

Streptococcus mutans 由来 dextran glucosidase(DexB)の 糖転移活性に影響を与える構造に関する研究

生物資源科学講座 分子酵素学分野
中塚 大地

(背景と目的) *Streptococcus mutans* 由来 dextran glucosidase(DexB)はイソマルトオリゴ糖(IGn)に作用し、非還元末端グルコースを加水分解により遊離、あるいは糖転移反応によりアクセプター分子に転移し、 α -1,6 グルコシド結合を形成する。DexBはGHファミリー13酵素の中で比較的高い糖転移活性をもつ。様々な糖鎖を酵素合成する上で、長鎖基質に対し活性をもつ DexB の糖転移活性は興味深い。本研究は、DexB の糖転移活性に重要な構造因子の決定を目的とした。

(方法) アクセプター基質の認識に関わる Ile138 および Trp238、Trp238 の分子内部側に存在する Phe262、そして活性ポケット入口を形成する Val208 および Ser209 を他のアミノ酸に置換した部位特異的変異酵素を作製した。変異酵素によるIGnからの反応生成物を HPAEC-PAD により定量し、全反応速度(v_{ag})に対する糖転移反応速度の比である糖転移率を算出した。また、DexB と isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyltransferase(I6GT)とのキメラ酵素(I6GT の 1-277 + DexB の 260-536)を作製し、キメラ酵素の糖転移活性を評価した。

(結果) 野生型酵素(WT)の 12 mM IG2 に対する v_{ag} および糖転移率はそれぞれ 305 sec^{-1} および 25.9%であった。各種変異酵素の 12 mM IG2 に対する v_{ag} および糖転移率を WT のものと比較する。I138A/S/D/N/F/H/W は v_{ag} が 1.8-4 倍に上昇したが、糖転移率が 0-0.3 倍に低下した。W238G/V/S/D/F は v_{ag} および糖転移率がそれぞれ 0.1-0.4 倍および 0.3-0.6 倍に低下した。F262A/Y/H は v_{ag} が 0.01-0.03 倍に低下したが、糖転移率が 2-3 倍に上昇した。一方、F262Y/H-W238A はともに v_{ag} および糖転移率がそれぞれ 0.001 倍および 0.04 倍に低下した。V208R は v_{ag} が 0.6 倍に低下し、糖転移率が 1.6 倍に上昇した。S209E は v_{ag} および糖転移率がそれぞれ 0.7 倍および 0.4 倍に低下した。DexB-I6GT キメラ酵素の IG2-IG6 に対する v_{ag} は DexB および I6GT より低下した。一方、糖転移率は IG2-4 で約 30%、IG5 および IG6 でそれぞれ約 20%および約 10%となり I6GT よりも低い値を示した。

(考察) Ile138 および Trp238 は変異導入により主に糖転移率が大きく低下することがわかり、DexB の糖転移活性に重要である。Phe262 は変異導入により糖転移率を大きく上昇させたが、F262Y/H-W238A の糖転移率は低下し、従って Phe262 は Trp238 を介し糖転移活性に影響を与えられとされる。V208R および S209E は IG2 の v_{ag} と糖転移率に影響を与えたことから、この位置のアミノ酸残基はアクセプター基質の認識に影響を与えられとされる。DexB-I6GT キメラ酵素(I6GT の 1-277 + DexB の 260-536) は I6GT 様のサブサイトプラス側の構造をもつと推察できるが、IG2-IG6 の糖転移率が DexB と同様であったことから、サブサイトプラス側を構成するアミノ酸残基以外にも I6GT の高い糖転移活性に重要な構造因子が存在することが示唆された。