

# Glycoside hydrolase family 31 $\alpha$ -glucosidase の N-loop が触媒機構に与える影響

生物資源科学専攻 分子生物学講座 分子酵素学 福本 健太

## 1. 背景と目的

glycoside hydrolase family 31 (GH31) に属する  $\alpha$ -glucosidase は加水分解と糖転移の2つの反応を触媒する。それぞれの触媒反応効率(糖転移率)は酵素種によって異なり、基質濃度の増加に伴い、糖転移率も増加する。GH 31 $\alpha$ -glucosidase の中には工業スケールでのオリゴ糖合成に用いられる酵素も属するため、糖転移率の高い酵素を作製することは産業的な利用からも重要である。本研究では加水分解酵素という位置づけながら、低基質濃度で高い糖転移能を示す *Podospora anserina* 由来  $\alpha$ -glucosidase(PAG)および工業スケールでのイソマルトオリゴ糖合成に用いられている *Aspergillus niger* 由来  $\alpha$ -glucosidase(ANG)を対象とし、糖転移率に関与するアミノ酸残基を同定することを目的とした。立体構造が明らかとなっている GH31  $\alpha$ -glucosidase は共通して N-loop と呼ばれる長いループが基質結合部位の一部を形成している。N-loop のアミノ酸配列は酵素により多様化しており、それぞれの酵素の特異性に関与していると考えられる。本研究ではこの N-loop に注目した。

## 2. 方法

糖転移率の高い酵素群では N-loop に芳香族アミノ酸を有し、PAG は Phe 残基を有している。それに対して ANG を含むその他の GH31  $\alpha$ -glucosidase は相当する残基を有していない、もしくは Ala 残基や Gly 残基などの側鎖の小さいアミノ酸残基を有している。そこでこの Phe 残基が PAG の高い糖転移率に関与していると予想し、これを欠失もしくは Ala 残基に置換した変異酵素 $\Delta$ F194 および F194A を作製した。一方で Phe194 に相当する残基を保持していない ANG に対して対応する位置に Phe ならびに Ala, Leu, Val, Pro など様々なサイズの疎水性側鎖を有するアミノ酸残基を挿入した変異酵素 226F227, 226A227, 226L227, 226V227 および 226P227 を作製し、基質特異性ならびに maltose を基質としたときの糖転移率を解析した。

## 3. 結果と考察

組換え酵素を酵母 *Pichia pastoris* を宿主として生産し、Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。 $\Delta$ F194 および F194A は野生型 PAG と比べて糖転移率が低下した。糖転移率が 50%を示す時の基質濃度( $K$ )が野生型 PAG では 4.1 mM であるのに対し、 $\Delta$ F194 および F194A ではそれぞれ 14.7 mM, 15.6 mM と変化していた。この値は野生型 ANG の  $K$ , 16.4 mM と近似しており、このことから Phe194 は PAG の高い糖転移率に関わるアミノ酸残基であることがわかった。ANG 変異酵素では 226P227 を除き、糖転移率は低下した。特に、226F227 の糖転移率は野生型 ANG のその約 10 分の 1 に低下していた。一方 226P227 の糖転移率は野生型 ANG と比べて変化しなかったが、糖転移産物のうち 2,4-di- $\alpha$ -D-glucosyl glucose を生成する割合が増加した。これは Pro 残基の導入が、N-loop に構造変化をもたらし、基質結合部位の構造が変化したためであると考えられる。