

# シロイヌナズナ由来 $\beta$ -グルコシダーゼ Bglu13, Bglu15 および Bglu16 の グライコシターゼ化および基質特異性に関する研究

共生基盤学専攻 食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学 菅原 好美

## 1. 目的

$\beta$ -グルコシダーゼ (Bglu) は,  $\beta$ -グルコシド結合を加水分解するアノマー保持型糖質加水分解酵素である。シロイヌナズナの glycoside hydrolase family 1 に属する AtBglu13, AtBglu15 および AtBglu16 は 71-89% の高い配列同一性を示し, セロオリゴ糖やラミナリオリゴ糖を加水分解することが明らかとなっている。しかし, これらの生化学的機能の解析は不十分であり, さらなる解析が必要である。これら酵素の基質特異性をより詳細に解析するためには多様な基質が必要であるが, 入手できる基質は限られていることが問題である。本研究ではグライコシターゼ反応に着目した。アノマー保持型糖質加水分解酵素の求核触媒残基を Gly などに置換した変異酵素 (グライコシターゼ) は, 基質と反対のアノマー型のグリコシルフルオリドを糖供与体として糖受容体にグリコシル基を転移する。糖受容体となる糖でのみ反応生成物が得られることから, アグリコン特異性を評価できると考えられる。この反応生成物に対する加水分解活性に基づき, アグリコン特異性を定量的に評価できる。本研究では, AtBglu13, AtBglu15 および AtBglu16 のグライコシターゼ化および基質特異性の詳細解析を行った。

## 2. 結果と考察

求核触媒残基と推定される AtBglu13 の Glu414, AtBglu15 および AtBglu16 の Glu413 を Gly に置換した。いずれの変異酵素でも野生型酵素と比べ, ほぼ加水分解活性が失われた。これら変異酵素はグライコシターゼとして働き, *p*-ニトロフェニル  $\beta$ -D-グルコシド (*p*NPGLc), *p*NP  $\beta$ -D-ガラクトシド (*p*NPGal), *p*NP  $\beta$ -D-フコシド (*p*NPFCuc) および *p*NP  $\beta$ -D-キシロシド (*p*NPXy1) に  $\alpha$ -グルコシルフルオリドからグルコシル基を転移した。*p*NP  $\beta$ -D-マンノシドへの転移反応は見られなかった。AtBglu13 E414G および AtBglu15 E413G の反応では転移により  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) 結合が生成した。一方, AtBglu16 E413G の *p*NPGLc および *p*NPXy1 を糖受容体とした反応では  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) 結合, 4OH がアキシシャル位である *p*NPGal および *p*NPFCuc の反応では  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) 結合が生成した。モノグルコシル化生成物を調整し, これらを基質として野生型酵素の加水分解を解析した。+1 サブサイトにおいて  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) 結合のモノグルコシル化生成物では, AtBglu13 および AtBglu15 は Glc よりも Xy1 に対して高い特異性を示したが, AtBglu16 は Glc に対して高い特異性を示した。すなわち, +1 サブサイトにおける糖残基のヒドロキシメチル基に対する認識に違いが見られた。ラミナリオリゴ糖およびセロオリゴ糖に対する野生型酵素の速度パラメーターより, ラミナリオリゴ糖について AtBglu13 および AtBglu15 は三糖, AtBglu16 は二糖に対して最も高い  $k_{cat}/K_m$  を示し, セロオリゴ糖について AtBglu13 は六糖, AtBglu15 は五糖, AtBglu16 は三糖に対して最も高い  $k_{cat}/K_m$  を示した。RT-PCR による組織発現解析により *AtBglu13* は花, *AtBglu15* は花, 茎および根, *AtBglu16* はロゼット葉, 茎出葉, 茎および根で発現が確認された。以上のことから, AtBglu13, AtBglu15 および AtBglu16 は高い配列同一性を示すが, 組織局在性および基質特異性の両面において異なる機能を持つことが明らかになった。