HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Function, structure, and application of microbial enzymes related to CE-MGP pathway [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Jaito, Nongluck
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第11993号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/60176
Rights(URL)	http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Nongluck_Jaito_review.pdf (審査の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（農学）　　氏　名　　Nongluck Jaito

審査担当者　主査　　教授　　森　　春英
　　副査　　教授　　横田　　篤
　　副査　　教授　　木村　淳夫
　　副査　　助教　　佐分利　亘

学位論文題名

Function, structure, and application of microbial enzymes related to CE-MGP pathway

（微生物由来 CE-MGP 経路関連酵素の機能，構造ならびに応用に関する研究）

本論文は英文 121 頁，図 48，表 11，6 章からなり，参考論文 2 編が付されている．β マンナンは，主に D-Man が β1-4 結合した多糖である．β マンナン資化性微生物は，一般的に β-mannanase 等の加水分解酵素によりこれを代謝するが，嫌気性細菌 *Bacteroides fragilis* および *Ruminococcus albus* では CE-MGP 経路が提唱されている．本経路では，菌体内において Man-Man はまず cellobiose 2-epimerase (CE)により Man-Glc に変換され，続いて Man-Glc に特異的なホスホリラーゼ(MGP)により Man1*P* と D-Glc に加リン酸分解される．

本研究は，CE-MGP 経路の関連酵素について，機能，構造機能相関および D-Man 含有二糖の比色定量への応用に関するものである．

1)　Rmar_2440 の生化学的解析

CE-MGP 経路酵素遺伝子は，嫌気性菌に限定されず存在する．好気性細菌 *Rhodothermus marinus* 由来 CE 遺伝子はすでに同定されている．隣接する *Rmar_2440* は，配列類似性から MGP であると予想された．本 RmMGP 組換え酵素の機能解析を行った．RmMGP は Man-Glc を加リン酸分解した．逆反応では，Man1*P* からの D-Man 基の受容体基質として D-Glc の他に 6-deoxy-D-glucose，D-xylose，更にわずかではあるが methyl β-D-glucoside および 1,5-anhydro-D-glucitol に作用した．D-Man および Man-Man は受容体基質とはならず，従ってマンノオリゴ糖代謝では MGP の作用に先立ち CE 反応が必須であることが確認された．

2)　RmCE の二糖特異性に関与する構造因子

CE は，Man-Man に加えセロビオースやラクトース等，β1-4 結合した二糖を基質とし，還元末端側糖残基の C2 位をエピメリ化する．アミノ酸配列は *N*-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase (AGE)および aldose–ketose isomerase (AKI)に類似し，多数の機能未知酵素群とともに AGE スーパーファミリーを形成する．*R. marinus* 由来酵素(RmCE)は立体構造既知であり，全体および触媒中心近傍構造は

AGE や AKI に良く一致する．本研究では，まず CE 特有の二糖特異性に注目し，これに関わる構造因子を解析した．

CE 酵素群でのアミノ酸保存性，ならびに基質二糖の非還元末端側糖残基への結合予想に基づき Asp188 と Trp385 に注目した. RmCE は単糖にもわずかに作用するが，Ala 置換酵素では二糖に対する活性低下が顕著であった．従って，これら 2 残基の二糖特異性への強い関与が明らかとなった．

3) AGE スーパーファミリーの機能未知タンパク質の解析

次に，AGE スーパーファミリーの機能未知タンパク質群に属す *Marinomonas mediterranea* 由来 Marme_2490 の機能解析を行った．本酵素組換え体は，D-Man と D-Fru 間の異性化を主反応とし，D-mannose isomerase (MmMI)と判断された．既知の MI よりも k_{cat}/K_m が高い．MmMI は，他起源 MI と同様に五炭糖 D-lyxose に作用したが，更に D-talose（D-Man の 4 位エピマー）やわずかではあるが β1-4 結合した二糖 Glc-Man 等も基質とした．

４) MGP と CE の D-Man 含有 2 糖の比色定量への応用

β マンノオリゴ糖はプレバイオティクス，自然免疫調節等の機能を持ち，製造法とともに，迅速かつ高精度の定量法開発が望まれる．Man-Glc は MGP により特異的に分解され，生じた等分子数の D-Glc は一般的酵素法により比色定量できる．これら一連の反応をワンポットで行った．すなわち試料に MGP 含有検出試薬を混合し保持後の吸光度から Man-Glc の定量が可能となった. 検出試薬への CE 添加により，Man-Man も定量でき，簡便かつ高精度，多検体にも適応可能な D-Man 含有二糖定量法が確立された．

以上，本研究では生化学的・酵素化学的アプローチにより，好気性細菌における CE-MGP 経路の存在が明らかにされ，AGE スーパーファミリー酵素に関し，新たな酵素の同定ならびに二糖基質特異性に関わるアミノ酸残基特定が行われた. 更に CE-MGP 経路を模した D-Man 含有二糖定量法が開発された．以上の成果は，微生物による β マンナン代謝と関連酵素の理解, ならびにオリゴ糖合成等の応用研究を含めマンノオリゴ糖研究に広く寄与するものである．

よって審査員一同は，Nongluck Jaito 氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた．