

ホタテガイ中腸腺由来 α -glucosidase (*Patinopecton yessoensis*) の精製と酵素化学的性質の検討

応用分子生物化学講座 分子酵素学分野
梶田 安志

【背景と目的】糖質加水分解酵素は自然界に広く分布し、多糖、オリゴ糖、配糖体のグリコシド結合を分解する。また、その一次構造の類似性に基づき glycoside hydrolase (GH) family に分類されている。糖質加水分解酵素の1つである α -glucosidase は基質となる糖質の非還元末端の α -グリコシド結合を加水分解し、 α -glucose を遊離する酵素である。 α -glucosidase は生物界に広く分布するが、海洋生物由来 α -glucosidase に関する知見は非常に少ない。したがって、海洋生物には未知の機能を持つ酵素が存在する可能性がある。本研究では、ホタテガイの消化器官である中腸腺に存在する α -glucosidase (PYG) の精製方法を確立し、PYG の酵素化学的性質を解析した。

【方法と結果】 α -glucosidase の阻害剤として働く acarbose をリガンドとする担体を作製し、本担体を用いて PYG の精製を試みた。ホタテガイ中腸腺から、アカボースアフィニティークロマトグラフィーを含む各種クロマト法により分子量 50,800 の PYG を精製した。各種金属塩に対する PYG の反応速度の変化を調べた。PYG は Cl イオンによって反応速度が上昇する α -glucosidase であることがわかった。Cl イオン非存在下の 0.2% (w/v) maltose 分解速度は 13.1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であったが、300 mM Cl イオン添加により maltose 分解速度は 122 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ となり、9.8 倍に上昇した。Cl イオン非存在下と 300 mM Cl イオン存在下における PYG の各種基質 [maltose から maltooctaose のマルトオリゴ糖, amylose ($\overline{DP} = 18$), kojibiose および nigerose] に対する加水分解速度パラメーター (V_{max}/K_m) を求めた。PYG は、Cl イオン非存在下では maltooctaose に対して最も高い V_{max}/K_m 値 57.1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{mM}$ を示し、重合度が小さくなるに従って V_{max}/K_m 値が減少した。一方、300 mM Cl イオン存在下では maltotriose に対し最も高い V_{max}/K_m 値 370 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{mM}$ を示し、Cl イオン非存在下とは逆に重合度が大きくなるに伴い V_{max}/K_m 値が減少した。また、PYG の内部アミノ酸配列を解析した。PYG は GH family 13 と 77 に属する酵素と類似した配列を有することがわかった。

【考察】acarbose をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーを PYG の単離に用いることにより精製過程を飛躍的に簡略化することを可能とした。酵素化学的性質の解析より、PYG は Cl イオンにより反応速度が上昇し、基質特異性が変化する α -glucosidase であることを明らかにした。現在のところ、Cl イオンによって活性化し、基質特異性が変化する α -glucosidase の報告はなく、PYG はその性質が Cl イオン依存性を示す新規の α -glucosidase であると言える。GH family 13 には Cl イオン依存性を示す α -amylase が含まれている。立体構造解析や速度論的解析によりそれらの Cl イオン依存の機構が示されている。GH family 13 の酵素と配列類似性を持つ PYG は同様の機構により、Cl イオン依存性を示す可能性がある。