glucose 残基の 2 位の認識に多様性が見られるため, 部位特異的変異導入により glucose 2 位置換体への受容体特異性を改変した. C485A は D-glucosamine に対して野生型酵素と同等の  $k_{cat}/K_m$  を示したが,  $K_m$  および  $k_{cat}$  は野生型酵素よりも共に約 4 倍高い値を示した. Y648F では 2-deoxy-D-glucose と D-mannose に対する  $k_{cat}/K_m$  がそれぞれ野生型酵素の約 4 倍および 5 倍高い値を示した. Y648V では, 野生型酵素では受容体としない GlcNAc を受容体とした. Y648F の受容体特異性より Tyr648 の水酸基は 2-deoxy-D-glucose および D-mannose の結合の障害となっていたと考えられた. また, Tyr648 の側鎖を側鎖が小さい Val に置換することで立体障害が解消され Y648V では GlcNAc のアセトアミド基を受容体にできたと考えられた.

epilactose は D-galactose と D-mannose が  $\beta$ -1,4 結合した機能性オリゴ糖である. phosphorylase の逆反応で epilactose を合成する場合, 供与体として  $\alpha$ -D-galactose 1-phosphate (Gal1P), 受容体として D-mannose が働く必要がある. このため, 野生型 RaCBP に Gal1P を供与体として認識可能な lactose phosphorylase (LP) 活性を付与できる変異(Y502I/H661N/N662A) と D-mannose を良い受容体とする Y648F 変異を組み合わせた epilactose phosphorylase (Y502I/Y648F/H661N/N662A, EP) を作出した. 10 mM の Gal1P と D-mannose を基質とし, epilactose 合成量を野生型酵素, Y648F, LP および EP 間で比較した. 野生型酵素と LP は, 72 時間反応後に 1.6 mM の epilactose を遊離したが, EP と Y648F は, それぞれ 5.2 mM と 4.7 mM の epilactose を遊離し, EP が最も効率的に epilactose を合成した. また, 100 mM lactose と 200 mM D-mannose を出発基質とし, LP と EP を作用させたところ, 96 時間反応後に 55 mM の epilactose が得られた.