

3P-1041 *Mesorhizobium loti* の生産する L-ラムノースイソメラーゼの基質特異性と触媒効率

高田 悟郎¹, 上原 夕佳², ○上地 敬子², 谷口 絵里子²,
吉原 明秀¹, 森本 兼司¹, 何森 健³
(¹香川大・希少糖セ,²香川大・農,³希少糖生産技術研究所)

【目的】

L-ラムノースイソメラーゼは、ケトース-アルドース間の可逆的異性化反応を触媒する酵素で、さまざまな希少糖の生産に応用できる重要な酵素の一つである。本研究は、希少糖の生産性の向上を目的として、*M. loti*由来のL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子を大腸菌で活性発現させて得られる組換え酵素の諸性質、とくに基質特異性と触媒効率について明らかにした。

【方法および結果】

発現ベクターはpQE60とpColdII、宿主には大腸菌JM109を用い、L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子を発現ベクターに連結させて大腸菌で活性発現させた。組換え酵素の精製を行ったところ比活性は72.3 U/ml、収率は46.5%に精製され、SDS-PAGEにより単一のバンドを得ることができた。基質特異性を調べたところL-ラムノースに対する活性が最も高く、以下、L-リキソース、D-リボース、D-アロース、L-マンノースに対して高い活性を示した。L-ラムノースを基質としたときの K_m は4.94 mM、 k_{cat}/K_m は $6.14 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ 、L-リキソースを基質としたときの K_m は23.5mM、 k_{cat}/K_m は $1.89 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ 、D-リボースを基質としたときの K_m は6.18 mM、 k_{cat}/K_m は $4.60 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ 、L-マンノースを基質としたときの K_m は23.4 mM、 k_{cat}/K_m は $2.56 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ 、D-アロースを基質としたときの K_m は7.11 mM、 k_{cat}/K_m は $1.12 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ であった。

Specific activity and catalytic efficiency of L-Rhamnose isomerase from *Mesorhizobium loti*

Goro TAKATA¹, Yuka KANBARA², ○Keiko UECHI²,
Eriko TANIGUCHI², Akihide YOSHIHARA¹, Kenji MORIMOTO¹,
Ken IZUMORI³
(¹RSRC,²Kagawa Univ.,³Fac. Agric., Kagawa Univ.,³Izumoring LLC)

Key words rare sugar, L-Rhamnose isomerase

3P-1043 β -アラビノオリゴ糖鎖の分解に関わる新規糖質分解酵素群の機能解析

○藤田 清貴, 坂元 志帆, 高由 香里, 小野 祐樹,
大瀧 衣里子, 北原 兼文, 菅沼 俊彦
(鹿児島大・農・生資化)

【目的】植物糖タンパク質であるナス科レクチンやエクステンシンの β -アラビノオリゴ糖鎖を切断する酵素群の*Bifidobacterium longum*からのクローニングとその機能解析を目的とした。

【方法】*B. longum* JCM1217のゲノム上でクラスターを形成しているGH-43ホモログ(HypAA)と、機能未知タンパク質(HypBA1及びHypBA2)を大腸菌で発現させ、His-tagを利用して精製した。 β -アラビノオリゴ糖鎖であるAraf α 1,3Araf β 1,2Araf β 1,2Araf β -Hyp(Araf α -Hyp)、Araf β 1,2Araf β 1,2Araf β -Hyp(Araf β -Hyp)を基質として酵素反応を行い遊離糖の解析を行った。

【結果】HypAAはAraf α -HypをAraとAraf β -Hypに分解する α -L-アラビノフラノシダーゼであった。HypBA2はAraf β -Hypに作用しAraf β 1,2Araf(Araf β)とArafHypに分解する β -L-アラビノピオシダーゼであり、HypBA1は遊離したAraf β をAraに分解する β -L-アラビノフラノシダーゼとして機能することを明らかにした。HypAAとHypBA2は細胞壁結合領域を持つ菌体外酵素、HypBA1は菌体内酵素として β -アラビノオリゴ糖鎖をアラビノースにまで分解し、*B. longum*のアラビノース代謝系により資化されると考えられる。

Characterization of novel glycosidases involved in the degradation of β -arabino-oligosaccharides

○Kiyotaka Fujita, Shiho Sakamoto, Yukari Takashi, Yuki Ono,
Eriko Obuchi, Kanefumi Kitahara, Toshihiko Suganuma
(Fac. Agric., Kagoshima Univ.)

Key words arabinosidase, *Bifidobacterium longum*, beta-arabino-oligosaccharide, extensin

3P-1042 *Enterobacter aerogenes* IK7 由来の L-アラビノースイソメラーゼ遺伝子の大量発現系の構築と組換え酵素を用いた希少糖の生産

○古田 睦¹, 高田 悟郎², 吉原 明秀², 横田 有香¹,
森本 兼司², 何森 健³
(¹香川大・農,²香川大・希少糖セ,³希少糖生産技術研究所)

【目的】

希少糖とは、自然界に微量もしくは全く存在しない単糖またはその誘導体と定義されている。希少糖の生産における基盤酵素の一つであるL-アラビノースイソメラーゼは、L-アラビノースとL-リブロース間、D-ガラクトースとD-タガトース間の異性化反応を触媒することが分かっている。本研究では、L-アラビノースイソメラーゼを用いた希少糖の大量生産方法の確立を目的とし、*E. aerogenes* IK7由来のL-アラビノースイソメラーゼ遺伝子の大量発現系を構築し、組換え酵素を用いた希少糖の生産を試みた。

【方法および結果】

既知のL-アラビノースイソメラーゼのアミノ酸配列からプライマーを作製し、PCRによって*E. aerogenes* IK7由来のL-アラビノースイソメラーゼ遺伝子を増幅させた。増幅断片のシーケンス解析の結果、L-アラビノースイソメラーゼ遺伝子のORFは、1,500 bpからなり、500アミノ酸をコードし、推定分子量は55,791であった。次に、L-アラビノースイソメラーゼ遺伝子をpQE60ベクターと連結し、発現ベクターを構築した。組換え酵素を部分精製した結果、熱安定性は親株由来のL-アラビノースイソメラーゼよりも優れており、55°Cまでであった。固定化酵素を作成し、パッチ法で反応させた結果、反応温度45°Cおよび50°Cでは24時間、40°Cでは33時間で1% L-プシコースを基質としたときの16%がL-アルトロースに転換された。

Over-expression of L-arabinose isomerase from *Enterobacter aerogenes* IK7 and rare sugar production by recombinant enzyme

○Mutsumi FURUTA¹, Goro TAKATA², Akihide YOSHIHARA²,
Yuka YOKOTA¹, Kenji MORIMOTO², Ken IZUMORI³
(¹Fac. Agric., Kagawa Univ.,²RSRC,³Kagawa Univ.,³Izumoring LLC)

Key words rare sugar, L-Arabinose Isomerase

3P-1044 *Serratia* 由来フルクトシル基転移酵素の触媒アミノ酸残基の解析

○角野 紬奈, 岡本 賢治, 瀬瀬 英司
(鳥取大・工・生工)

【目的】本研究は、糖転移酵素の触媒作用を利用して様々な受容体に糖鎖を付加した配糖体合成を目的としている。Fructosyltransferase (EC 2.4.1.10)はGH68ファミリーに分類され、スクロース分子内のフルクトシド結合を切断し、そのフルクトシル基を受容体となるスクロースに転移し、高重合度のフルクタンを生成する。これまでに、*Zymomonas mobilis*や*Bacillus subtilis*が細胞外に分泌するFTaseとは異なる直鎖状フルクタン合成を触媒する*Serratia*属由来FTase (SeFTase) 遺伝子をクローニングして、一次構造から立体構造を予測することにより、機能ドメインと触媒アミノ酸残基を推定している。今回は、SeFTaseの触媒アミノ酸残基を明らかにするために、推定したアミノ酸残基へのアミノ酸置換を導入し、その変異酵素の酵素化学的性質を解析した。

【方法と結果】SeFTase遺伝子は1278 bpで425 a.a.残基からなり、分子量43,722の酵素である。既報の微生物由来FTaseとの一次構造のアライメントと立体構造予測から、触媒アミノ酸残基としてAsp46、Asp201、Glu285の3つのアミノ酸残基がスクロース分子内のフルクトシド結合に関与すると予測した。そこで、その中でもサブサイト-1に位置するAsp46へのアミノ酸置換 (Asp46Glu、Asp46Asn、Asp46Lys、Asp46Ala)を導入した。アミノ酸置換酵素はpColdI発現ベクターを利用して大腸菌内で発現させた。いずれのアミノ酸置換酵素においても活性が著しく低下したことから、Asp46はスクロース分子内フルクトシル基の2位の炭素への求核攻撃に関与していると考察した。

Catalytic amino acid residues of *Serratia* sp. fructosyltransferase

○Ayana KADONO, Kenji OKAMOTO, Hideshi YANASE
(Dept. Biotech., Tottori Univ.)

Key words fructosyltransferase, fructosidase, sucrose, *Serratia* sp.