

# セロビオース 2-エピメラーゼの基質結合と反応メカニズムに関する研究

共生基盤学専攻 食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学 井上聡太

## 1. はじめに

セロビオース 2-エピメラーゼ (CE; EC 5.1.3.11) はセロビオースや  $\beta$ -1,4-マンノビオースなどの  $\beta$ -1,4 結合からなる二糖の還元末端グルコース残基をマンノース残基に可逆的に異性化する。アミノ酸配列の類似性は低いが, CE は単糖異性化酵素のアルドースケトースイソメラーゼやアシルグルコサミン 2-エピメラーゼとよく似た立体構造を持ち, これらの酵素における触媒残基の配向はよく保存されている。*Rhodothermus marinus* JCM9785 由来 CE (RmCE) と基質の複合体の結晶構造解析から, His200 と基質の還元末端糖残基の 2 位酸素との水素結合が 2 位プロトンの引き抜きを促進すること, Trp385 による基質の非還元末端糖残基とのスタッキング相互作用が CE のオリゴ糖への活性に重要であることが推測された。本研究ではこれらのアミノ酸残基が酵素活性に重要であることを確認した。また, 還元末端側糖残基が開環した基質の類似構造を持つセロビトール, 還元末端糖残基の 1 位水酸基を持たない 4-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-1,5-アンヒドロ-D-グルシトール (1,5-アンヒドロセロビトール) による CE 反応への阻害効果を検証した。

## 2. 結果と考察

*Ruminococcus albus* 由来 CE (RaCE) において RmCE の His200 と Trp385 に相当する His184 と Trp369 をそれぞれ置換した変異酵素 H184A, H184N, および W369A を作製した。10 mM セロビオースを基質として 4-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-D-マンノースへの異性化反応を解析した。その結果, 野生型酵素において活性が検出される濃度の 50-100 倍酵素濃度においてもこれらの変異酵素の活性は全く検出されなかった。各変異酵素の活性は野生型酵素の 1%以下であり, RaCE の His184 と Trp369 はいずれも CE 活性に極めて重要なアミノ酸残基であることが確認された。

次にセロビトールと 1,5-アンヒドロセロビトールの CE 反応への阻害効果を検証した。本実験では RmCE を用いた。1,5-アンヒドロセロビトールについては  $\alpha$ -グルコース 1-リン酸と 1,5-アンヒドログルシトールを基質としてセロビオースホスホリラーゼによる合成反応を利用して合成した。2 mM セロビトール存在下, 非存在下で RmCE の 5-25 mM  $\beta$ -1,4-マンノビオースに対する反応速度を測定した。2 mM セロビトール存在下での反応速度は非存在下での反応速度より低く, 得られた反応速度は競争阻害の速度式によく従った。 $k_{cat}$  は  $82.6 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_m$  は 18.6 mM,  $K_i$  は 3.55 mM と算出された。開環構造のセロビトールに対する  $K_i$  が水溶液中で主として閉環構造をとるマンノビオースに対する  $K_m$  より明らかに低かったことから, 本酵素が *cis*-エンジオール中間体と高い親和性を持つと考えられた。このことは RmCE 結晶構造解析に基づき推定された *cis*-エンジオール中間体を經由する反応メカニズムを支持する。一方, 1,5-アンヒドロセロビトールは全く阻害効果を示さなかった。RmCE において酵素と基質の結合に還元末端糖残基の 1 位水酸基が極めて重要であることが示され, このことは RmCE の結晶構造解析において Glc-Man の還元末端糖残基の 1 位水酸基が His200, Glu262 および His390 と水素結合を形成したことから支持される。