

Bacillus circulans T-3040 由来
cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase の
生成物特異性に寄与する構造と反応条件に関する研究

応用分子生物学講座 分子酵素学分野
齊藤 みどり

【背景と目的】 環状イソマルトオリゴ糖(CI-n, nは重合度)は, グルコースが α -1,6 結合で環状に結合したオリゴ糖で, 包接能および抗う蝕能を持つ. *Bacillus circulans* T-3040 の菌体外酵素である cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase (CITase) はデキストラン, イソマルトオリゴ糖, CI-n 等に作用し, 環状化反応, 加水分解反応, カップリング反応および不均化反応を触媒する. 本酵素の立体構造は既に解析されており, (β/α)₈ バレル構造の触媒ドメインをもつ. 野生型酵素はデキストランに作用すると, 主に環状化反応を触媒し, CI-8 を主生成物とする. 加水分解反応も触媒し, 直鎖状還元糖を生成する. 本研究では, 本酵素のより詳細な機能解明を目的として, 反応速度の反応条件依存性の解析および生成物特異性に寄与する構造の探索を行った.

【方法】 dextran 40 を基質としたとき環状化反応により生成した CI-7-12 を HPAEC-PAD を用いて定量し, 各生成速度を求めた. CI-7-12 の生成速度の合計を環状化反応速度とした. 加水分解反応により生成した還元糖を copper-bicinchoninate 法に従って定量し, 還元糖増加速度を求めた. これを加水分解反応速度とした. 環状化反応速度と加水分解反応速度の和における環状化反応速度の割合を, 環状化反応速度比率とした. 野生型酵素の反応速度を様々な pH, 温度および基質濃度において測定した. また, (β/α)₈ バレル構造の $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 2 先端部(Asp167-Glu172)に着目し, この領域を *Streptococcus mutans* 由来 dextranase 型に置換した変異体(L2Dex)および Asp167-Asn170 を欠失した変異体(Δ L2)を作製し, 酵素化学的諸性質を解析した.

【結果】 野生型酵素は, 環状化反応と加水分解反応とで異なる pH 依存性を示した. 環状化反応速度比率は pH の上昇に伴い上昇する傾向が見られた. 各反応速度は反応温度の上昇に伴い上昇した. 加水分解反応の活性化エネルギーは環状化反応の活性化エネルギーより高く, 反応温度の上昇に伴い, これらの反応速度の差は小さくなった. 各反応速度は基質濃度の上昇に伴い上昇した. 環状化反応速度比率も基質濃度の上昇に伴い上昇したが, 0.125 mM 以上ではほぼ一定となった. L2Dex および Δ L2 はともに, 安定性および反応速度が野生型酵素より低下した. しかし, L2Dex および Δ L2 での環状化反応および加水分解反応の速度変化は一樣ではなく, 各反応速度の比率ならびに生成物は大きく変化した. すなわち, L2Dex では加水分解反応速度の比率が上昇し, CI-7-12 の生成速度は一樣となった. 一方, Δ L2 では環状化反応速度の比率が上昇し, 野生型酵素と同様に CI-8 を最も高い速度で生成した.

【考察および結論】 野生型酵素では, pH, 温度等の反応条件により環状化反応速度と加水分解反応速度の比率が変化することが示された. また, $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 2 の改変により環状化反応速度比率が変化したことから, この部分も反応比率の決定に関与すると考えられる. Δ L2 と野生型酵素は CI-8 生成速度が最も高く, L2Dex では CI-7-12 生成速度が同程度だったことから, $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 2 は触媒部位からサブサイト-8 までの基質の適切な結合を補助することで CI-8 の優先的生成に寄与すると考えられる.