

Dextran dextrinase の生成物特異性に寄与するアミノ酸残基に関する研究

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子酵素学 坂谷 敦

1. 目的

Gluconobacter oxydans 由来の dextran dextrinase (DDase) は, マルトオリゴ糖を基質として連続的に α -(1 \rightarrow 6)グルコシル転移反応を触媒し, 多糖デキストランを生成する。ただし, 反応初期の主反応は α -(1 \rightarrow 4)転移であり, また糖受容体としてもマルトオリゴ糖の特異性が高い。本研究では, マルトオリゴ糖を基質とした際の生成物における α -(1 \rightarrow 6)特異性の向上を目指し, 変異酵素を作出した。DDase の立体構造は決定されていないが, 立体構造既知の *Arthrobacter globiformis* 由来 glucodextranase [GDase; α -(1 \rightarrow 6)グルコシド結合特異的加水分解酵素] との間で触媒ドメインが 19% のアミノ酸配列一致性を示す。GDase において基質特異性 [α -(1 \rightarrow 6)グルコシド結合] に重要とされる 2 つのアミノ酸残基を DDase に導入した変異酵素を解析した。

2. 方法

DDase の C 末端 382 残基を欠失した削除体 Δ 382C を親酵素として用い, 類縁酵素である GDase の構造に基づき, サブサイト+2 に位置すると予想される Phe602 および Tyr809 を Gln および Trp にそれぞれ置換した変異酵素 F602Q および Y809W を作製した。また, Phe602 に関しては, 他の 18 種すべてのアミノ酸に置換した変異酵素 (F602X; X は Phe および Gln 以外のアミノ酸) を作製した。親酵素および各変異酵素を大腸菌で生産し, Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。親酵素, F602Q, Y809W および F602X のマルトオリゴ糖を基質とした際の初期生成物を HPAEC-PAD を用いて定量し, その生成速度を求めた。また, 親酵素および F602Q の速度パラメーターを求め, マルトオリゴ糖に対するサブサイト+2 および+3 の親和力を求めた。

3. 結果および考察

親酵素および Y809W はマルトトリオース (G3) を基質とした初期反応においてマルトースおよびマルトテトラオース [G4; α -(1 \rightarrow 4)転移産物] を生成した。一方, F602Q は G4 以外に α -(1 \rightarrow 6)転移産物である 6^m- α -グルコシルマルトトリオース (B4) を生成した。それらの生成速度比から, 74% が α -(1 \rightarrow 4)転移, 26% が α -(1 \rightarrow 6)転移であった。また, F602X はすべて G4 以外に α -(1 \rightarrow 6)転移産物である B4 を生成した。その中で, 最も α -(1 \rightarrow 6)転移を示した変異酵素は F602P であり, 34% が α -(1 \rightarrow 4)転移, 66% が α -(1 \rightarrow 6)転移であった。すべての Phe602 変異体において, 基質 G3 に対しては α -(1 \rightarrow 6)転移の顕著な増加が確認された。したがって, Phe602 は生成する結合決定因子の一つと判断された。

また, マルトオリゴ糖に対するサブサイト+2 および+3 の親和力は, 親酵素では 16 kJ/mol および 2.2 kJ/mol, F602Q では 12 kJ/mol および 1.5 kJ/mol であり, Phe \rightarrow Gln 変異によりサブサイト+2 および+3 の親和力はともに低下した。このことから, Phe602 はサブサイト+2 および+3 に位置すると判断された。