

アノマー反転型加水分解酵素変異体のオリゴ糖合成反応 に関する研究

応用分子生物学講座 分子酵素学分野
牧 孝多朗

(背景と目的) 大腸菌由来トレハラーゼ TreA は α , α -トレハロース [α -Glc-(1 \leftrightarrow 1)- α -Glc] を加水分解し、 β -グルコースを生成するアノマー反転型加水分解酵素である。一方、本酵素は本来の基質とは逆アノマー型の β -グルコシルフルオリド (β -GF) に対しては、 α -グルコースを受容体として、縮合反応によりトレハロースを合成する。しかし、合成されたトレハロースは通常の加水分解の基質となり、ほとんど蓄積されない。塩基触媒変異体 E496Q は加水分解活性を保持しないため、縮合反応によりトレハロースを蓄積させるが、同時に縮合活性も著しく低下しており、トレハロースの蓄積も野性型より多いとはいえ僅かである。本研究では縮合反応による効率的なトレハロース合成、すなわち加水分解活性は持たず、縮合活性は保持した TreA 変異体の作製を目的とした。また α -グルコース以外の受容体を用いて、トレハロース以外のオリゴ糖合成も試みた。

(方法および結果) TreA の立体構造情報をもとに、触媒部位で形成される水素結合ネットワーク [Asp160-トレハロース-触媒水-塩基触媒基 (Glu496)-Tyr512] に変化を与えることで、触媒水および Glu496 の位置または配向が変化し、加水分解活性を抑制できると期待した。そこで Asp160 および Tyr512 に部位特異的変異導入を行い D160N と Y512F を作製した。 β -GF および α -グルコースからの縮合反応において、両酵素は野性型および E496Q と比較して、顕著にトレハロースを合成、蓄積した。D160N と Y512F は、トレハロースの加水分解に対する縮合反応の速度 (k_{cat}) 比がそれぞれ 180 および 71 (野性型 : 0.12, E496Q : 0.67) であり、縮合反応をよく触媒する酵素であることが明らかとなった。またトレハロース加水分解の pH 活性曲線の解析から、D160N は野性型と比較して、塩基触媒基の pK_a を表す pK_{e1} が 4pH 単位と大きく増加し、Y512F では pK_{e1} が消失した。

β -GF と様々な糖を用いて縮合反応を試みた結果、Y512F はキシロースを、D160N はキシロースおよびガラクトースを受容体として、それぞれトレハロースとは異なるオリゴ糖を合成した。これら合成されたオリゴ糖は、野性型酵素による加水分解を受け、グルコースを遊離した。

(考察) D160N と Y512F は pK_{e1} が大きく変化し、Glu496 のプロトン化が安定化された。縮合反応には Glu496 のプロトン化が必要であるが、この安定化によって両酵素は縮合反応をよく触媒する酵素になったと考える。

β -GF とキシロース (またはガラクトース) から合成されたオリゴ糖は、野性型が作用できることから、グルコースとキシロース (またはガラクトース) が α , α 結合した 2 糖であると推察する。