

Bacteroides thetaiotaomicron 由来 glycoside hydrolase family 97 glucoamylase の Ca^{2+} 依存型触媒機構の解析

応用分子生物学講座 分子酵素学分野
吉田 拓弥

【背景と目的】 *Bacteroides thetaiotaomicron* 由来 glycoside hydrolase family 97 glucoamylase は非還元末端に位置する α -glucoside 結合の加水分解を触媒する。本 glucoamylase の活性中心には Ca^{2+} が存在し、 Ca^{2+} には触媒アミノ酸残基や family 内で高度に保存されているアミノ酸残基が配位結合している。また拮抗阻害剤であるアカボースとの複合体構造中では、 Ca^{2+} はアカボースの擬似グルコシド窒素原子や水酸基とも配位している。本研究ではこの Ca^{2+} の触媒機構への役割を調べることを目的とした。

【方法と結果】 野生型酵素の反応速度の Ca^{2+} 依存性、EDTA 存在下・ Ca^{2+} 存在下での物理的性質、基質特異性、反応速度の pH 依存性を解析した。また Ca^{2+} と配位結合しているアミノ酸残基の点変異酵素を作製し、同様の解析を行った。さらに EDTA 存在下で野生型酵素を結晶化し、X 線構造解析を行った。

EDTA 存在下での野生型酵素の比活性は、 Ca^{2+} 存在下でのそれと比較し 8% に減少し、温度安定性は 5°C 低下した。EDTA 存在下での *p*-nitrophenyl α -glucoside (pNPG) 加水分解の k_{cat}/K_m は Ca^{2+} 存在下のその 16.6% に減少した。EDTA 存在下では maltose、maltotriose および kojibiose 加水分解速度の低下が著しく、それぞれ Ca^{2+} 存在下の、1/140,000、1/80,000 および 1/45,000 に低下した。EDTA 存在下での反応速度-pH 曲線はアルカリ側に移動し、特に酸性側の $\text{p}K_e$ の変化が大きく、3.4 単位アルカリ側へ移動した。

変異酵素 E194A の Ca^{2+} 濃度の上昇に伴う反応速度の上昇は野生型酵素と比較して緩やかであり、反応速度が極大値に達するために野生型酵素の場合の 160 倍の Ca^{2+} 濃度を必要とした。E194A ではマルトオリゴ糖に対する加水分解能が著しく低下しており、pNPG、maltose および maltotriose 加水分解反応に対する k_{cat}/K_m はそれぞれ野生型酵素の 1/17、1/200 および 1/190 であった。変異酵素 E526Q では反応速度の pH 依存性が野生型酵素と比べ変化していた。すなわち EDTA 存在下における反応速度-pH 曲線が酸性側に移動し、酸性側とアルカリ側の $\text{p}K_e$ 値がそれぞれ 3.5 単位および 1.5 単位酸性側へ移動した。

X 線構造解析の結果、EDTA 存在下の野生型酵素は、 Ca^{2+} 結合部位に Na^+ を有していることが分かった。 Na^+ に配位しているアミノ酸残基の側鎖の向きに変化は見られなかったが、配位している水分子のひとつが Ca^{2+} 存在下と比較して 1.6 Å 離れた位置に確認された。

【考察及び結論】 本酵素における Ca^{2+} の触媒機構への役割は、①一般塩基触媒の機能を高めること。②ルイス酸として機能し、基質の解離を促進させること。であると考えられる。E194 はサブサイト+1 における基質との結合および Ca^{2+} の結合に重要であると考えられる。E526 は一般酸触媒残基の $\text{p}K_a$ を高めることで一般酸触媒が触媒反応に適した状態を維持する役割を有すると考えられる。