

Streptococcus mutans 由来 dextran glucosidase の water path および Ca²⁺結合サイトの機能と構造に関する研究

応用分子生物学講座 分子酵素学分野
小林 桃子

(背景と目的)

本研究は *Streptococcus mutans* 由来 dextran glucosidase (SmDG) という糖質加水分解酵素を用いて類縁酵素群への新たな知見を得ることを目的とした。SmDG は α -1,6 グルコシド結合の加水分解を主反応として行う一方、糖転移反応も触媒する酵素である。これまでに詳しく機能のわかっていない 2 つの構造、すなわち water path と Ca²⁺結合サイトに着目した。Water path は活性ポケットから裏側の酵素表面にかけて 3 つの水分子が一行に並んだ構造を指す。また SmDG 結晶中には 3 つの Ca²⁺が見られる。その内の 1 つの触媒ドメインを構成する $\beta \rightarrow \alpha$ loop 1 上の Ca²⁺は 5 つのアミノ酸残基と相互作用しており、堅固な結合をしていると考えられる。

(方法)

Water path 構成残基の一残基変異体 Y15W, I370F および R402W/H を作製し機能解析を行った。さらに Y15W および R402W に対して蒸気拡散法による結晶化および X 線結晶構造解析を行った。また 3 つの Ca²⁺と相互作用するアミノ酸残基の一残基変異体をそれぞれ作製した。 $\beta \rightarrow \alpha$ loop 1 上の Ca²⁺と相互作用する N23 を S/V, D25 を E/I/S にそれぞれ置換した変異体を作製し、その他の 2 箇所については D151L および D419L を作製した。野生型およびこれらの変異体に対して酵素活性および示差走査熱量計 (DSC) を用いた測定を行い SmDG の pH および熱安定性に対する Ca²⁺の影響を調べた。

(結果)

すべての water path 変異体は野生型に比べ反応速度の低下および糖転移率の上昇を示した。Y15W および R402W の立体構造をそれぞれ 1.8 Å, 2.4 Å の分解能で構造決定した。Y15W および R402W の触媒残基や基質結合に関与する残基の配向は野生型と同様であり、water path およびその周辺の水分子の位置と数のみに変化が見られた。また野生型および Ca²⁺と相互作用するアミノ酸残基変異体に対する Ca²⁺の影響を酵素活性および DSC により測定した結果、3 つの Ca²⁺のうち $\beta \rightarrow \alpha$ loop 1 上の Ca²⁺結合サイトが SmDG の pH および熱安定性の増加に寄与することがわかった。

(考察及び結論)

Water path 変異体の解析結果から、基質進入および生成物解離時に water path を介した水分子の流出・流入があると推測した。また野生型および Ca²⁺と相互作用するアミノ酸残基変異体の熱安定性解析から、 $\beta \rightarrow \alpha$ loop 1 上の Ca²⁺結合サイトは SmDG の 2 段階の熱変性過程に関与することが考察された。

Water path および $\beta \rightarrow \alpha$ loop 1 上の Ca²⁺結合サイトは類縁酵素群で保存された構造であり、本研究で推察および証明したそれぞれの機能は類縁酵素群全体で保存されていることが示唆される。