

好熱性細菌 *Thermotoga maritima* 由来マンノース関連酵素の機能と β -1,4-マンノオリゴ糖およびマンノース 6-リン酸合成への応用に関する研究

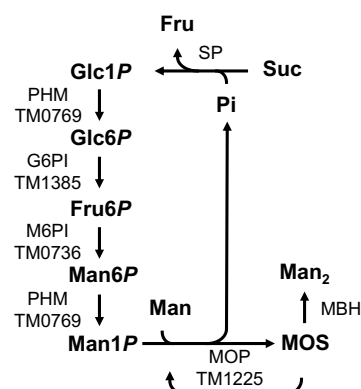
共生基盤学専攻 食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学 中澤 篤志

1. 目的

β -1,4-マンノオリゴ糖(MOS)やMan6Pは β -マンナン分解過程で生じる糖質である。MOS はアレルギー抑制作用等有用な生理活性を有する。また、Man6Pは先天性グリコシル化異常症の治療薬として期待される。MOSの生産は、 β -マンナン分解系もしくはMOSの変換系を用いることより可能と考えられる。前者は、加水分解酵素を用いたマンナン分解系である。後者はFig.に示す様に、MOSからFru6Pを生成して解糖系へと導く代謝経路の逆反応を用いる。さらにSPおよびG6PIを用いたスクロース(Suc)からFru6Pを生成する経路を組み合わせ、SucからMOSを生産する。これらの酵素のうち、 β -マンナン加水分解酵素は機能既知酵素が多い。一方、加リン酸分解酵素や糖リン酸代謝酵素については、機能・構造共に知見が不足する。本研究では、 β -マンナン資化性好熱性細菌 *T. maritima* 由来のこれら酵素の機能・構造を明らかにし、糖質合成への応用することを目的とした。

2. 結果と考察

MOPと推定されるTM1225組換えタンパク質を生産して機能を解析した。TM1225はMOSの加リン酸分解活性を有し、4糖に対して最も高い $k_{cat\ app}/K_m\ app$ 値を示した。Man1Pを糖供与体とした合成反応では、GlcやGlcNAcを良い単糖受容体とする既知の *Ruminococcus albus* 由来MOPとは異なり、TM1225はManを最も良い受容体とした。すなわち、TM1225は+1サブサイトにおいてManに高い特異性を示した。MOSの加リン酸分解で生じるMan1Pの代謝にはMan6Pを生じるPHMが関わると考えられる。PHM酵素は4サブグループに分類され、*T. maritima*はTM0184とTM0769遺伝子を持つ。このうち、TM0184はホスホグルコサミンターゼと予測されるが、TM0769は4サブグループのいずれにも分類されない。そこでTM0769の機能を解析した。TM0769はGlc1PおよびMan1Pのホスホリル転移を触媒し、Glc6PおよびMan6Pをそれぞれ生成した。ほとんどのPHMは Mg^{2+} 存在下で最大活性を示すが、TM0769は Co^{2+} 存在下で最大活性を示した。Man6PからFru6Pを生成して解糖系へと導くM6PIと推定されるTM0736の機能を解析し、Man6PからのFru6P生成活性を確認した。以上の酵素を利用し、MOSおよびMan6Pの合成を検討した。100 mM Sucおよび100 mM Manを出発物質とした経路(Fig.)により16.9 mM Man₂を生成した。マンナン分解からのMOS生産では、各種10%(w/v)マンナンからは、MBHおよび α -ガラクトシダーゼ(TM1192)により理論収率9.14–76.0% Man₂を生成した。さらに、Man6Pの合成では、TM0769、セロビオース2-エピメラーゼおよびマンノシルグルコースホスホリラーゼをMan₂に酵母存在下で作用させ、100 mM Man₂から78.3 mM Man6Pを生成した。



SP: スクロースホスホリラーゼ
 PHM: ホスホヘキソミンターゼ
 G6PI: グルコース 6-リン酸イソメラーゼ
 M6PI: マンノース 6-リン酸イソメラーゼ
 MOP: β -1,4-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼ
 MBH: マンナン1,4-マンノピオシダーゼ

Fig. Suc および Man からの Man₂ 生産経路