

Bacteroides thetaiotaomicron 由来 α -galactosidase の 求核残基変異酵素が触媒する糖転移反応の解析

応用分子生物学講座 分子酵素学分野
渡辺 健一

(背景と目的)

α -ガラクトシルオリゴ糖 (α -GOS) は経口投与による制がん効果・免疫賦活効果など重要な生理機能を持つことが報告されている。しかし、 α -GOS の安価な大量生産技術は開発されていない。一般的にオリゴ糖の酵素合成に用いられる酵素として、糖転移酵素・糖質加リン酸分解酵素・糖質加水分解酵素の 3 つが知られている。糖転移酵素は基質が非常に高価である・酵素が不安定であるために実用的ではない。糖質加リン酸分解酵素は α -ガラクトシドに作用するものが見つかっておらず、 α -GOS の合成には利用できない。本研究では非還元末端の α -ガラクトシドを加水分解する *Bacteroides thetaiotaomicron* 由来 α -galactosidase の糖転移反応を利用し、 α -GOS の合成を行った。糖質加水分解酵素の糖転移反応を利用するオリゴ糖合成では、生成物も酵素の基質となるために生成物の収率を上げるのが難しい。本研究において加水分解反応を失った求核触媒残基変異 α -galactosidase (D415G) が外用求核性試薬存在下で、 α -ガラクトシルフルオリド (α -GalF) を供与体、単糖・二糖類を受容体として α -GOS を高収率で合成できることを発見した。この糖転移反応によって α -GOS を生成し、その構造ならびに収率について解析した。また、この糖転移反応の速度論的解析を行った。

(方法と結果)

まず、D415G の糖転移反応を相補する外用求核性試薬を検討した。 α -GalF を供与体、ラクトース (Lac) を受容体として、各種外用求核性試薬を用いた場合の生成物を TLC および HPAEC-PAD で解析した。ギ酸ナトリウムを用いた場合には糖転移産物の生成を確認できた。一方、アジ化ナトリウム・酢酸ナトリウム・フッ化カリウムを用いた場合には糖転移産物はほとんど生成されなかった。以上の結果から D415G の糖転移反応を相補する外用求核性試薬としてはギ酸ナトリウムが最も優れていることがわかった。次に、ギ酸ナトリウム存在下で α -GalF を供与体、各種単糖・二糖類を受容体とした際の生成物を TLC で解析した。Lac の他にグルコース (Glc)・キシロース (Xyl)・マルトース (Mal)・セロビオース (Cel) を受容体として糖転移産物を生成した。一方、フルクトース・マンノース・ガラクトース・タロース・スクロースを用いた場合には糖転移産物は生成されなかった。HPAEC-PAD 分析により受容体消費を定量することで生成物の収率を算出した。Glc・Cel を受容体とした際は収率 75%、Xyl・Lac・Mal を受容体とした際は収率 90%で糖転移産物を生成した。HPLC を用いて糖転移産物を単離精製し、ESI-MS 分析および NMR 分析を用いて構造解析を行った。Glc・Lac・Mal・Cel を受容体とした際の主産物は α , β -1,1 結合の非還元糖、Xyl を受容体とした際の主産物は α -1,4 結合の還元糖であり、いずれも新規の α -GOS であることがわかった。最後にギ酸ナトリウム存在下で D415G が触媒する糖転移反応を速度論的に解析した。反応速度をフッ化物イオンの遊離速度から求めた。ギ酸ナトリウムならびに供与体飽和条件における α -GalF 分解反応速度の各種受容体濃度依存性を解析した。反応速度パラメータの比較から、 α -galactosidase の受容体結合部位は Cel > Lac > Xyl > Mal > Glc の順に高い特異性を示すことがわかった。