

Bacillus sp. KM13 由来 Isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyltransferase の 長鎖基質結合に関与する構造の解析と 変異酵素を用いたイソマルトメガロ糖の合成に関する研究

応用分子生物学講座 分子酵素学分野
青山 泰

(背景と目的) *Bacillus* 属 KM13 株の新規糖転移酵素 isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyltransferase (I6GT) は, α -1,6 グルコシド結合からなるオリゴ糖 (イソマルトオリゴ糖: IGn, n= 2-9) を基質とし, 非還元末端側のグルコシル基を他の IGn へ α -1,6 転移する反応 (α -1,6 グルコシル転移反応) を触媒する. また, グルコースを遊離する加水分解反応も触媒する. I6GT の触媒ドメインは (β/α)₈ バレル構造からなり, ポケット型の活性中心をもつ. I6GT の Trp221 は活性ポケット入口に位置し, 長鎖基質との結合に重要なアミノ酸である. Trp221 の対面には, (β/α)₈ バレル構造の $\beta \rightarrow \alpha$ loop 6 が位置し, 活性ポケット入口に張り出している. 本研究では, $\beta \rightarrow \alpha$ loop 6 が長鎖基質との結合にどのように関与するかを解析した. また, 活性ポケットの内部を改変した酵素 V200A/C255T (AT) は, スクロースから他の分子への α -1,6 グルコシル転移反応を触媒する. AT の $\beta \rightarrow \alpha$ loop 6 を改変し, スクロースおよび長鎖イソマルトオリゴ糖に対する転移反応を解析した.

(方法および結果) $\beta \rightarrow \alpha$ loop 6 は, 活性ポケット入口に張り出すため, 長鎖基質との結合を妨げる構造であると予想した. $\beta \rightarrow \alpha$ loop 6 を短くした変異酵素 del6 を作製し, 長鎖基質との結合に与える影響を解析した. del6 の比活性は野生型酵素 (WT) の 55 分の 1 に低下したが, 長鎖基質に対する特異性は上昇した. 特に IG5 に対する特異性が上昇した. また, WT は IG3 に対する転移反応をよく触媒したのに対し, del6 では IG4 に対する反応をよく触媒した. これらの結果は, WT と比べ del6 が長鎖基質との高い結合能を獲得したことを意味する. AT と del6 を組み合わせた V200A/C255T/del6 (AT6) は, 結合の異なる各種 2 糖の中で, AT 同様, スクロースを最も良い基質とした. AT および AT6 は, スクロースと IGn (IG2-IG7) の混合基質に対し, スクロースから IGn への α -1,6 グルコシル転移反応をよく触媒する. AT は IG3 への転移反応をよく触媒したのに対し, AT6 は IG4 への反応をよく触媒した. また, AT6 は, 高濃度スクロースと低濃度 IG7 から, 重合度 21 までのイソマルトオリゴ糖 (イソマルトメガロ糖を含む) を生成した.

(考察および結論) I6GT の $\beta \rightarrow \alpha$ loop 6 が長鎖基質との結合に与える影響を解析した. $\beta \rightarrow \alpha$ loop 6 を短くした del6 では, 活性が大きく低下した. このため, $\beta \rightarrow \alpha$ loop 6 は高い触媒能に重要な構造であると考えられる. しかし, del6 では長鎖基質に対する結合能が上昇した. このため, $\beta \rightarrow \alpha$ loop 6 は長鎖基質との結合を妨げる構造であると考察される. AT6 は AT と del6 の両性質を獲得した. そのため, スクロースと IG7 の混合基質に対し, スクロースから長鎖イソマルトオリゴ糖への α -1,6 グルコシル転移反応を繰り返し, イソマルトメガロ糖を生成したと考えられる. イソマルトメガロ糖はオリゴ糖と多糖の中間サイズの糖質 (重合度 10-99) である. 特有の機能が見出され, より効率的な合成法の構築が望まれている. 長鎖基質との結合能を上昇させた AT6 は, イソマルトメガロ糖合成に有用な酵素であると考えられる.