

腸内細菌のエピラクトース資化性および代謝関連酵素の解析

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生物化学 坂井 未悠

1. 背景と目的

エピラクトース (Gal β 1-4Man) は加熱牛乳中に微量存在するオリゴ糖である。近年セロビオース 2-エピメラーゼを用いたラクトースからの効率的合成が可能となり, 腸内細菌叢改善効果やそれに伴う二次胆汁酸の生成抑制, ミネラル吸収促進効果, 肥満改善効果など種々の生理機能が明らかにされた。しかし腸内細菌によるエピラクトースの代謝には不明な点が多い。本研究ではエピラクトース代謝機構の解明を目的として, 腸内細菌のエピラクトース資化性と代謝関連酵素を解析した。

2. 結果と考察

ビフィズス菌, 乳酸菌を含む 65 菌株を, エピラクトース, ラクトースおよびラクチュロース (Gal β 1-4Fru) を炭素源とした栄養制限培地で培養し, 増殖, 糖消費および β -ガラクトシダーゼ活性を解析した。12 株がエピラクトース添加培地で高い増殖を見せ, このうちビフィズス菌または乳酸菌に属する 9 株では, 培養上清, 無細胞抽出液および菌体残渣の 1 つ以上の画分にエピラクトース分解活性が検出された。これらの 9 株は, エピラクトース分解活性を有する画分全てにラクトース分解活性を有した。よってエピラクトースの代謝はラクトース代謝経路によるものと予想された。

これらの 9 株より, ゲノム既読株のビフィズス菌 *B. longum* subsp. *infantis* JCM 1222 をモデルとして取り上げた。本株は無細胞抽出液および菌体残渣の 2 画分にエピラクトース分解活性を示した。本株は既知または推定の β -ガラクトシダーゼをコードする 8 遺伝子を有する。転写解析により, 加水分解酵素群 GH1 酵素をコードする 1 遺伝子, GH2 の 2 遺伝子および GH42 の 1 遺伝子の高発現が確認された。GH2 酵素はラクトースに良く作用するため, 上記 GH2 遺伝子産物である BLIJ_0272 および BLIJ_2411 の組換え酵素を調製し, ラクトースおよびエピラクトースに対する加水分解速度を解析した。両酵素はエピラクトースに対しそれぞれ k_{cat}/K_m 値 $0.00140 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ および $54.5 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (ラクトースに対する値の 21.0%および 18.4%) を示した。BLIJ_0272 のエピラクトース分解活性は顕著に低いため, 本酵素のエピラクトース分解への寄与は低く, BLIJ_2411 が主にエピラクトース分解に寄与すると考えられた。培養試験で用いた 65 菌株が持つ GH2 酵素の分子系統解析により, BLIJ_0272 が孤立するのに対し, エピラクトース資化性の高い 9 株のうちゲノム既読のビフィズス菌 6 株全てが BLIJ_2411 と配列同一性 57-81%の GH2 酵素の遺伝子を持つことが示された。よって BLIJ_2411 様 GH2 酵素がビフィズス菌では共通してエピラクトース資化に利用される可能性が示された。

B. longum subsp. *infantis* JCM 1222 の培養上清には, 残存エピラクトースとともにマンノースが蓄積していた。エピラクトース添加培地での培養後ガラクトースまたはマンノースを添加した培養では, ガラクトース濃度は大きく低下する一方マンノース濃度はほぼ低下せず, フルクトースの生成が観察された。この異性化活性は菌体残渣画分に認められた。以上より本株はエピラクトースを菌体外において分解し, 生じたガラクトースを直接取り込み, マンノースを菌体表層の異性化酵素によりフルクトースに変換して取り込み代謝する経路が予想された。