

# *Bacteroides thetaiotaomicron* 由来 $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼ に関する研究

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子酵素学 大寄 翔平

## 1. はじめに

ヒトの腸内細菌である *Bacteroides* 属の細菌のゲノム配列中には多糖代謝に関わる酵素をコードする遺伝子が数多く存在する。*Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 のゲノム配列中にはGH97パラログが10あり, そのうちアノマー反転型 $\alpha$ -グルコシド加水分解酵素 (BtGH97a) およびアノマー保持型 $\alpha$ -ガラクトシド加水分解酵素 (BtGH97b) の機能解析が過去に行われている。本研究ではパラログに含まれる Bt3661 の遺伝子産物の推定し, 諸性質を検討することが目的である。

## 2. 方法

BL21 (DE3) を宿主に用い, 発現ベクター pCold に導入された組換え Bt3661 を発現し, Ni アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。本酵素を用いて種々の *p*-nitrophenyl (pNP) 合成基質を用いた基質特異性, 温度および pH 特性, 金属イオン依存性, 機能既知の BtGH97b との基質特異性の比較, 変異酵素を用いた基質特異性に関わる残基の特定に関する実験を行った。

## 3. 結果と考察

本酵素は pNP  $\beta$ -L-arabinopyranoside (pNP  $\beta$ -L-Arap) および pNP  $\alpha$ -D-galactopyranoside (pNP  $\alpha$ -Galp) に対して活性を示し, その  $K_m$ ,  $k_{cat}$  や  $k_{cat}/K_m$  値はそれぞれ 17.2 mM, 9.88 s<sup>-1</sup>, 0.58 s<sup>-1</sup> · mM<sup>-1</sup> および 20.8 mM, 4.29 s<sup>-1</sup>, 0.255 s<sup>-1</sup> · mM<sup>-1</sup> であった。両基質を比べると pNP  $\beta$ -L-Arap に対して高い特異性を示したので, 本酵素を  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼ (BtAra97c) とした。BtAra97c の至適 pH は 5.5, 至適温度は 35°C, 15 分間処理による温度安定性は 40°C 以下, 24 時間処理による pH 安定性は 4.2-10.7 であった。EDTA 存在下における反応速度の低下および CaCl<sub>2</sub> 添加による反応速度の回復から BtAra97c はカルシウムイオン要求性を有することがわかった。BtGH97b との基質特異性の比較を行い, BtGH97b は pNP  $\beta$ -L-Arap および pNP  $\alpha$ -Galp に対する  $K_m$ ,  $k_{cat}$  や  $k_{cat}/K_m$  値はそれぞれ 15.9 mM, 68.9 s<sup>-1</sup>, 4.36 s<sup>-1</sup> · mM<sup>-1</sup> および 0.313 mM, 290 s<sup>-1</sup>, 927 s<sup>-1</sup> · mM<sup>-1</sup> であった。BtAra97c は BtGH97b と比べ pNP  $\alpha$ -Galp に対する親和性ならびに反応速度が低いことがわかった。BtAra97c の変異酵素として, N338E, N338A を作成した結果, N338E は pNP  $\beta$ -L-Arap に対する  $k_{cat}/K_m$  値が増加, pNP  $\alpha$ -Galp に対する  $k_{cat}/K_m$  値が減少した。一方で, N338A は pNP  $\beta$ -L-Arap に対する  $k_{cat}/K_m$  値が減少, pNP  $\alpha$ -Galp に対する  $k_{cat}/K_m$  値が増加した。以上から, Asn338 が pNP  $\beta$ -L-Arap に対する認識に関わっているとわかった。