

Schwanniomyces occidentalis 由来 α -glucosidase の分子酵素学的研究

—サブサイト+1 に位置するアミノ酸残基への変異導入によるグルコシド結合選択性への影響—

応用分子生物学講座 分子酵素学分野

西村 茉莉子

【背景と目的】 糖質加水分解酵素の一つである α -glucosidase は、非還元末端に α -グルコシド結合を持つマルトオリゴ糖やデンプンなどを基質とし、この α -グルコシド結合を加水分解する酵素である。また、高基質濃度などの条件下では α -グルコシド結合を合成する糖転移反応も触媒する。 α -glucosidase の加水分解反応での基質の鎖長や結合様式(α -1,2、 α -1,3、 α -1,4 および α -1,6)に対する特異性、また糖転移反応で合成する α -グルコシド結合の様式は酵素の起源によって多様である。本研究では*Schwanniomyces occidentalis* 由来 α -glucosidase (SOG) の加水分解反応および糖転移反応における α -グルコシドの結合様式への特異性に注目する。SOG はどの結合様式の α -グルコシド結合も加水分解することができるが、特に α -1,4 結合に高い特異性を示す。糖転移反応では、 α -1,4、 α -1,6 結合を特異的に合成する。この SOG に部位特異的変異を導入し α -グルコシド結合様式に対する特異性を変換することが本研究の目的である。変異部位の選定では基質結合部位のうち α -グルコシド結合の切断部位に近いサブサイト+1 に位置するアミノ酸残基に注目した。これらのうち Arg624^{SOG}、Trp324^{SOG} および Trp435^{SOG} の部位特異的変異酵素を作製し、加水分解反応や糖転移産物の特異性を調査した。特異性の評価を、加水分解反応では様々な結合様式の α -グルコシド結合の加水分解速度を測定することで、また糖転移反応では糖転移産物のメチル化分析により結合様式を決定することで行った。

【結果】 本酵素は立体構造が未解明であるので、サブサイト+1 に位置するアミノ酸残基の推定を構造既知の類縁酵素であるヒト小腸由来 maltase-glucoamylase の maltase ユニット(NtMGAM) の基質類似体との複合体構造との比較により行った。

Arg624^{SOG} は NtMGAM の Arg526^{NtMGAM} と相同である。Arg526^{NtMGAM} はサブサイト+1 を占拠する基質類似体の糖残基の水酸基の一つと水素結合を形成している。Arg624^{SOG} に変異を導入することで、変異酵素のすべての結合様式に対する加水分解活性が著しく減少した。糖転移反応では、 α -1,6 結合合成能を失い、 α -1,4 結合のみを合成するように変化した。

Trp324^{SOG} は NtMGAM では Tyr299^{NtMGAM} に相当する。Tyr299^{NtMGAM} は切断部位とサブサイト+1 を覆うように存在する。この残基はサブサイト+1 に位置するアミノ酸残基の中で唯一、類縁酵素間で保存されておらず、特異性に大きく関わっていることを予想できた。Trp324^{SOG} 変異酵素は、加水分解反応では α -1,6 結合に対する特異性が著しく低下し、糖転移反応ではそれを完全に失った。また変異酵素のうちいくつかはマルトースを基質としたときの糖転移反応において、野生型酵素ではほとんど合成されない α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-D-glucopyranose を主生成物として生産した。

Trp435^{SOG} は NtMGAM では Trp406^{NtMGAM} に相当する。Trp406^{NtMGAM} はサブサイト+1 を占める糖残基と疎水的相互作用により結合している。また、前述の Tyr299^{NtMGAM} と隣接している。Trp435^{SOG} 変異酵素は Trp324^{SOG} 変異酵素とほぼ同様の特異性を示した。また、Trp435^{SOG} 変異酵素のいくつかでは加水分解反応の至適 pH がアルカリ側に移動した。これは Trp435^{SOG} が基質結合のみではなく触媒反応にも影響を及ぼしていることを示唆する。