

# *Bacillus cereus* 由来 Oligo-1,6-glucosidase の 塩化物イオン依存型への改変

応用分子生物学講座 分子酵素学分野  
寺田 智明

(背景と目的) 糖質加水分解酵素は一次構造の類似性から glycoside hydrolase (GH) family に分類される. *Bacillus cereus* 由来 oligo-1,6-glucosidase (O16G) を含め, GH family 13 に属する多くの酵素は塩化物イオン (Cl<sup>-</sup>) 非依存型であり, 活性に Cl<sup>-</sup> を必要としない. しかし, ブタ膵臓  $\alpha$ -amylase (PPA) など, GH family 13 に属する一部の酵素は Cl<sup>-</sup> 依存型であり, 活性の発現に Cl<sup>-</sup> を必須とする. これら Cl<sup>-</sup> 依存型酵素において, Cl<sup>-</sup> は活性中心近傍の R195, N298 および R337 (PPA のアミノ酸番号) により保持される. これらのうち, R337 に相当する塩基性アミノ酸残基が Cl<sup>-</sup> 依存性の発現に重要であるとされている. このように, Cl<sup>-</sup> 依存性に重要なアミノ酸残基が推定されているにも関わらず, これまでに非依存型酵素の Cl<sup>-</sup> 依存型への改変は成功していない. このことは Cl<sup>-</sup> 依存性に他の必要要因が存在することを示唆する. 本研究では, Cl<sup>-</sup> 非依存型酵素である O16G に部位特異的変異を導入し, Cl<sup>-</sup> 依存型に改変した. また, 改変酵素の酵素化学的性質に与える Cl<sup>-</sup> の影響を解析した.

(方法と結果) Cl<sup>-</sup> 依存型酵素と非依存型酵素のアミノ酸配列の比較から, Cl<sup>-</sup> 結合部位近傍に存在する His, Gln および Arg が Cl<sup>-</sup> 依存性の発現に重要であると推測した. これらのアミノ酸を O16G の該当部位に導入した変異体 (Q13H, W49Q, Y363R およびこれらを組み合わせた変異体) を作製し, NaCl 濃度の反応速度に与える影響を解析した. Y363R 変異を含む変異体は NaCl 非存在下で野生型比 0.2% 以下の活性を示した. しかし, NaCl 濃度依存的に活性が増加し, 最大で NaCl 非存在下の 50-360 倍に達した. このことから, O16G の Cl<sup>-</sup> 依存型への改変には Y363R の導入が必須であることが示された. また, Y363R 変異を含む変異体の中で三重変異体 (Q13H/W49Q/Y363R) は最大の活性を示し, かつ低濃度の NaCl (600 mM) で活性の増加が飽和した. この結果から, Q13H および W49Q の導入は, より低い Cl<sup>-</sup> 濃度で高い活性を示すために重要であることが示された. 三重変異体において, Arg363 は Cl<sup>-</sup> との結合に直接関与し, His13 および Gln49 は Arg363 側鎖を Cl<sup>-</sup> 結合に適した向きに配向させる機能を持つと考察した.

三重変異体の各種塩濃度依存性を解析した. 三重変異体は KCl により NaCl と同程度に活性化されたことから, 陰イオンによる活性化が示された. また, 既報の Cl<sup>-</sup> 依存型  $\alpha$ -amylase と同様に, 様々な陰イオン (Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> および N<sub>3</sub><sup>-</sup>) により異なる度合いで活性化された (陰イオン非存在下の 8.1-160 倍). これらの陰イオンは Cl<sup>-</sup> と同じ空間位置に保持され, 酵素を活性化すると推察した.

Cl<sup>-</sup> 依存型酵素の Cl<sup>-</sup> 活性化機構に関する反応速度式を導き, 実験値が理論式に従うかを解析した. 三重変異体の各基質濃度および各 Cl<sup>-</sup> 濃度における反応速度は理論式に良好に回帰し, 本活性化モデルが理論的に支持された. 得られた速度パラメーターから, 三重変異体の pNPG に対する特異性 ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) は Cl<sup>-</sup> 結合により 650 倍に増加することが示された.