

Podospora anserina 由来 α -glucosidase の機能解析

応用分子生物学講座 分子酵素学分野

小林和之

(背景と目的) α -glucosidase は基質となる糖質の非還元末端の α -グルコシド結合を加水分解する酵素である。また α -glucosidase は触媒反応において水分子の代わりに糖分子などのアルコールがグルコシル基の受容体となると、糖質合成反応である糖転移反応を触媒する。生物界に広く存在する α -glucosidase は多様な分子進化を遂げており、生物起源により異なる基質特異性を示す。例えば、真菌類 *Aspergillus niger* 由来 α -glucosidase は加水分解反応では α -1,4 グルコシド結合に特異的に作用し、糖転移反応では α -1,6 グルコシド結合を生成する。一方、同じ真菌類由来でも *Acremonium implicatum* 由来 α -glucosidase (AIG) は α -1,3 グルコシド結合への高い特異性を示す。すなわち、加水分解反応では α -1,3 および α -1,4 グルコシド結合によく作用し、糖転移反応では α -1,3 および α -1,4 グルコシド結合を生成する。両酵素のアミノ酸配列は 36% の一致性を示す。それにも関わらず、異なる特異性を示すことは興味深い。しかし、これまでに α -1,3 グルコシド結合に特異性を示す α -glucosidase の機能、構造に関する報告は少ない。そこで本研究では、 α -1,3 グルコシド結合に特異性を示す新たな酵素の取得、部位特異的変異酵素作製を可能とする異種宿主発現系の構築を目的とした。

(方法と結果) α -1,3 グルコシド結合に高い特異性を持つ AIG のアミノ酸配列に一致性を示すタンパク質を検索した。最も高い一致性を示す配列は、2008 年に全ゲノム情報が解読された糸状菌 *Podospora anserina* の α -glucosidase 様タンパク質 (PAG) であり、62% の一致性を示した。PAG cDNA のクローニングを RT-PCR および RACE により行った。得られた PAG cDNA を用いて、*Pichia pastoris* による組換え酵素の生産を行った。ベクターには pGAP α A を用い、*Saccharomyces cerevisiae* の α -因子との融合タンパク質として発現させた。また、C 末端にヒスチジンタグが付加されるように発現ベクターを設計した。培養液 400 mL から 158 U、比活性 35 U/mg、4.5 mg の精製 PAG を得た。PAG は二糖類の中では、 α -1,4 グルコシド結合を有するマルトースと α -1,3 グルコシド結合を有するニゲロースに特異性を示した。また α -1,4 グルコシド結合の多糖類である可溶性デンプンにもよく作用した。そして、 α -1,4 および α -1,3 グルコシド結合以外の二糖類にはほとんど作用しなかった。糖転移反応では、薄層クロマトグラフィーおよびメチル化分析から、 α -1,4 および α -1,3 グルコシド結合を生成することが明らかとなった。

(考察) PAG は α -1,3 グルコシド結合に特異性を示す酵素であることが明らかとなった。この特異性に関する構造因子を真菌類由来の α -glucosidase のアミノ酸配列の比較により行った。基質結合に直接かかわるアミノ酸残基はすべて保存されており、その周辺の配列も保存性が高かった。しかし、基質結合に関与する Asp192 周辺が α -1,3 グルコシド結合に特異性を有する酵素では Gln-Asp-Ser のアミノ酸配列で保存されていた。そこで、Asp192 周辺のアミノ酸残基が間接的に基質特異性に関与している可能性があると考えた。