

オリゴ糖異性化酵素ならびに類縁酵素群の機能解明と有用糖質の効率合成への応用展開

佐分利 亘

北海道大学大学院 農学研究院 基盤研究部門

研究の目的

糖質代謝において異性化は重要な反応であるが、実用的にも天然に豊富な糖質から希少糖質を生産するための反応として有用である。これまでに多くの糖質異性化酵素の研究がなされてきたが、オリゴ糖のエピメリ化を触媒する酵素はセロビオース2-エピメラーゼ (CE) のみである。CE の構造解析の結果¹⁾、本酵素は構造上、いくつかの単糖異性化酵素と類似性を示し、スーパーファミリーを形成することが明らかになった (図 1)。この酵素群の中には機能未解明タンパク質が多く存在し、新規酵素の存在が期待される。本研究では、糖質異性化酵素を応用した効率的糖質合成技術の開発を目的とし、CE の基質特異性の改変および機能未解明酵素の生化学的機能を解析した。

方法

1. *Rhodothermus marinus* 由来 CE (RmCE) の基質特異性の改変

RmCE の基質結合部位に存在する Arg66, Tyr124, Asn196, His200, Glu262, Tyr307, His320 および Trp322 をそれぞれ Ala に置換した変異酵素を作製した。組換えタンパク質の生産には発現プラスミド pET22b (Merck) を用いた。塩基置換は、PrimeStar Mutagenesis Basal Kit (タカラバイオ) を用いて導入した。野生型酵素と同様に大腸菌 BL21 (DE3) にて変異酵素を生産し²⁾、Toyopearl DEAE 650M および Toyopearl Butyl 650M カラムにより電気泳動的に単一に精製した。各精製酵素をソホロース (Glcβ1-2Glc), ラミナリビオース (Glcβ1-3Glc), セロビオース (Glcβ1-4Glc), およびゲンチオビオース (Glcβ1-6Glc) に作用させた。すなわち, 11.3 μM 酵素, 20 mM 基質, および 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) からなる反応液 5 μL を 60°C にて 24 時間反応させた。反応液を TLC により分析した。展開溶媒として 2-プロパノール/1-ブタノ

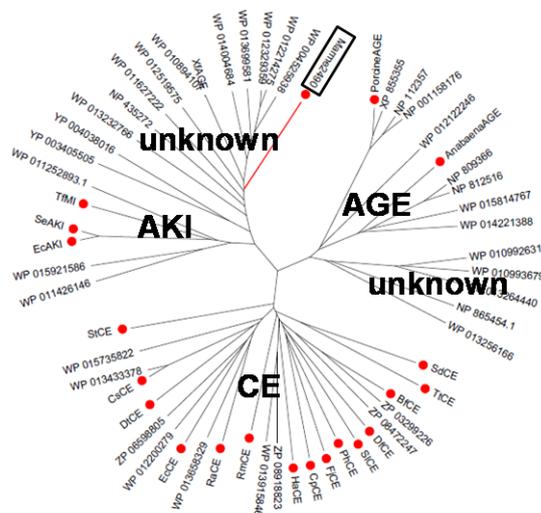


図 1. CE とその他の糖質異性化酵素の分子系統樹
AKI, アルドースケトースイソメラーゼ;
AGE, アシルグルコサミン2-エピメラーゼ;
CE, セロビオース 2-エピメラーゼ.
Marme_2490 を四角で囲った。

ール/水 = 12/3/4 を使用した. 展開後, 検出試薬 (酢酸/硫酸/アニスアルデヒド = 100/2/1) を噴霧し, 加熱して糖を検出した.

2. CE と構造的類似性を示す機能未解明タンパク質の機能解析

Marinomonas mediterranea Marme_2490 タンパク質を大腸菌により生産し, 組換えタンパク質の機能を解析した. *M. mediterranea* のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い, Marme_2490 遺伝子を得た. これを pET23a (Merck) に導入し, C 末端側に His タグを付加するように発現プラスミドを構築した. 発現プラスミドを導入した大腸菌 BL21(DE3) を 100 µg/mL アンピシリンを含む LB 培地 1 L に植菌し, 37°C にて培養した. A_{600} が 0.6 となった段階で 0.1 M イソプロピル β -チオガラクトピラノシドを 1 mL 添加して組換えタンパク質の生産を誘導した. 誘導培養を 16°C にて 20 時間行い, 無細胞抽出液から組換えタンパク質を Ni-キレートカラムクロマトグラフィーにより精製した. 得られた精製タンパク質を種々の糖質 (40 mM) に 37°C にて 10 分間もしくは 16 時間作用させ, 反応液を TLC (展開溶媒 2-プロパノール/1-ブタノール/水 = 2/2/1) により分析した. 反応生成物の構造解析のため, 反応液を TLC で展開後, 反応生成物を含むシリカゲルをかきとり, 水で抽出した. 得られた生成物の構造を質量分析 (ESI-MS) と NMR により決定した. 反応速度論的解析では, D-フルクトース, D-タガトースおよび D-キシロースを常法に従って定量することで反応速度を求めた.

結果

1. RmCE の基質特異性の改変

基質結合部位周辺アミノ酸残基の置換により CE の結合特異性が変化することを期待し, 一連の Ala 置換体を作製して各種基質に作用させた. しかし, いずれの変異酵素も野生型酵素同様に β 1-4 結合以外のグルコ二糖類に作用しなかった.

2. CE と構造的類似性を示す機能未解明タンパク質の機能解析

大腸菌にて生産した組換え Marme_2490 タンパク質を各種基質に作用させ, 反応生成物を解析した. その結果, 本酵素は高い D-マンノースと D-フルクトース間の異性化活性を持つことが明らかになった (図 2). すなわち, 本酵素はマンノースイソメラーゼであることが判明した. 本酵素の D-マンノースに対する k_{cat}/K_m 値は既知酵素の 2.9-113 倍と高かった (表 1). 本酵素は既知のマンノースイソメラーゼと同様に D-リキソースにも作用し, D-キシロースを生

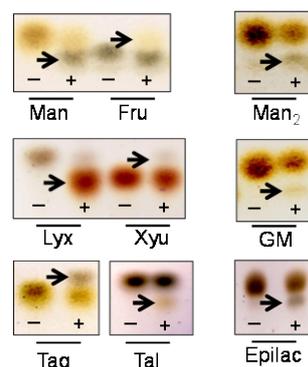


図 2. Marme2490 の基質の探索
+, 反応後; -, 反応ブランク. 反応生成物を矢印で示した.

成した。しかし、本酵素は既存酵素とは異なり、D-マンノースの4エピマーであるD-タロースにも作用してD-タガトースを生成した。

さらに、 β 1-4結合からなるオリゴ糖にも微弱ながら異性化活性を示し、 β 1-4マンノビオース、エピラクトース (Gal β 1-4Man) および Glc β 1-4Man よりそれぞれ Man β 1-4Fru, ラクチュロース (Gal β 1-4Fru) およびセロビウロース (Glc β 1-4Fru) を生成した。

表 1. Marme_2490 と関連酵素の速度パラメータ

Enzyme	D-Mannose			D-Lyxose			D-Talose		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
Marme_2490	329	16.7	19.7	64.4	42.3	1.52	0.319	27.8	0.0115
EcAKI	25.3	108	0.234	13.5	405	0.033	N.D.	N.D.	N.D.
SeAKI	23.3	134	0.174	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TfMI	788	115	6.85	63.3	537	0.118	N.D.	N.D.	N.D.

EcAKI, *E. coli* aldose-ketose isomerase; SeAKI, *Salmonella enterica* aldose-ketose isomerase; TfMI, *Thermobifida fusca* mannose isomerase

結論

本研究では、糖質異性化酵素の応用を拓くことを目的として既知酵素 CE の改変と機能未知酵素の機能解析を行った。CE の基質結合部位へのアミノ酸置換では、基質結合への選択性を改変することが叶わなかったが、機能未解明タンパク質の解析では、新規な基質特異性を持つマンノースイソメラーゼを見出すことができた。本酵素は既知酵素とは異なりオリゴ糖基質や D-タロースにも異性化活性を示すことから、この特異性の分子基盤に興味を持たれると共に、新しい糖質変換酵素としての利用が期待される。

文献

- 1) Fujiwara, T., Saburi, W., Matsui, H., Mori, H., and Yao, M. (2014) Structural insights into the epimerization of β -1,4-linked oligosaccharides catalyzed by cellobiose 2-epimerase, the sole enzyme epimerizing non-anomeric hydroxyl groups on unmodified sugars. *J. Biol. Chem.* **289**: 3405-3415.
- 2) Ojima, T., Saburi, W., Sato, H., Yamamoto, T., Mori, H., and Matsui, H. (2011) Biochemical characterization of a thermophilic cellobiose 2-epimerase from a thermohalophilic bacterium, *Rhodothermus marinus* JCM9785. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**: 2162-2168.