

Bacillus sp. KM13 由来 Isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyltransferase の酵素化学的解析と変異酵素を用いた基質特異性に関する研究

応用分子生物学講座 分子酵素学研究室
西村 崇志

(背景と目的)

イソマルトオリゴ糖(IGn)は glucose が α -1,6 グルコシド結合で重合したオリゴ糖である。IGn は糖質関連酵素の加水分解反応または糖転移反応により合成され、機能的オリゴ糖として利用されている。本研究で主題とする *Bacillus* sp. KM13 由来 isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyltransferase (I6GT) は、IGn に作用し、非還元末端のグルコシル基を他の IGn 分子の非還元末端に α -1,6 転移する「連続糖転移反応」を主に触媒する。I6GT はリガンドフリーの立体構造が解明されており、 α -amylase と類似の触媒中心を持つ。本研究では、野生型酵素の IGn に対する鎖長特異性および変異酵素を用いた基質認識メカニズムの解明を行った。

(方法および結果)

I6GT 野生型酵素(WT)を大腸菌で生産し、精製して使用した。I6GT を IGn ($n=2-6$) と反応させ、生成した IG $n+1$ 、IG $n-1$ および glucose を HPAEC-PAD により定量した。 V_{max}/K_m 値は鎖長に依存して増加し、IG4 に対して最大を示した。また、糖転移率(転移速度と水解速度の和に対する転移速度の比率)は IG3 に対して最大を示した。

I6GT の基質結合モデルから、サブサイト+1 において Val200, Lys292 および Glu386 が IGn との結合に関与すると予想された。これら 3 残基を Ala に置換した一重変異酵素 3 種および 3 残基全てを Ala に置換した三重変異酵素を調製し、4 mM の各種二糖(trehalose, kojibiose, nigerose, maltose, sucrose および IG2)に対する速度を WT と比較した。IG2 に対する速度は、全ての変異酵素で低下した(V200A, 10%; K292A, 0.03%; E386A および三重変異酵素, 0.07%)。一方、IG2 以外の二糖に対する速度は V200A および三重変異酵素で大きく上昇した(V200A, 12-240 倍; 三重変異酵素, 5-100 倍)。

三重変異酵素は二糖に対しては α -1,6 結合(IG2)特異性を低下させたが、IG3 および IG4 に対する反応速度は鎖長に依存して大きく上昇した。そこで、サブサイト+3 において IGn との結合が予想される Trp221 に注目した。三重変異酵素に W221A の変異を導入した四重変異酵素では IG3 および IG4 に対する速度の上昇は見られなかった。すなわち、Trp221 は IGn 特異性を欠失させた三重変異酵素においても IGn ($n \geq 3$)に対する親和性に寄与することが明らかになった。

(考察及び結論)

IGn に対する鎖長特異性の結果から I6GT の活性部位はサブサイト-1~+3 により形成されると推定した。また、既知構造と合わせて、I6GT の α -1,6 結合認識はサブサイト+1 および+3 によると判断された。すなわち、サブサイト+1 においては、Val200 が疎水性相互作用、Lys292 および Glu386 が水素結合により IGn を認識し、サブサイト+3 においては、Trp221 がスタッキング効果により IGn と結合すると考えられる。