

Bifidobacterium adolescentis G1 由来 β -フラクトフラノシダーゼ の活性解離基と生成物のアノマー型

村 松 圭*・菊 地 政 則*・小野寺秀一**・塩 見 徳 夫**

Essential Ionizable Groups and Anomeric Forms of Products of β -Fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1

Kei MURAMATSU*, Masanori KIKUCHI*, Shuichi ONODERA**
and Norio SHIOMI**

(June, 1995)

緒 言

Bifidobacterium はヒトの健康の維持、増進において有用な腸内細菌であることが知られており、近年 *Bifidobacterium* の腸内での生育を促進させる方法や物質の検索がなされている。難消化性の糖であるフラクトオリゴ糖は、ヒトの腸内で消化吸収されず *Bifidobacterium* に選択的に資化されることが確認されている⁴⁾。

すでに筆者らは、フラクトオリゴ糖を炭素源として培養した *Bifidobacterium adolescentis* G1 の菌体内抽出液から β -フラクトフラノシダーゼ [EC 3.2.1.26] を精製した⁸⁾。この酵素はこれまでに報告されているショ糖に良く作用し高分子のイヌリンには作用しない酵母や植物由来のインベルターゼや、ショ糖のみならずイヌリンをフラクトシル末端から順に加水分解する *exo*-イヌリナーゼとは異なり、フラクトオリゴ糖に良く作用するという基質特異性を持つことを明らかにした⁸⁾。また本酵素の基質特異性を定量的に説明するために活性中心における基質の加水分解様式を解析し、反応速度論的手法を用いてサブサイト親和力を評価した⁹⁾。

一方、酵素の特異的な触媒作用には、構成アミノ酸中の一部の特定のアミノ酸残基やその官能基が大きく関与しており、そのアミノ酸残基を同定し機能を解明するこ

とや、反応生成物のアノマー型を確認することは、酵素の反応機構を明らかにする上で重要なことである。そこで今回、酵素の活性中心の構造と機能をさらに解析するために、活性解離基の推定と反応生成物のアノマー型の同定を行った。

材 料 と 方 法

1. 供試菌の培養

B. adolescentis G1 の培養は既報⁸⁾ の方法に従って行った。すなわち、炭素源として 0.5% のフラクトオリゴ糖を加えた BL 培地¹⁰⁾ を用いて、あらかじめ前培養した培養液を 1% の割合で接種し 37°C で静置培養した。なお、前培養については炭素源を 0.5% ブドウ糖とした BL 培地を用いた。培養液を遠心分離して得られた菌体を凍結乾燥し、酵素の抽出を行うまで -40°C で保存した。

2. β -フラクトフラノシダーゼの精製

凍結乾燥菌体は超音波破碎処理を行い粗抽出液を得たのち、既報⁸⁾ に従い、イオン交換、疎水性、ゲルろ過の各カラムクロマトグラフィーおよび調製用電気泳動を行って、本酵素を電気泳動的に均一に精製した。

3. 酵素活性の測定

酵素活性は、遊離するフラクトースを酵素法^{2,7)} によ

* 酪農学園大学 食品科学科 応用微生物学研究室

Department of Food Science (Applied Microbiology), Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan.

** 酪農学園大学 食品科学科 食品栄養化学研究室

Department of Food Science (Food and Nutrition Chemistry), Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan.

って測定算出した。

標準反応組成は 0.5% 1-kestose 溶液 0.2 ml, 酵素溶液 0.1 ml, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.1) 0.2 ml の計 0.5 ml とした。37°C で 10 分間温浴し, 100°C で 3 分間加熱して反応を止めた後, 酵素法を用いて生成したフラクトース量を測定した。

酵素単位は上記の条件下において 1 分間に 1 μ mol の反応生成物を生成する量を 1 ユニット (unit, U) とした。

4. タンパク量の測定

タンパク量は, 280 nm における比吸光係数を 12.1⁸⁾ として UV 法で算出した。

5. 活性解離基の推定

活性解離基の推定は速度論的手法を用いて pK_e (遊離酵素の pK 値), ΔH (解離熱), および pK_e に対する溶媒の誘電率低下の影響から検討した⁵⁾。

酵素タンパクに含まれる種々の解離基はその種類に応じて特徴的な pK 値を持つため, これを目安として活性解離基の見当をつけることが可能である。 pK_e 値は V/K_m の pH 依存性から得られるが, ミカエリス・メンテンの式から $K_m \gg s$ のとき

$$v = (V/K_m) \cdot s$$

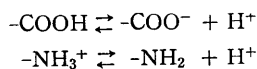
である。すなわち基質濃度が K_m 値より十分に低い状況下では, 速度-pH 曲線は Dixon プロットの $pH-V/K_m$ 曲線に近似し, 最大値の 1/2 初速度を与える pH を pK_e 値とみなすことができる。従って $K_m \gg s$ が成り立つような低基質濃度 s において v の pH 依存性を調べれば, 最大活性の 1/2 の速度を与える pH 値として簡便的に pK 値を求められる。そこで $K_m \gg s$ の条件下における速度-pH 曲線を用いて pK_e 値を算出した。

遊離酵素の活性解離基の解離熱 (ΔH_e) は pK_e 値の温度変化から van't Hoff の式

$$\Delta H_e = 2.3 R \cdot [d(pK_e)/d(1/T)]$$

を用いて求められる。ここで R は気体定数, T は絶対温度であり, この値も解離基の種類に特徴的である。

さらに解離に伴う荷電の変化の様式を検討した。カルボキシル基のように解離に際して新たに正負のイオンを生じる型では, アミノ基のような荷電の符号の変化のない型に比べて溶媒の誘電率の影響を受け易く, 低い誘電率の溶媒中で pK が増加する (解離が抑制される) ことが期待される。



従って本実験では反応液中にメタノールを添加し, 誘電

率を低くした場合の pK_e 値の変化を調べた。すなわち終濃度 30% になるようにメタノールを加え, pK_e を算出した系に準じ速度-pH 曲線より求めた。

6. ^{13}C -NMR 測定

測定は Shiomi と Onodera¹⁶⁾ の報告に準じて行った。すなわち 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.1) 中の酵素溶液 (350 unit) 0.3 ml, 500 mg/ml 1-kestose 0.4 ml を 25°C で混合しながら 30 秒間反応させ, その後 46.5 秒間ずつ経時的に ^{13}C -NMR スペクトル分光装置 (Bruker AM-500) により, 糖のシグナルを積算測定し分析した。外部標準には 1.4 ジオキサンを用いた。1-kestose, ショ糖およびフラクトースのシグナルは Jarrell⁹⁾ および Angyal と Bethell¹⁾ の報告を参考にして帰属した。なお溶液作成時の水はすべて重水を用い, 酵素はあらかじめ重水で十分透析し用いた。

結 果

1. β -フラクトフラノシダーゼの活性解離基の推定

終濃度 0.1 mM の 1-kestose を基質として各 pH のリン酸緩衝液中で反応させ, 得られた初速度の相対値をプロットした (Fig. 1)。その結果, 酸性側 pK_e (pK_{e1}) の値は 4.96, アルカリ側 pK_e (pK_{e2}) の値は 7.48 と算出された。

また ΔH_e 値を求めるため 20~45°C の各温度での

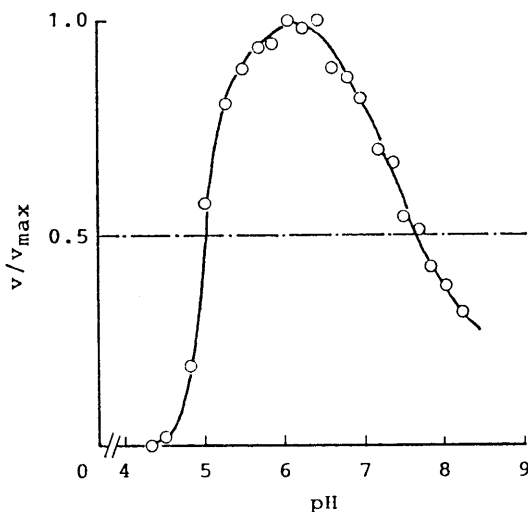


Fig. 1. pH-Velocity Curve for Hydrolysis of 1-Kestose by β -Fructofuranosidase.

A reaction mixture containing 0.1 ml of enzyme solution, 0.2 ml Na_2HPO_4 -citric acid buffer at various pH's, 0.1 ml of 0.1 mM 1-kestose and 0.1 ml distilled water was incubated at 37°C.

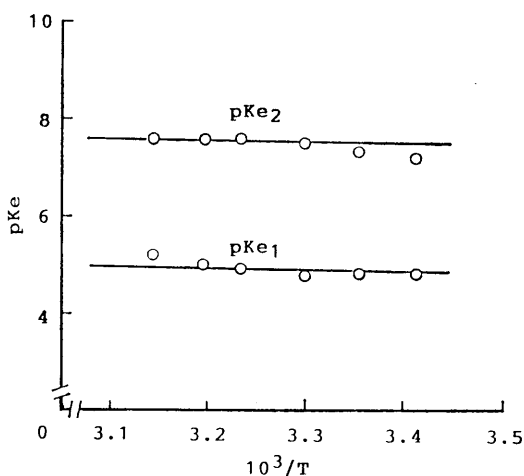


Fig. 2. Temperature Dependence of pK_{e1} and pK_{e2} .

Details are described in the text.

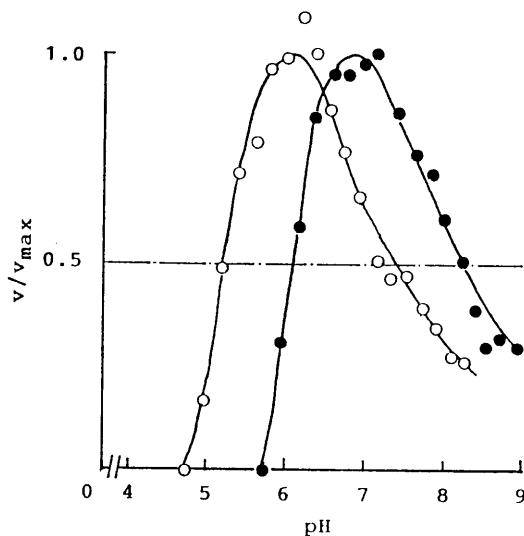


Fig. 3. Effect of Methanol on Hydrolysis of 1-Kestose by β -Fructofuranosidase.

A reaction mixture containing 0.05 ml of enzyme solution, 0.2 ml Na_2HPO_4 -citric acid buffer at various pH's, 0.1 ml of 0.1 mM 1-kestose and 0.15 ml of 100% methanol or distilled water was incubated at 37°C.

—○—, methanol 0%; —●—, methanol 30%.

pK_e を測定し、それを絶対温度の逆数に対してプロットした (Fig. 2)。解離熱は直線の傾きとして得られ、 pK_{e1} 、 pK_{e2} ともに -1.5 kcal/mol と算出された。

さらに溶媒の誘電率低下の影響を調べた。その結果、

Table 1. Characterization of Essential Ionizable Groups of β -Fructofuranosidase

	ionizable group (1)	ionizable group (2)
pK_e	4.96	7.48
ΔH (kcal/mol)	-1.5	-1.5
ΔpK_e (30% MeOH)	+0.85	+0.85
	$-\text{COO}^-$	$(-\text{COOH})$

Fig. 3 に示したように pK_{e1} 、 pK_{e2} ともに 30% メタノール添加によりアルカリ側に大きく 0.85 単位移行し、低い誘電率の溶液中で解離が抑制された。

以上の 3 つの方法により得られた結果を Table 1 にまとめた。これらの値から本酵素の活性解離基の推定を行った。一般的なカルボキシル基の pK 値 (25°C) は 3.0 ~ 4.7、 ΔH は ± 1.5 kcal/mol であることが知られており、またカルボキシル基は解離に伴って新たに正負のイオンを生じるため pK_e 値が誘電率低下の影響を受けて増加する。本酵素の酸性側解離基 (1) は pK_e 値、 ΔH およびメタノール添加系における pK_e の変化のいずれについてもカルボキシル基 ($-\text{COO}^-$) と推定された。アルカリ側解離基 (2) は解離熱および 30% メタノール中における pK_e のずれから、これもカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) の可能性が考えられたが、 pK_e 値が 7.48 と高く、通常のカルボキシル基の範囲からはずれており、今後さらに他の方法による検討が必要であろう。

2. 生成糖のアノマー型

^{13}C -NMR 法を用いて酵素反応により生成した糖のアノマー型について検討を行った。前述の方法にしたがい、0, 1.3, 2.8, 4.4, 9.3 分後の反応液のスペクトルを観察し、その結果を Fig. 4 にまとめた。スペクトルは表示された時間より 46.5 秒間積算したシグナルである。

0 分のときのシグナルは 1-kestose 由来のもののみであり、それぞれ 104.31 ppm には 1-kestose の末端に位置するフラクトース残基 (F') の C-2 のシグナル、103.83 ppm には中央のフラクトース残基 (F) の C-2 のシグナル、93.07 ppm にはグルコース残基の C-1 のシグナルが観察され、順次、80~75 ppm に両フラクトース残基の C-5, 3, 4 のシグナル、73~68 ppm にグルコース残基の C-3, 5, 2, 4 のシグナル、63~60 ppm に両フラクトース残基の C-6, 1 のシグナル、グルコース残基の C-6 の各シグナルが観察された。1.3 分では遊離の β -D-フラクトフラノース (β -Ff) 由来のシグナルが 102.10 ppm に観察されその他の β -Ff の C-5, 3, 4, 1, 6 のシグ

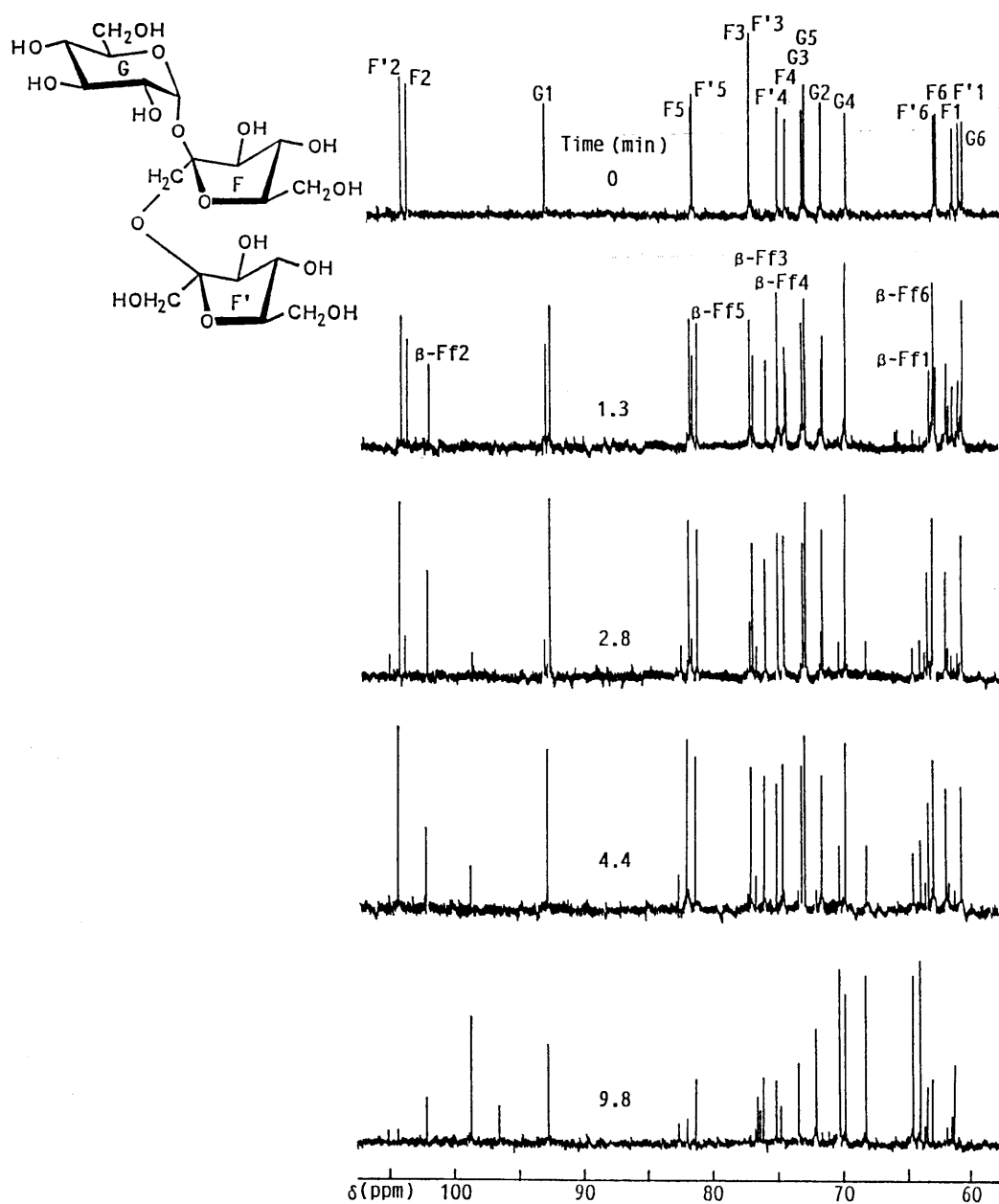


Fig. 4. ^{13}C -NMR Spectra of Saccharides Released from 1-Kestose by β -Fructofuranosidase.

A reaction mixture containing 0.3 ml of enzyme solution (350 units) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.1, D_2O) and 0.4 ml of 1-kestose (200 mg) in D_2O was incubated at 25°C .

F1-F6, signals of C1-C6 of central β -D-fructofuranose unit in 1-kestose;

F'1-F'6, signals of C1-C6 of terminal β -D-fructofuranose unit in 1-kestose;

G1-G6, signals of α -D-glucopyranose unit of 1-kestose;

β -Ff1- β -Ff6, signal of β -D-fructofuranose.

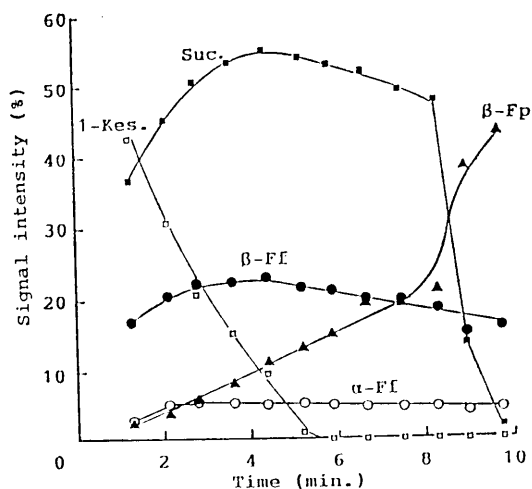


Fig. 5. Time Courses of Products Released from 1-Kestose by β -Fructofuranosidase.

A reaction mixture containing 0.3 ml of enzyme solution (350 units) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.1, D_2O) and 0.4 ml of 1-kestose (200 mg) in D_2O was incubated at $25^\circ C$.

β -Ff, β -D-fructofuranose; β -Fp, β -D-fructopyranose; α -Ff, α -D-fructofuranose; Suc., sucrose; 1-Kes., 1-kestose.

ナルも観察された。2.8分では β -Ffのシグナルがさらに大きくなり、また新たに105.10 ppmに α -D-フラクトフラノース(α -Ff)のC-2に由来するシグナルが観察された。4.4分では1-kestoseのシグナルが小さくなり、ショ糖由来のシグナルが大きく観察された。9.8分ではショ糖のシグナルがほとんど観察されなくなり、 β -Ffから非酵素的に生じた β -D-フラクトピラノース(β -Fp)由来のシグナルが大きく観察された。

反応初期の1.3分に β -Ff残基の2位およびその他の五つの炭素に由来するシグナルが検出されたことから、本酵素の1-kestoseから生成するD-フラクトフラノースのアノマー型は β 型であると確認した。さらに全シグナル強度に対する各々の糖の全シグナル強度の相対値をパーセントで示し、それを経時的にまとめた(Fig. 5)。 β -Ffが反応初期から20%前後と高い割合を示し、 α -Ffが2.8%、 β -Fpが2.2%と低い値を示したことから、1-kestoseから生成されたD-フラクトフラノースのアノマー型は β であると確認された。また1-kestoseのシグナルが認められなくなってからショ糖のシグナルが減少したことより、本酵素は二糖のショ糖よりも三糖の1-kestoseによく作用することが確認された。

考 察

本研究では、酵素の活性中心の構造と機能を詳細に解析するために、活性解離基と反応生成物のアノマー型の推定をおこなった。酸性側解離基では、 pK_e 値が4.96、 ΔH_e (解離熱)値が -1.5 kcal/mol、30%メタノール添加によって pK_e 値がアルカリ側に大きく0.85単位移行したことから、カルボキシル基($-COO^-$)と推定された。同様にアルカリ側解離基では、 pK_e 値は7.48、 ΔH_e 値が -1.5 kcal/mol、30%メタノール添加によって pK_e 値がアルカリ側に大きく0.85単位移行した。アルカリ側の解離基についてもカルボキシル基($-COOH$)の可能性が考えられたが、 pK_e 値が7.48と高く、通常のカルボキシル基の範囲からは外れていた。

小野寺らはすでに*Penicillium*属糸状菌の産生するエンド¹²⁾およびエキソ¹³⁾型イヌリナーゼを精製し、その活性解離基を今回と同様の方法で推定している。エンド型イヌリナーゼの pK_e 値は pK_{e1} および pK_{e2} でそれぞれ4.7および6.7であり、 ΔH_e 値は pK_{e1} 、 pK_{e2} でそれぞれ -1.7 kcal/mol、 -1.5 kcal/molであり、30%メタノール添加によって pK_e 値が pK_{e1} 、 pK_{e2} それぞれアルカリ側に0.2、0.3単位移行したことから、 pK_{e1} はカルボキシル基、 pK_{e2} もまたカルボキシル基と推定している。エキソ型イヌリナーゼの pK_e 値は pK_{e1} および pK_{e2} でそれぞれ4.0および6.3であり、 ΔH_e 値は pK_{e1} 、 pK_{e2} いずれも -1.5 kcal/molであり、解離に伴う荷電の変化の様式が pK_{e1} 、 pK_{e2} それぞれアルカリ側に0.5、0.4単位移行したことから、 pK_{e1} はカルボキシル基、 pK_{e2} もまたカルボキシル基と推定している。

以上の結果から両酵素と同じようにフラクタンを加水分解する本酵素のアルカリ側解離基も、 pK_e 値が高いものの、カルボキシル基の可能性が大きいと考えられる。

ReddyとMaley¹⁵⁾はconduritol B epoxideを用いて、酵母の β -フラクトフラノシダーゼの活性中心のアミノ酸残基を化学修飾することにより、酵素タンパクのN末端から23番目のアスパラギン酸残基の関与を明らかにしている。本酵素の活性解離基もカルボキシル基と予想されるため、同じくN末端付近のアスパラギン酸残基や、グルタミン酸残基の関与が期待された。そこでN末端から約30残基のアミノ酸配列を調べた¹¹⁾が、酵母の β -フラクトフラノシダーゼの活性中心に相同するようなアミノ酸配列は発見できなかった。

本酵素の反応生成物のアノマー型は ^{13}C -NMR法により β 型であると確認された。小野寺と塩見¹⁴⁾はエンドおよびエキソ型イヌリナーゼについても今回と同じ

く ^{13}C -NMR法によってアノマー型を調べ、 β 型であることを確認している。

エキソグリコシダーゼには反応の前後でアノマー型を保持するグループと反応後にアノマー型を反転するグループがあることが知られており、 α -グルカン水解酵素が詳しく調べられている。千葉⁹⁾はpHの影響や化学修飾の手法を用いて、いずれも活性中心に2つのカルボキシル基を同じく持つ α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼの水解反応の際に基質から生成する糖のアノマー型の違いを考察している。 α -グルコシダーゼは α -グルカンに作用しアノマー型を保持して α -グルコースを生成するグループの酵素であり、グルコアミラーゼは同じ基質に作用しアノマー型の反転した β -グルコースを生成するグループの酵素である。この両酵素のアノマー型の違いは水解反応の際のカルボニウムイオン中間体の C_1+ を攻撃する水分子の方向の違いであり、 α -グルコシダーゼは反応生成物が生じた同じ方向から水分子を取り込む形で反応が進むため α 型のアノマーが保持される。一方、グルコアミラーゼは反応生成物が生じた逆の方向から水分子を取り込むように反応が進むため、 β 型にアノマーを反転する。

本酵素も α -グルコシダーゼと同様に2つのカルボキシル基を持つ活性中心で基質の β 結合が切断されてフラクトシル-酵素中間体が生成し、次に反応生成物のショ糖が離脱した同じ方向から水分子がカルボニウムイオン中間体に入り込む形で反応が進むため、もう一方の反応生成物であるフラクトースのアノマー型は β 型を保持するものと思われる。

要 約

Bifidobacterium adolescentis G1 から精製したフラクトオリゴ糖に良く作用する β -フラクトシダーゼの活性中心の構造と機能を解析するために、活性解離基と反応生成物のアノマー型を推定した。低基質濃度下における速度-pH曲線より求めた $\text{p}K_e$ 値、 $\text{p}K_e$ 値の温度依存性より求めた ΔH_e 値、さらに誘電率を低下させた場合の $\text{p}K_e$ 値の変化から、酸性側必須活性解離基はカルボキシル基であると推定した。また ^{13}C -NMR法を用いた分析により、本酵素の1-kestoseから遊離されるD-フラクトフラノースのアノマー型は β 型であることが確かめられた。

参 考 文 献

- 1) Angyal, S., J. and G. S. Bethell, 1976. Conformational analysis in carbohydrate chemistry.

Aust. J. Chem., **29**: 1249-1265.

- 2) Beutler, O. H., 1984. D-Fructose, In *Methods of Enzymatic Analysis*. (H. U. Bergmeyer, ed.), pp. 321-327. Verlag Chemie, Weinheim.
- 3) 千葉誠哉, 1984. グルコアミラーゼと α -グルコシダーゼの比較. *澱粉科学*, **31**: 55-66.
- 4) Hidaka, T., T. Eida, T. Takizawa, T. Tokunaga, and Y. Tashiro, 1986. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*, **5**: 37-50.
- 5) 廣海啓太郎, 1975. 入門酵素反応速度論 (小野三郎 編集), pp. 58-81. 共立出版, 東京.
- 6) Jarrell, H. C., T. F. Conway, P. Moyna and I. C. P. Smith, 1979. Manifestation of anomeric form, ring structure and linkage in the ^{13}C -N.M.R. spectra of oligomers and polymers containing D-fructose: maltulose, isomaltulose, sucrose, leucrose, 1-kestose, nystose, inulin and grass levan. *Carbohydr. Res.*, **76**: 45-57.
- 7) Kunst, A., B. Draeger and J. Zieugenhorn, 1984. D-Glucose, In *methods of enzymatic analysis*. (H. U. Bergmeyer, ed.), pp. 163-172. Verlag Chemie, Weinheim.
- 8) Muramatsu, K., S. Onodera, M. Kikuchi and N. Shiomi, 1993. Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**: 1681-1685.
- 9) Muramatsu, K., S. Onodera, M. Kikuchi and N. Shiomi, 1994. Substrates specificity and subsite affinities of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**: 1642-1645.
- 10) Muramatsu, K., S. Onodera, M. Kikuchi and N. Shiomi, 1992. The production of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium* spp. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**: 1451-1454.
- 11) 村松 圭, 1994. *Bifidobacterium adolescentis* G1 の機能性オリゴ糖代謝に係わる β -フラクトフラノシダーゼに関する研究, 博士論文, 酪農学園大学.
- 12) 小野寺秀一, 塩見徳夫, 1988. エンド型イヌリナーゼの活性解離基の推定, *日農化誌*, **62**: 532.
- 13) 小野寺秀一, 安田 匡, 塩見徳夫, 1990. *exo*-イヌリナーゼの活性解離基の推定, *日農化誌*, **64**: 578.
- 14) 小野寺秀一, 塩見徳夫, 1989. *endo* および *exo* 型イヌリナーゼの基質特異性と生成物のアノマー型, 第12回糖質シンポジウム講演要旨集, pp. 141-142. 日本糖質学会.
- 15) Reddy, V. A. and F. Maley, 1990. Identification of an active-site residue in yeast invertase

by affinity labeling and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **265**: 10817-10820.

NMR spectra of inulooligosaccharides. *Agric. Biol. Chem.*, **54**: 215-216.

- 16) Shiomi, N. and S. Onodera, 1990. The ^{13}C -

Summary

From the value of $\text{p}K_{\text{e1}}$ and ΔH_{e} , together with the effect of a lower dielectric constant on $\text{p}K_{\text{e1}}$, the essential ionizable group 1 (acidic side) of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1 was identified to be a carboxyl group ($-\text{COO}^-$). Anomeric form of D-fructose produced by the enzyme was determined by ^{13}C -NMR method. β -Fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1 released β -D-fructofuranose from 1-kestose.