

変異導入による *Aspergillus niger* 由来 α -glucosidase の特異性改変に関する研究 —loop7 への変異導入による特異性への影響—

応用分子生物学講座 分子酵素学分野
佐藤 恵美

【背景と目的】 酵素の特異性は基質結合部位を構成するアミノ酸残基に起因すると考えられる。本研究対象である *Aspergillus niger* 由来 α -glucosidase (ANG) は、加水分解反応において α -1, 4-グルコシド結合に最も良く作用する。また、糖転移反応では α -1, 6-グルコシド結合を形成する。これまでに ANG の特異性を決定する因子の解析に関する研究はほとんど行われてきていない。本研究では ANG の特異性に関与するアミノ酸残基の解明を目的とした。ANG は立体構造が未知であるため、構造既知の類縁酵素とのアミノ酸配列の比較から基質結合に関与するアミノ酸残基を推定した。これらの部位特異的変異酵素を解析し、特異性への影響を調べた。

【結果】 ANG の類縁酵素であるヒト小腸由来 glucoamylase では、 $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造の $\beta \rightarrow \alpha$ loop7 に位置する Phe1559 および Phe1560 が基質結合に関与している。アミノ酸配列の比較から ANG では Phe693 および Asn694 がそれらアミノ酸残基に相当する。Phe693 を Val に置換した F693V 変異体では加水分解速度が野生型より大きく低下した。特にマルトース、パノース (4-*O*- α -Isomaltosyl-D-glucose)、イソマルトースに対する加水分解速度が大きく低下した。Asn694 を Ala に置換した N694A 変異体は野生型と同様の基質特異性を示した。Asn694 を Phe に置換した N694F 変異体ではパノースに対する加水分解速度が大きく低下した。野生型および各変異酵素の糖転移反応における反応特異性を解析するため、100 mM マルトースを基質とした時の糖転移産物の生成初速度を求めた。野生型酵素は、 α -グルコシル基がマルトースに α -1, 6 転移したパノースと α -1, 4 転移したマルトトリオースを生成していた。各変異酵素の糖転移産物の生成初速度を野生型と比較すると、N694A 変異体では野生型同様、パノースの生成初速度はマルトトリオースの生成初速度よりも大きい値を示した。一方、F693V および N694F 変異体ではマルトトリオースの生成初速度がパノースの生成初速度を上回った。また、F693V 変異体では 2, 4-di- α -D-glucosyl glucose も有為に生成するようになった。

【考察】 Phe693 を Val に置換したことで基質結合部位の構造が変化し、加水分解速度が大きく低下したと推測される。また、その構造変化によりマルトースが還元末端側から基質結合部位に侵入しやすくなり、2, 4-di- α -D-glucosyl glucose を有為に生成するようになったと考えられる。F693V および N694F 変異体では変異導入により基質結合部位にパノースが受容されにくくなったため、パノースに対する加水分解速度および糖転移反応におけるパノース生成初速度が低下したと推測される。 α -1, 6-グルコシド結合を有する基質の結合には、 $\beta \rightarrow \alpha$ loop7 に位置するアミノ酸残基が関与している可能性が示された。また、N694A 変異体はパノース加水分解速度および生成初速度の低下を示さなかったことから、Asn694 の位置には比較的小さい側鎖のアミノ酸が位置することが ANG のパノース分解および合成には重要であることが示唆された。