

学位論文題名

偏性嫌気性細菌由来 cellobiose 2-epimerase に関する研究

学位論文内容の要旨

Cellobiose 2-epimerase (CE) は *Ruminococcus albus* が生産するセロビオースをグルコシルマンノースに異性化する酵素として 1967 年に初めて Tyler と Leatherwood によって報告され、1969 年にその反応機構が予測されて以降、近年に至るまで一切の知見が存在しなかった。我々は、*R. albus* ATCC27210 を用いた実験で CE の単離精製、遺伝子配列の決定および大腸菌発現系の構築を行い、酵素化学的諸性質の一部を解明すると共に、CE がラクトースを基質としてガラクトシルマンノース (エピラクトース) に変換する反応も触媒することを発見した。エピラクトースは牛初乳中にごく少量含まれる稀少オリゴ糖であるのに対し、ラクトースは乳製品の副産物として大量に生じ、有効な活用法が求められている。また、エピラクトースはマンノース含有糖であること、 β -1,4 結合糖であることから難消化性オリゴ糖であることが予想され、プレバイオティクス効果が期待された。しかしながら、ATCC 登録標準菌株は工業的な応用に制限があることが問題であった。そこで本研究では、新たに単離された *R. albus* NE1 株由来の CE 遺伝子を用いて工業的に応用可能なエピラクトース生産系の確立を目指した。また、基質特異性の改変によってさらなる稀少オリゴ糖生産が可能になると判断し、基礎データとなる活性アミノ酸残基の推定も行った。さらに、エピラクトースの健康増進作用の一端を明らかにした。

R. albus NE1 由来の ce 遺伝子は、*R. albus* ATCC27210 由来の ce 遺伝子と 100 % の同一性を示した。本遺伝子の組換え酵素を用いて酵素学的諸性質を明らかにすることができた。CE は、セロビオースやラクトースに加え、グロボトリオースとマンノビオースを基質にすることを見出した。CE のマンノビオースに対する活性はセロビオースやラクトースと比較して、触媒効率で 300 倍程度、基質親和性で 2000 倍程度の高い数値を示した。このことから、CE が生体内では、マンノビオースエピメラーゼとして働いていると考えられた。さらに、化学修飾試薬や金属イオンが CE に与える影響を調査することで、CE の活性発現にはヒスチジン残基、トリプトファン残基、メチオニン残基のいずれか、あるいは全てが必要である可能性を見出した。また同様に、CE が SH 酵素である可能性も示された。

CE とわずかながらも同一性を示す機能性タンパク質として、豚腎臓由来 *N*-acyl-D-glucosamine 2-epimerase (AGE) および *Anabaena* sp. CH1 由来 AGE の 2 つが存在し、いずれも X 線解析による触媒機能の解析が行われている。CE とこれら AGE の同一性はそれぞれ 17 %、15 % であるが、活性中心近傍は保存されていたので、ホモロジーモデリングによる CE の推定構造構築に利用できると推定した。CE と AGE のアミノ酸配列間には保存され

た領域がいくつか存在し、特に AGE で触媒機能に重要であることが示唆されているアミノ酸残基がよく保存されていた。ホモロジーモデリング法で推定された CE の立体構造は AGE のそれと類似しており、両酵素は同様の触媒機構を有することが示唆された。

AGE では酵素活性の発現に R57, H239, E242, E308, H372, R375 の 6 つのアミノ酸残基が重要であり、特に H239, H372 が必要不可欠であることが示されている。これらのアミノ酸残基は CE 中に全て保存されていたため、相当する CE のアミノ酸残基を部位特異的変異法で置換し、それらの変異酵素の活性を調べた。また、化学修飾試験の結果から、トリプトファン残基、システイン残基が同様に触媒機能に重要であることが示唆されていたので、CE と AGE に保存されている全てのトリプトファン残基、システイン残基への変異導入も検討した。

AGE の活性残基にあたる、R52, H243, E246, E308, H374, R375 への変異導入の結果、CE はこれらのアミノ酸残基が置換されることでいずれの変異体も完全もしくはほぼ完全に活性を失うことを明らかにした。従って、CE と AGE は類似した触媒機構を有し、これらのアミノ酸残基が CE でも重要な役割を担っていると推定した。また、CE 分子内に存在する W55, W249, W303, W304 への変異導入も行った。これらトリプトファン置換変異体のうち、W249, W304 に関しては完全に酵素活性を失ったことから、これら 2 つのアミノ酸残基が酵素活性に重大な影響を及ぼしていることを明らかにした。また、それ以外のトリプトファン置換変異体でも K_m 値の顕著な増大が見られ、触媒活性が大幅に低下していることから、これらのアミノ酸残基が基質との結合、あるいは立体構造の保持に関連していると考えられた。システイン残基への変異導入の結果、いずれの変異体でも安定した活性として検出することができなかった。以上結果から、H243, H374 が酸/塩基触媒と推定し、CE の反応機構を構築した。

CE の生産研究に重要となる因子として、耐熱性と酸化耐性が考えられた。このうち、酸化耐性はこれまでの研究から活性中心近傍に存在するメチオニン残基のスルホキシド化を防ぐことで取得できることがわかっている。CE のホモロジーモデルから、活性中心近傍にメチオニン残基が複数存在することがわかった。これらのメチオニン残基、M106, M251, M378, M380 のスレオニン置換変異体を作製したところ、得られた変異体は M380T を除いて著しく CE 活性を失っており、M251T に関しては完全に活性を失っていた。そこで、CE 中に存在するメチオニン残基全てに同様の変異をそれぞれ導入したが、いずれの変異体も野生型酵素より酸化剤に対して不安定であった。このことから、CE の酸化による失活はこれまでに知られていない、新たな機構によって生じることが示唆された。

さらに本研究では、エピラクトースの健康増進作用の一端を明らかにした。人工胃液とラット小腸粗酵素液を用いた実験でエピラクトースが優位に消化を受け難いオリゴ糖であることを証明した。更に、ヒト由来のビフィズス菌のエピラクトース資化性試験を行ったところ、用いた全ての菌で増殖が認められた。すなわち、エピラクトースが大腸までに分解を受けず、腸内フローラの改善作用を有することが推定された。また、腸管上皮培養細胞を用いた電気抵抗試験の結果、エピラクトースがタイトジャンクションを介したミネラルの吸収促進作用があることを明らかにした。これらの結果から、コレステロール低下作用、大腸におけるビフィズス菌の増殖促進作用、カルシウムやマグネシウムの吸収促進作用などが相次いで報告され、保健機能食品としての研究の糸口となった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 井 博 和

副 査 教 授 横 田 篤

副 査 准教授 森 春 英

学 位 論 文 題 名

偏性嫌気性細菌由来 cellobiose 2-epimerase に関する研究

本論文は、図 47、表 15、引用文献 87 を含み、5 章からなる総ページ 150 の和文論文である。別に参考論文 3 編が添えられている。

Cellobiose 2-epimerase (CE) は *Ruminococcus albus* が生産するセロビオースをグルコシルマンノースに異性化する酵素として 1967 年に初めて Tyler と Leatherwood によって報告され、1969 年にその反応機構が予測されて以降、近年に至るまで一切の知見が存在しなかった。我々は、*R. albus* ATCC27210 を用いた実験で CE の単離精製、遺伝子配列の決定および大腸菌発現系の構築を行い、酵素化学的諸性質の一部を解明すると共に、CE がラクトースを基質としてガラクトシルマンノース（エピラクトース）を生産することを明らかにした。エピラクトースは牛初乳中にごく少量含まれる稀少オリゴ糖であるのに対し、ラクトースは乳製品の副産物として大量に生じ、有効な再活用法が求められている。また、エピラクトースはマンノース含有糖であること、 β -1,4 結合糖であることから難消化性オリゴ糖であることが予想され、プレバイオティクス効果が期待された。しかしながら、ATCC 登録標準菌株は工業的な応用に制限があることが問題であった。そこで本研究では、新たに単離された *R. albus* NE1 株由来の CE 遺伝子を用いて工業的に応用可能なエピラクトース生産系の確立を目指した。また、基質特異性の改変によってさらなる稀少オリゴ糖生産が可能になると判断し、基礎データとなる活性アミノ酸残基の推定も行った。さらに、エピラクトースの健康増進作用の一端を明らかにした。

R. albus NE1 由来の ce 遺伝子は、*R. albus* ATCC27210 由来の ce 遺伝子と 100 % の同一性を示した。本遺伝子の組換え酵素を用いて酵素学的諸性質を明らかにすることができた。CE は、セロビオースやラクトースに加え、グロボトリオースとマンノビオースを基質にすることを見出した。CE のマンノビオースに対する活性はセロビオースやラクトースと比較して優位に高い数値を示した。このことから、CE が生体内では、マンノビオースエピメラーゼとして働いていると考えられた。さらに、化学修飾試薬や金属イオンが CE に与える影響を調査することで、CE の活性発現にはヒスチジン残基、トリプトファン残基、

メチオニン残基のいずれか、あるいは全てが必要である可能性を見出した。また同様に、CE が SH 酵素である可能性も示された。

CE とわずかながらも同一性を示す機能性タンパク質として、豚腎臓由来 *N*-acyl-D-glucosamine 2-epimerase (AGE) および *Anabaena* sp. CH1 由来 AGE の 2 つが存在し、いずれも X 線解析による触媒機能の解析が行われている。CE とこれら AGE の同一性はそれぞれ 17%, 15 %であるが、活性中心近傍は保存されていたので、ホモロジーモデリングによる CE の推定構造構築をおこなった。CE と AGE のアミノ酸配列間には保存された領域がいくつか存在し、特に AGE で触媒機能に重要であることが示唆されているアミノ酸残基がよく保存されていた。ホモロジーモデリング法で推定された CE の立体構造は AGE のそれと類似しており、両酵素は同様の触媒機構を有することが示唆された。

AGE では酵素活性の発現に R57, H239, E242, E308, H372, R375 の 6 つのアミノ酸残基が重要であり、特に H239, H372 が必要不可欠であることが示されている。これらのアミノ酸残基は CE 中に全て保存されていたため、相当する CE のアミノ酸残基を部位特異的変異法で置換し、それらの変異酵素の活性を調べた。また、化学修飾試験の結果から、トリプトファン残基の触媒機能への関与が示唆されていたので、CE と AGE に保存されている全てのトリプトファン残基への変異導入も検討した。

AGE の活性残基にあたる、R52, H243, E246, E308, H374, および R377 への変異導入の結果、CE はこれらのアミノ酸残基が置換されることでいずれの変異体も完全もしくはほぼ完全に活性を失うことが明らかにした。従って、CE と AGE は類似した触媒機構を有し、これらのアミノ酸残基が CE でも必須であることが明らかになった。また、CE 分子内に存在する W55, W249, W303, W304, への変異導入も行った。これら変異体のうち、W249, W304 に関しては完全に酵素活性を失っていたことから、これら 2 つのアミノ酸残基が酵素活性に重大な影響を及ぼしていることを明らかになった。また、それ以外のトリプトファン置換変異体でも K_m 値の顕著な増大が見られ、触媒活性が大幅に低下していることから、これらのアミノ酸残基が基質との結合、あるいは立体構造の保持に関連していると考えられた。以上結果から、H243, H374 が酸/塩基触媒と推定し、CE の反応機構を構築した。

さらに本研究ではエピラクトースの健康増進作用の一端を明らかにした。人工胃液とラット小腸粗酵素液を用いた実験でエピラクトースが優位に消化を受け難いオリゴ糖であることを証明した。更に、ヒト由来のビフィズス菌のエピラクトース資化性試験を行ったところ、用いた全ての菌で増殖が認められた。すなわち、エピラクトースが大腸までに分解を受けず、腸内フローラの改善作用を有することが推定された。また、腸管上皮培養細胞を用いた電気抵抗試験の結果、エピラクトースがタイトジャンクションを介したミネラルの吸収促進作用があることを明らかにした。これらの結果から、コレステロール低下作用、大腸におけるビフィズス菌の増殖促進作用、カルシウムやマグネシウムの吸収促進作用などが相次いで報告され、保健機能食品としての研究の糸口となった。

本研究によって、CE の反応機構、エピラクトースの応用性に関する新たな知見が得られた。特筆すべきことに、CE が生体内でマンノビオース 2-エピメラーゼとして働いている可能性を見出し、CE の生理的意義の解明に大きく近づいたといえる。

よって審査員一同は、伊藤重陽が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。