

# *Bacillus* sp. KM13 由来 Isomaltooligosaccharide 6- $\alpha$ -glucosyltransferase の構造と機能に関する研究

応用分子生物学講座 分子酵素学分野  
鐘ヶ江 倫世

(背景と目的) イソマルトオリゴ糖は glucose が  $\alpha$ -1,6 グルコシド結合で重合したオリゴ糖であり、糖質関連酵素の加水分解反応または糖転移反応により合成される。また、イソマルトオリゴ糖はプレバイオティクス効果を有するため、機能性オリゴ糖として食品や飲料などで広く利用されている。本研究室ではこれまでに *Bacillus* sp. KM13 よりイソマルトオリゴ糖に対して糖転移反応を触媒する新規酵素 Isomaltooligosaccharide 6- $\alpha$ -glucosyltransferase (I6GT) を見出した。菌体外より精製された I6GT はイソマルトオリゴ糖の非還元末端グルコシル基を受容体へ連続的に  $\alpha$ -1,6 転移し、様々な重合度のイソマルトオリゴ糖を生成した。このような反応を触媒する本酵素の機能と構造の関係は非常に興味深い。本研究では、I6GT の鎖長イソマルトオリゴ糖に対する特異性および高い糖転移活性に重要な構造因子を特定することを目的とした。

(方法および結果) *B.* sp. KM13 由来 I6GT 遺伝子のクローニングを行い、一次構造を解析した。I6GT 遺伝子は 559 のアミノ酸をコードし、推定アミノ酸配列はイソマルトオリゴ糖に対して加水分解反応を触媒する *Bacillus* 属細菌由来 oligo-1,6-glucosidase (O16G) と高い相同性を示した。得られた I6GT 遺伝子を大腸菌において発現させ、その遺伝子産物 I6GT を精製し、酵素化学的な諸性質を解析した。組換え I6GT は Native 酵素と同様の性質を示した。20 mM イソマルトペンタオース(五糖)およびイソマルトヘプタオース(七糖)に対する反応では、重合度 11-12 までのイソマルトオリゴ糖の生成が確認された。また、合成基質である *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucoside に対して極めてよく作用し、高い糖転移活性を示した。I6GT の性質を特徴付ける要因として一次構造および立体構造から  $\beta \rightarrow \alpha$  ループ 4、この上に位置する Trp221 および Phe143 に注目した。これらの領域およびアミノ酸残基を置換した変異酵素を作製し、イソマルトオリゴ糖に対する鎖長特異性および糖転移活性を野生型酵素と比較した。ループ 4 変異酵素および Trp221 変異酵素では鎖長の長いイソマルトオリゴ糖の生成が抑制され四糖以上の基質に対する特異性が低下した。Phe143 変異酵素では置換したアミノ酸の種類により糖転移活性に変化が見られた。F143N/S/W では糖転移活性が低下し、F143A/I/V では糖転移活性が上昇した。

(考察) I6GT は O16G と高い相同性を示したが、イソマルトオリゴ糖に対する反応特異性が異なり、I6GT は O16G とは異なる特徴的な構造を有すると予想された。注目した  $\beta \rightarrow \alpha$  ループ 4 に位置する Trp221 および Phe143 が糖転移活性において重要なアミノ酸残基であることが明らかになった。すなわち、受容体結合部位においてこれらのアミノ酸残基と受容体分子との強い疎水的相互作用が I6GT の高い糖転移活性に重要であると推察した。また、Phe143 の位置は置換するアミノ酸の種類により I6GT の糖転移活性を調節できると考えられる。