

テンサイ α -glucosidase の基質特異性の改変

応用分子生物学講座 分子酵素学分野
田上 貴祥

(背景と目的) テンサイ種子中の α -glucosidase は他の植物 α -glucosidase と比べてアミロースや可溶性デンプンなどの長鎖基質に対する特異性 (k_{cat}/K_m) が高い。可溶性デンプンに対する k_{cat}/K_m 値はマルトース(二糖類)に対する k_{cat}/K_m 値の約 90 倍である。このことからテンサイ α -glucosidase には多くの基質結合部位(サブサイト)が存在すると予想される。しかし、長鎖基質認識に関与する構造因子の知見は得られていない。本研究ではテンサイ α -glucosidase の長鎖基質認識機構の解明を目的とし、長鎖に対する基質特異性の改変を試みた。

(方法と結果) メタノール資化性酵母である *Pichia pastoris* を用いた発現システムによるテンサイ α -glucosidase の組換え酵素生産条件を検討した。メタノールにより発現誘導される *AOX1* プロモーターを用いた組換え酵素生産では高菌体濃度で 170 時間の誘導培養が必要であった。一方、恒常的に発現する *GAP* プロモーターを用いた組換え酵素生産では培養時間を 80 時間に短縮できた。また、組換え酵素の C 末端に *Histidine* タグを付加することで、Ni キレートアフィニティークロマトグラフィーにより簡便に精製できた。

得られた野生型組換え酵素は過剰な *N* 型糖鎖付加を受けていた。また、精製酵素の一部は限定分解を受けていた。マルトオリゴ糖[マルトースからマルトヘプタオース(七糖類)]、アミロースおよび可溶性デンプンに対する特異性を速度パラメーターにより評価した結果、野生型組換え酵素は種子中の α -glucosidase と同様に長鎖基質に対して高い特異性を示した。以上の結果から、*P. pastoris* 発現システムにおける翻訳後修飾はテンサイ α -glucosidase の基質特異性に影響を与えないと判断した。

類縁酵素との立体構造およびアミノ酸配列比較から、テンサイ α -glucosidase の長鎖基質認識に関与し得る芳香族アミノ酸として Phe236、Tyr740、Trp810 に注目した。これらを非芳香族アミノ酸(Ala および Ser) に置換した変異酵素を作製し、基質特異性を解析した。Tyr740 変異酵素と Trp810 変異酵素は野生型酵素と同様の基質特異性を示した。一方、Phe236 変異酵素の基質特異性が変化した。Phe236 変異酵素のマルトースに対する k_{cat}/K_m は野生型酵素の値と同等であったのに対し、三糖類以上の基質に対する k_{cat}/K_m は 15 – 30% に減少した。Phe236 への変異導入により、アミロースや可溶性デンプンとの結合が約 1 kcal mol⁻¹ 不安定化していた。以上の結果から、Phe236 はテンサイ α -glucosidase において長鎖基質との結合を担う重要なアミノ酸残基であると判断された。野生型酵素と Phe236 変異酵素のサブサイト親和力を算出した結果、テンサイ α -glucosidase には少なくともサブサイトが 7 つ(サブサイト-1 から+6) 存在することが明らかとなった。野生型酵素と比べ、Phe236 変異酵素ではサブサイト+2 および+3 の親和力の低下がみられた。以上の結果は、Phe236 がサブサイト+2 および+3 を形成し、長鎖基質の捕捉に寄与するアミノ酸残基であることを示している。