

アノマー反転型トレハラーゼの活性欠失変異体による 新規二糖合成反応に関する研究

応用分子生物学講座 分子酵素学分野

平内 亨

【背景と目的】大腸菌由来トレハラーゼ TreA は trehalose [α -Glc-(1 \leftrightarrow 1)- α -Glc] を加水分解し、 β -glucose と α -glucose を生成するアノマー反転型加水分解酵素である。本酵素は逆反応である縮合反応により β -glucosyl fluoride (β -GF) と α -glucose から trehalose を合成するが、合成された trehalose は正反応である加水分解の基質となるためほとんど蓄積しない。我々は、活性中心において trehalose の 6 位の水酸基、触媒水および一般塩基触媒等と水素結合ネットワークを形成していると考えられる Asp160 の変異体 (D160N) が著しく低い加水分解活性のために合成された trehalose を分解せずに蓄積する現象を見出した。本研究では、 β -xylosyl fluoride (β -XF) を基質に用いて、縮合反応産物の蓄積が水素結合ネットワークの変化に起因することを示した。また、D160N を親酵素としたサブサイト +1 変異体を作製し、trehalose 以外の様々な新規二糖合成に成功した。

【方法と結果】野生型を用いて、40 mM β -XF を供与体、200 mM 単糖 (glucose, xylose および galactose) を受容体として反応させ、生成物を HPAEC-PAD 分析により定量した。それぞれ 15%、8% および 2.5% の収率で生成物が蓄積した。

TreA の立体構造情報をもとに、D160N を親酵素としたサブサイト +1 変異体 (D160N/E279A および D160N/N196A) を作製した。 β -GF を供与体、様々な単糖を受容体として反応させ、縮合反応速度 (k_{cat}) をフッ素電極により測定した。D160N は glucose, xylose および galactose を受容体とし、それぞれ 59%、27% および 42% の収率で二糖を合成した。D160N/E279A は D160N と同様の基質特異性を示したが、 k_{cat} は低下し、収率はそれぞれ 37%、19% および 19% であった。一方、D160N/N196A では glucose, 2-deoxyglucose, mannose, talose, および 2-deoxygalactose を受容体とし、それぞれ 19%、56%、32%、69% および 12% の収率で二糖を合成した。NMR 解析および質量分析の結果、xylose, galactose および 2-deoxyglucose を受容体として生成された糖は α -1, α -1 結合からなる新規二糖であった。

【考察】野生型において縮合反応産物が蓄積したのは、6 位のヒドロキシメチル基が欠失した β -XF を基質としたことで、活性中心の水素結合ネットワークに変化が生じ、加水分解反応が抑制されたためだと推察される。D160N においても、変異導入により水素結合ネットワークに同様の変化が生じたため、trehalose が蓄積したと推察される。

D160N/E279A は D160N と同様の基質特異性を示した。つまり、Glu279 は基質の選択性には直接的に関与しておらず、変異導入により活性ポケットが拡大したため k_{cat} および収率は低下したと推察される。また、D160N/N196A が glucose の 2-エピマーおよび 2-デオキシ糖を受容体としたことから、Asn196 は基質の 2 位の水酸基の選択性に関与していると推測される。