

Glycoside Hydrolase family 130 マンノシドホスホリラーゼの 基質特異性・反応特異性の分子基盤

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生物化学 尾高 伶

1. 背景と目的

Glycoside hydrolase family 130 (GH 130) はマンノシドホスホリラーゼ (MP) を中心とした酵素群である。*Ruminococcus albus* には 4- O - β -D-マンノシルグルコース (Man-Glc) を加リン酸分解する RaMP1, 主にマンノオリゴ糖を加リン酸分解する RaMP2 が存在する。本研究では, これらの酵素を用いて GH 130 酵素の基質や反応特異性の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

2. 結果と考察

1) RaMP1 および RaMP2 の受容体特異性

ホスホリラーゼの反応は可逆的であり, 加リン酸分解の逆反応の合成反応では, マンノース 1-リン酸 (α Man1P) と受容体分子が結合して糖が合成される。RaMP1 と RaMP2 ではこの受容体特異性が明確に異なり, RaMP1 は Glc の 6 位誘導体を受容体とするが, RaMP2 は受容体としない。この特異性に寄与するアミノ酸残基を構造から予測し, RaMP1 は RaMP2 型に, RaMP2 は RaMP1 型に置換した変異酵素を解析した。これらの変異酵素では, Glc 6 位誘導体への特異性も相互に入れ替わった。RaMP2 の変異酵素では, Glc 6 位誘導体に対する合成活性が認められるようになったが, これら誘導体の合成速度を測定する際に α Man1P からの無機リン酸の遊離が顕著に見られた。生成物の解析により, α Man1P から Man が生成していることが明らかになった。野生型 RaMP2 を詳細に解析したところ, α Man1P からの Man の生成がわずかに認められ, その最大速度 (k_{cat}) は Man-Glc 合成反応の k_{cat} の $1/10^3$ 程度であった。生成物である Man の解析により, 本反応は水分子からの水酸基がマンノシド結合を切断し, α Man1P から β Man が生成する機構であることが明らかとなった。

2) RaMP1 の基質の結合に重要なアミノ酸残基の解析およびアロステリック効果の発見

RaMP1 において, Man-Glc の結合に重要なアミノ酸残基に変異を導入すると, Man-Glc への親和性だけでなく, 構造上直接の影響を考えにくいリン酸への親和性も著しく低下した。このことから, Man-Glc との結合がリン酸との結合に影響することが考えられた。この変異酵素では, 各リン酸濃度における速度をプロット (s - v プロット) すると, ミカエリス-メンテン型の飽和曲線とならず, 正の協同性を受けるアロステリック酵素に特徴的なシグモイド型 (S 字型) の曲線を顕著に示した。野生型 RaMP1 でもこの S 字曲線がわずかに見られたことから, 変異酵素では Man-Glc の親和性が低下して, リン酸が適切に結合できなくなったことにより正の協同性が強められたと考えられた。RaMP1 は, 水溶液中ではホモ 3 量体あるいは 6 量体を形成していることから, はじめの一つの部位にリン酸が結合すると別の部位の基質の親和性が上昇するホモトロピックな制御を受けるアロステリック酵素であると考えられた。

3. まとめ

- 1 残基置換により, RaMP1 と RaMP2 間の Glc 6 位受容体特異性を相互変換することができた。
- 2 合成活性を低下させた RaMP2 の変異酵素では, α Man1P からの β Man の生成が顕著になった。
- 3 RaMP1 において, Man-Glc への親和性の変化はリン酸の親和性に影響する。
- 4 RaMP1 はリン酸の結合によって近隣部位のリン酸の親和性が高まる正の協同効果を示す。