

Dextrin dextranase の構造と機能に関する研究 — 組換え酵素の生産系確立と活性に必須な領域の決定 —

応用分子生物学講座 分子酵素学分野
貞廣 樹里

(背景と目的) Dextrin dextranase (DDase) は、 α -1,4 結合からなるマルトオリゴ糖の非還元末端から受容体へグルコシル基の α -1,6 転移を連続的に触媒して、デキストランを生成する。DDase 産生菌は 2 種の酢酸菌しか報告されていない。我々はこれまでに *Gluconobacter oxydans* ATCC 11894 から DDase 遺伝子の単離に成功し、DDase の一次構造 (1284 アミノ酸残基) を初めて明らかにした。二次構造予測によると、3 ドメイン構造からなり、その中央ドメインは glucoamylase (GA) の触媒ドメインと類似した (α/α)₆ バレル構造を構築すると予想された。さらに GA で保存されている 2 つの触媒残基、および活性に重要な残基が DDase においても見出された。このことから、基質と生成物とで立体配座を保持する DDase が、同じマルトオリゴ糖を基質としながら立体配座を反転する GA と類似した活性部位を形成する可能性が十分考えられる。従って、DDase の反応機構および構造・機能相関を解明したい。本研究では大腸菌により組換え酵素を生産し、それを用いて活性に必須な領域を決定することを目的とした。

(方法および結果) *G. oxydans* から取得した菌体外 DDase 遺伝子を用い、大腸菌を宿主として His タグを付加した組換え DDase (rDDase) を生産した。酸性条件で rDDase は菌体から抽出されなかったが、中性付近ではよく抽出された。無細胞抽出液から Ni-キレートクロマトグラフィーにより精製 rDDase を得た。酵素活性の測定には、15 mM マルトテトラオース (G4) を基質とし、生成するマルトトリオース (G3) および 6^{IV}- α -グルコシルマルトテトラオース (IG-G4) を HPAEC-PAD で定量した。基質分解率 5% 以下、生成物濃度が直線的に増加する範囲から初速度を求めた。野生型酵素では、G3 生成速度は $1.7 \times 10^2 \text{ sec}^{-1}$ 、IG-G4 生成速度は $1.2 \times 10^2 \text{ sec}^{-1}$ であり、IG-G4 生成速度の方が低かった。IG-G4 が受容体として消費され、より重合度の高い転移生成物が生じた可能性が考えられる。N 末端または C 末端側から様々な長さでアミノ酸残基を欠失させた変異酵素の活性の有無から、N 末端および中央ドメインが活性に必須な領域であることが明らかになった。C 末端ドメイン欠失変異酵素では、G3 生成速度と IG-G4 生成速度がほぼ一致し、IG-G4 よりも重合度の高い転移生成物は生じなかった。GA とのアミノ酸配列比較から推定された DDase の触媒残基の変異酵素 E671Q および E858Q は著しい活性低下を示した。従って E671 および E858 は活性に関与する。

(考察および結論) 大腸菌による rDDase の生産および精製に成功し、G4 を基質とするより精密な初速度測定法を確立し、DDase の解析を行った。N 末端および中央ドメインが活性に必須であること、GA の触媒残基に相当する残基も活性に必須であることは、DDase が GA と類似した活性部位を形成するという予想を強く示唆した。また、C 末端ドメインは糖転移生成物の鎖長伸長に関与すると推定する。今後、GA との構造類似性を基にした変異酵素解析などにより、DDase のアノマー保持型反応を決定する要因が明らかとなる事を期待する。