

## 加水分解反応の抑制により縮合反応生成物を蓄積させる アノマー反転型酵素変異体に関する研究

応用分子生物学講座 分子酵素学分野  
砂守 このみ

(背景と方法)糖質は、構成糖および結合様式などの多様性から著しく多種多様であり、多くの未知機能の発見が期待される。従って、機能的なグリコシド形成反応の確立が求められている。本研究では、アノマー反転型糖質分解酵素の逆反応、すなわち縮合反応に注目した。反応の平衡は、特に加水分解酵素では著しく分解側に片寄っており、高濃度の基質を用いても縮合反応生成物の収量は低い。フッ化糖を用いると縮合反応の効率は上がるが、生成物は“本来の酵素活性”により直ちに分解され蓄積しない。本研究では、3種のアノマー反転型酵素 *Clostridium thermoamylolyticum* グルコアミラーゼ (CtGA)、*Agrobacterium tumefaciens* グルコアミラーゼ (AtGA) および *Lactobacillus johnsonii* マルトースホスホリラーゼ (LjMP) を用いた。いずれも、マルトオリゴ糖の非還元末端 $\alpha$ -グルコシド結合に作用して、それぞれ加水分解または加リン酸分解により、 $\beta$ -グルコースまたは $\beta$ -グルコース 1 リン酸を生成する。これらの酵素から分解活性を抑制しながら縮合反応を触媒する変異酵素の作製を行った。また、様々な糖を縮合反応の受容体基質として用いて、糖の合成を行った。

(方法と結果)縮合反応の基質に $\beta$ -グルコシルフルオリド ( $\beta$ -GF)とグルコースまたはマルトースを用い、生成物を TLC で分析した。LjMP は、リン酸なしには加リン酸分解を触媒せず、効率的に縮合生成物を蓄積した。またグルコアミラーゼでは、いずれもわずかにしか縮合生成物を蓄積しなかったが、縮合反応による $\beta$ -GF 減少が特に CtGA で顕著に認められた。そこで、既知のグルコアミラーゼ立体構造情報をもとに推定した CtGA の一般塩基触媒残基およびその周辺のアミノ酸残基に変異を導入し、酵素変異体 7 種を作製した。野生型と変異体酵素の加水分解活性はマルトトリオースまたはパノースを基質とし、遊離するグルコースの測定により算出した。縮合活性は $\beta$ -GF から遊離するフッ化物イオンの測定により算出した。縮合生成物は TLC および HPAEC-PAD により定量、解析した。CtGA は $\beta$ -GF とマルトースを基質とすると、縮合反応によりマルトトリオースとパノースを合成した。塩基触媒変異体(E661Q)では、加水分解活性と縮合活性が著しく低下したため、生成物の蓄積は確認できなかった。それに対し、塩基触媒周辺のアミノ酸残基変異体のうち 4 種では、加水分解活性は低下し、縮合活性が残存したために、縮合生成物が顕著に蓄積した。また、様々な受容体基質を用いた反応では、用いた 7 種の糖全てが縮合反応に利用され、糖を合成した。

(考察)CtGA における変異体酵素は野生型と比較して、各反応の速度および生成物の収率から、加水分解活性が低下し縮合反応の活性が残存した。これは、酵素の触媒部位で形成される水素結合ネットワークに変化が生じ、基質、塩基触媒残基、触媒水の位置や配向など、加水分解活性に重要な要素に影響を与えたためと考える。さらに、多種の受容体基質からオリゴ糖を合成したことから、本酵素の縮合反応における広い基質特異性が示唆された。