

# *Halomonas* sp. H11 株由来 $\alpha$ -グルコシダーゼの一価陽イオンによる活性化 ならびに糖転移を支配する構造因子に関する研究

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生物化学 城戸 悠輔

## 1. 背景・目的

*Halomonas* sp. H11 株由来  $\alpha$ -グルコシダーゼ (HaG) は, アミノ酸配列から糖質加水分解酵素群 GH13 に分類され, マルトースやスクロースなどの  $\alpha$ -グルコシド結合を加水分解する。HaG は二糖特異性が高い, 一価陽イオン  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $NH_4^+$ , および  $Cs^+$ により活性化される, グリセロールへの糖転移により  $\alpha$ -グルコシルグリセロール ( $\alpha$ -GG) を効率的に生産するなどの特徴的な性質を持つ。本研究ではHaGの一価陽イオンによる活性化ならびに糖転移に重要な構造因子の解明を目的とした。

## 2. 結果・考察

HaG の基質特異性は  $K^+$  の有無で変化し, トレハロースおよびニゲロースを  $K^+$  存在下でのみ分解した。また,  $K^+$  存在下では至適 pH が上昇した。これらから, 陽イオンは基質結合部位近傍に結合すると予想した。HaG をはじめ陽イオンで活性化される  $\alpha$ -グルコシダーゼは, 一般酸塩基触媒残基の2残基 C 末端側に Gly-Asp の配列を持つ。この Gly (Gly273) が作るスペースが活性化に関与すると推定し, 変異酵素 G273N および G273W を調製した。スクロースに対する見かけの  $k_{cat}$  および  $K_m$  の陽イオン濃度依存性から反応機構を解析した。野生型酵素 (WT) では,  $K^+$  結合時の  $k_{cat}$  は非結合時の212倍であった。これに対し G273N および G273W ではそれぞれ6.8倍および2.5倍であり, 側鎖が大きいほど陽イオン濃度依存性が低下した。このことから, Gly273 の '陽イオン結合スペース' としての働きが支持された。Asp274 は立体構造上 Arg280 と塩橋を形成し  $\beta \rightarrow \alpha$  ループ5 を安定化すると考えられる。D274G および R280A は,  $K^+$  非結合時の  $k_{cat}$  がどちらも WT の 1/100 程度であったが,  $K^+$  結合時の  $k_{cat}$  はいずれも WT の 1/6 程度であった。このことから, 変異の導入による  $\beta \rightarrow \alpha$  ループ5 の構造変化に伴う活性の低下が, 陽イオンの結合により回復したことが考えられた。すなわち, 陽イオンの機能として '  $\beta \rightarrow \alpha$  ループ5 の構造の最適化 ' が考えられた。

次に, HaG の糖転移について解析した。フェニル  $\alpha$ -グルコシドを糖供与体, グリセロールを糖受容体として HaG の糖転移反応を速度論的に解析すると, グリセロール高濃度側にて糖転移速度が減少した。これはグリセロールが糖受容体としてだけでなく, 遊離酵素および ES 複合体に結合して阻害剤として働く反応スキームにより説明された。また, 2 mM *p*-ニトロフェニル  $\alpha$ -グルコシドを糖供与体として様々な糖アルコールへの糖転移活性を検討し, 活性が見られた糖アルコールの HaG への親和性を, 糖転移率 50% を与える糖受容体濃度  $K_t$  にて評価した。グリセロール, エリスリトール, キシリトール, およびソルビトールに対する  $K_t$  は, それぞれ 128 mM, 46.6 mM, 823 mM, および 794 mM であり, エリスリトールを最も良い糖受容体とした。HaG は, 触媒部位に位置する Arg200 と直接, Glu271 および Asp333 と水分子を介して水素結合する Tyr295 を持つが, 多くの類縁酵素はここに Phe を持つ。Tyr295 の糖転移への寄与を予想し, 作製した Y295F のグリセロールに対する  $K_t$  は 283 mM と WT より高く, Tyr295 は糖転移に重要な残基の一つであることが示された。

## 3. まとめ

HaG の陽イオンによる活性化の速度論的な解析から, Gly273 は '陽イオン結合スペース' として働き, 陽イオンの機能としては '  $\beta \rightarrow \alpha$  ループ5 の構造の最適化 ' が考えられた。糖転移反応にて糖受容体は阻害剤としても作用した。Tyr295 は糖転移に重要な残基の一つであることが考えられた。