

セロビオース 2-エピメラーゼの触媒機能の分子基盤

ならびに機能性食品への応用に関する研究

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 武藤 洋彦

1. 諸言

セロビオース 2-エピメラーゼ (CE) は β -(1 \rightarrow 4)-結合した二糖の還元末端グルコース残基をマンノース残基へエピメリ化する。本酵素の触媒ドメインの構造はアシルグルコサミン 2-エピメラーゼ (AGE) やアルドースケトースイソメラーゼ (AKI) と類似し、還元末端糖残基と相互作用するアミノ酸残基の多くが共通する。CE および AGE はエピメリ化を、AKI は異性化 (アルドースとケトースの変換) を触媒するが、一部の CE は異性化活性も持つ。この反応特異性の多様性を含め、CE の基質認識や反応特異性の分子構造に基づく理解は十分でない。そこで本研究では CE の触媒機能の分子基盤の解明を目的とした。また CE は整腸作用などの機能性を持つエピラクトース (Gal-Man) 生産への応用が期待される。CE を牛乳に添加すると、乳中ラクトース (Gal-Glc) を *in situ* で Gal-Man に変換できる。そこで本研究では牛乳中 Gal-Glc の Gal-Man への変換を指向し、各種 CE を評価した。

2. 結果と考察

[CE の触媒機能の分子基盤の解明] *Rhodothermus marinus* JCM9785 由来 CE (RmCE) において基質との結合を担う R66, Y124, N196, H200, E262 および W322 を Ala に置換した変異酵素では β -(1 \rightarrow 4)-マンノビオースのエピメリ化の k_{cat}/K_m が WT の 0.0278-2.31% に低下し、これらアミノ酸残基の基質結合への重要性が確認された。異性化活性が報告されていない RmCE および他起源 CE 5 種を 300 mM ラクチュロース (Gal-Fru) に反応させると、全てが Gal-Glc のエピメリ化活性に対して 0.000543-0.00285% の異性化活性 (Gal-Glc 生成活性 + Gal-Man 生成活性) を示した。RmCE H259A の Gal-Fru に対する反応では、Gal-Glc 生成活性 1.41 mU/mg, Gal-Man 生成活性は 0.0967 mU/mg 以下だった。H390A では逆に Gal-Man 生成活性 0.586 mU/mg, Gal-Glc 生成活性は 0.0779 mU/mg 以下だった。H390 が Gal-Fru の 1-C から H⁺ を引抜き 2-C に与えることで Gal-Glc が生成し、Gal-Man 生成時には H259 が H⁺ の授受を行うと解釈された。これは構造から推定される CE のエピメリ化や AKI の Man と Fru の異性化における触媒残基の機能と一致した。還元末端糖残基の 2-OH と相互作用する Y124, N196, H200 の Ala 置換体は、Gal-Glc エピメリ化活性は WT の 0.0362-0.179% に低下したが、Gal-Fru の異性化活性は 30.0-848% であり、特に H259 と相互作用する N196 の変異酵素では 8.48 倍に上昇した。さらに N196A は Gal-Fru からの Gal-Man 生成活性が Gal-Glc 生成の 0.465-0.530 倍だった WT, Y124A, H200A と異なり、Gal-Man 生成活性が Gal-Glc 生成の 3.4 倍であった。

[CE の乳中 Gal-Glc の Gal-Man への変換機能の評価] 既報 CE 10 種と CE 様タンパク質 7 種の機能を評価した。CE 様タンパク質 4 種が二糖へのエピメリ化活性を示し、新たに CE と決定された。RmCE, *Ruminococcus albus* 由来 CE, *Flavobacterium johnsoniae* 由来 CE および *Clostridium lentocellum* 由来 CE が 4°C で 5% (w/v) Gal-Glc に 4 U/mg 以上の活性を示した。これらを牛乳に 0.250 U/ml として添加して 4°C に保持すると、いずれも 12 時間で Gal-Man の生成が平衡に達した。耐熱性の RmCE では 60°C, 30 分間あるいは 72°C, 15 秒間の熱処理と 4°C, 12 時間保持の組み合わせにより、平衡量の Glc-Man を得るのに必要な酵素濃度をそれぞれ 0.0625 U/ml, および 0.125 U/ml に削減できた。