

Melioribacter roseus 由来セロビオース 2-エピメラーゼ様タンパク質の 単糖に対する活性とそれに寄与する構造に関する研究

応用生物科学専攻 生命分子科学講座 生物化学 佐藤 鈴佳

1. 背景と目的

糖質の異性化は、糖質代謝の重要な過程であり、希少糖の工業的生産にも有用な反応である。糖質を異性化する酵素の中で、セロビオース 2-エピメラーゼ (CE) は、 β 1-4 結合からなる二糖の還元末端の Glc 残基と Man 残基間を相互変換する。いくつかの CE は、二糖だけでなく単糖にもわずかながら作用することが報告されているが、現在までに調べられた CE の D-Man に対する k_{cat}/K_m は Man₂ に対する値の 0.0018–0.020% でありいずれも低い。*Melioribacter roseus* 由来の推定タンパク質 MROS_0506 の一次構造は CE の基質結合部位周辺の重要アミノ酸残基をすべて有するが、CE とのアミノ酸配列同一性は 15–25% 程度と低く、既報の CE の触媒ドメインの $(\alpha/\alpha)_6$ バレルにおける $\alpha 7 \rightarrow \alpha 8$ ループに該当する部分が 15 残基長い。本ループは、CE の基質である二糖の非還元末端糖残基結合部位の周辺に位置し、単糖特異的に作用する関連酵素スルホキノボスイソメラーゼ (SQI)、マンノースイソメラーゼおよびマンノース 2-エピメラーゼ (ME) でも長い。SQI では構造解析により、この長い $\alpha 7 \rightarrow \alpha 8$ ループが非還元末端糖残基に立体障害を生じ、二糖基質の結合を妨害すると示唆されている。これらのことから、MROS_0506 は既報の CE と、特に単糖への作用において相違があることが予想された。本研究では MROS_0506 の機能解析、本酵素を用いた希少糖の生産、および基質特異性に重要な構造を検討した。

2. 結果と考察

MROS_0506 の大腸菌組換え酵素は、 β 1-4 結合を有する二糖の β -(1 \rightarrow 4)-マンノビオース (Man₂)、セロビオース、ラクトースに加えて単糖にも作用し、D-Glc と D-Man 間および D-Gal と D-Tal 間のエピメリ化活性を示した。本酵素の Man₂ に対する活性は pH 8.0, 56°C で最大であり、pH 3.7–10.9 (4°C, 24 時間) および 50°C 以下 (pH 8.0, 20 分間) で安定であった。100 mM の基質濃度でのラクトース、セロビオースおよび 4-O- β -D-マンノピラノシル-D-グルコースに対する反応速度は、それぞれ 445 s⁻¹, 262 s⁻¹ および 202 s⁻¹ であった。pH 8.0, 37°C での Man₂, D-Man および D-Gal に対する k_{cat}/K_m は、それぞれ 220 s⁻¹mM⁻¹, 0.082 s⁻¹mM⁻¹ および 0.0063 s⁻¹mM⁻¹ であり、いずれも既報の CE より高かった。本酵素の D-Man に対する k_{cat}/K_m は Man₂ に対する値の 0.037% であった。これは、既報の CE の値 0.0018–0.020% よりも高い。本酵素を、500 g/L D-Glc および 400 g/L D-Gal に対して pH 8.0, 50°C で保持すると、120 g/L D-Man および 50 g/L D-Tal が生成された。変換率はそれぞれ 24.7% および 12.5% であった。D-Gal からはケトースの D-Tag も生成され、基質の 4 位炭素の立体配置により反応特異性が異なることが明らかになった。D-Gal からの生成物 D-Tal をカルシウム型陽イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーにより単離した。純度 92% の D-Tal が精製収率 50% で得られ、MROS_0506 は希少糖 D-Tal の生産に利用できることが示された。 $\alpha 7 \rightarrow \alpha 8$ ループ上の 15 残基 S249-R263 の削除体では、D-Man に対する k_{cat}/K_m が Man₂ の 0.019% にまで低下し、本ループの短縮に伴い単糖への相対的特異性が低下した。CE において、二糖基質の還元末端糖残基の 2 位水酸基との結合が予想される Asn 残基は、ME では Asp で保存されている。MROS_0506 の該当残基の変異酵素 N194D は、D-Man に対する k_{cat}/K_m が Man₂ の 2.6% にまで上昇し、単糖選択性が上昇した。本研究により、MROS_0506 は D-Man および D-Tal の生産に利用可能な単糖活性を有し、長い $\alpha 7 \rightarrow \alpha 8$ ループおよび基質の 2 位水酸基付近の Asp 残基が単糖への作用に正に寄与することが示唆された。