

好熱性細菌由来 β -1, 4-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼの

機能とマンノオリゴ糖合成への利用に関する研究

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 日野 信一郎

1. 諸言

β -(1 \rightarrow 4)-マンノオリゴ糖(MOS)は整腸作用, アレルギー抑制, および脂肪吸収抑制効果を持つ。 β -1, 4-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼ(MOP)は, MOSを加リン酸分解し, α -マンノース1-リン酸(Man1P)を生成する。MOPは逆反応の合成反応も触媒し, 糖供与体 Man1Pと受容体 Manを基質に MOSを合成できる。グルコース1-リン酸(Glc1P)から Man1Pへの酵素変換系を合わせると, Glc1P供給源のデンプンやスクロースを出発物質とした MOS合成が可能である。MOPはアミノ酸配列に基づき糖質加水分解酵素ファミリー130サブファミリー2(GH130_2)に分類される。GH130_2酵素は更に, サブサイト+1における GlcNAc または Man 特異性により二分され, 後者が MOPにあたる。これまでに機能解析された MOPは, *Ruminococcus albus* 由来 RaMP2 と *Thermotoga maritima* 由来 TM1225 である。本研究では, MOPを利用した MOS合成を目的とし, GH130_2に属する好熱性細菌由来 MOP様酵素の酵素化学的諸性質を解析し, 本MOPを利用した MOS合成を行った。

2. 結果と考察

組換え酵素を大腸菌 BL21(DE3)により生産し, 各種カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製酵素は MOSの加リン酸分解活性を示した。加リン酸分解の至適 pHは 6.6, 合成反応の至適 pHは 4.6であった。合成反応において, 受容体 Man₂に対する見かけの速度定数の pH依存性を解析した。 k_{cat} および K_m はいずれも pH 4.3で最大に, k_{cat}/K_m は pH 6.6で最大となった。従って, 基質結合が触媒残基の解離状態に影響を与えていると考えられた。加リン酸分解反応では, Man₂-Man₆に対する k_{cat}/K_m 値は, 重合度依存的に増加した。少なくとも6つのサブサイトの存在が想定された。合成反応では, 受容体 Man₂-Man₆に対する k_{cat}/K_m 値は, Manに対する値に比べ, pH 4.6では 103-172倍, pH 6.6では 44.4-79.6倍高く, 2糖以上の MOSを良い受容体とした。pH 6.6では Man₅に対する値が最も高かった。この合成反応における受容体鎖長特異性は, 加リン酸分解での鎖長特異性と一致し, 6つのサブサイトの存在が想定された。本酵素は GlcNAcを基質としてほぼ認識しなかった。以上より, 本酵素は MOSに特異的な MOPであると示された。本酵素の耐熱性は 45°C(pH 6.5, 30 min)まであり, RaMP2よりも高い。Man1P および Man または Man₂を基質として, 本酵素による MOS合成を行った。[Man1P]/[Man] (または [Man₂])濃度比を下げると, 不溶性 β -マンナンが生じた。100 mM Man1P, 10 mM Man (または Man₂)の 48時間反応により, 平均重合度 15.4-16.5の不溶性 β -マンナンが得られた。生成量は, 66%の Man1Pが消費され, 糖供与体および糖受容体に含まれる全マンノシル基量の 41.5%に達した。