

Isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyltransferase の

糖転移および基質特異性に寄与する構造因子の解析

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子酵素学 川田 恭平

はじめに

Isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyltransferase (I6GT) はイソマルトオリゴ糖を良い基質とする酵素である。糖転移反応を触媒し、イソマルトオリゴ糖の非還元末端グルコシル基を受容体へ α -1,6 転移し、様々な重合度のイソマルトオリゴ糖を生成する。本研究では I6GT の糖転移および α -1,6 特異性に寄与する構造因子の機能を解析した。

I6GT の構造に基づき Met227, Gln329 および Pro330 に注目した。I6GT の糖転移に重要なアミノ酸残基は Phe143 および Trp221 であると報告されており、それらの近傍に Met227 があるため、糖転移に寄与すると推測した。また Gln329 および Pro330 は GH13 の保存領域 IV 上にあり、配列上の保存性が低い。Gln329 は水分子を介してサブサイト+1 のグルコース基と水素結合している位置にある。

方法および結果

Met227 に各種アミノ酸残基を導入した変異酵素を作製し、機能を解析した。合成基質 pNPG を用いて糖転移率 50%を与える基質濃度(K_g)を求めた。Met227 に脂肪族アミノ酸残基を導入した変異酵素では側鎖が短くなる程、また極性、酸性および塩基性アミノ酸残基の導入により K_g が上昇し(M227G では野生型酵素の 2.25 倍, M227T では野生型酵素の 6.72 倍)、糖転移能が低下した。

次に Gln329 および Pro330 の変異に伴う機能を解析した。野生型酵素または V200A を親酵素とし変異酵素 Q329A, P330A および Q329A/P330A を作製した。4 mM の各種二糖を基質として、反応速度(=アグリコンの遊離速度)を測定した。野生型酵素を親酵素とした各種変異酵素ではイソマルトースを基質とした反応速度が最大であり、依然として α -1,6 特異性を有していた。一方、V200A を親酵素とした各種変異酵素では変異導入により、イソマルトースよりもスクロースを基質とした際の反応速度が最大であった。特に V200A/P330A 変異酵素では V200A 変異酵素の 4.74 倍の反応速度であった。

考察

Met227 の位置には、かさ高い脂肪族アミノ酸残基が糖転移には重要であると分かった。Met227 のあるこの空間を脂肪族アミノ酸残基で埋めることで、糖転移に重要なアミノ酸残基(Phe143 および Trp221)がサブサイト形成に必須な配向に寄与すると考えられる。

保存領域 IV に注目した変異酵素では、V200A を親酵素とした際に基質特異性が変化した。これは Gln329 を Ala にすることで水分子を介したサブサイト+1 での結合が失われたためであると推定される。また Pro330 への変異では、Ala にすることで保存領域上のループの形状が変わり Gln329 の配向に影響を及ぼすことで、サブサイト+1 における糖質の認識が変化すると推測される。