

Kribbella flavida 由来 isomaltosyltransferase の機能解析

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子酵素学 宮野 江梨

1. 背景と目的

isomaltosyltransferase (IMT)は glycoside hydrolase family 31 の糖転移酵素であり, 2分子の isomaltose 単位が互いに α -1,3 結合でつながった環状四糖 (cyclo-(1 \rightarrow 6)-[α -nigerosyl-nigerosyl], CNN)を生成する。6^{II}-O- α -glucosylmaltose (panose) に IMT を作用させると, 分子間糖転移反応により 3^{III}-O- α -isomaltosylpanose (isomaltosylpanose)が生成し, その後, これを基質とした分子内糖転移反応により CNN が合成されることが予測されている。しかしながら, それぞれの反応における反応特異性や, それらを決定づける構造因子に関する知見はない。本研究は, 放線菌 *Kribbella flavida* 由来 IMT (*Kf*IMT)の特異性に関与する構造因子の特定を目的とした。

2. 方法

K. flavida NBRC 14399 由来 IMT の組換え酵素を大腸菌で生産した。野生型に加え, C 末端 CBM ドメイン削除体および削除体を親酵素とした4つの変異酵素を作製した。変異導入の標的となるアミノ酸残基の決定には, 類似酵素の立体構造を参考にし, サブサイト-3 を形成すると予想された Phe547をAlaに(F547A), サブサイト+1を形成すると予想されたTrp546をAlaおよびPheに(W546A, W546F), サブサイト+2を形成すると予想されたTyr315をAlaに(Y315A)それぞれ置換した。これらの酵素を panose および isomaltosylpanose に作用させ, 反応初期における生成物の遊離速度を HPAEC-PAD を用いて測定した。また, 反応生成物の経時変化を TLC により解析した。

3. 結果と考察

CBM ドメイン削除体の酵素化学的性質, 基質特異性, 生成物特異性は野生型と同等であった。CBM は IMT の触媒機能には関与しないと判断し, 以降は CBM 削除体にアミノ酸置換を加えた。

F547A は, 10 mM panose または 10 mM isomaltosylpanose を基質とした際の反応初速度が親酵素と比べ変化しなかった。この結果は Phe547 のサブサイト-3 への関与, またはサブサイト-3 の存在自体を否定するものであると考えられる。W546F は 10 mM panose を基質とした際の糖転移率が 0.36 倍に低下した。Trp546 が酵素の糖受容体基質との相互作用に重要な役割を持つことがわかった。TLC による反応生成物の解析では, *Kf*IMT が isomaltosylpanose から 3^V-O- α -isomaltosylisomaltosylpanose を生成し, それを基質として CNN を生成している可能性が示唆された。isomaltosylpanose から CNN が生成されない理由として, サブサイト+2 の親和力が影響していると予想し, Tyr315 を Ala に置換した。Y315A は 10 mM isomaltosylpanose を基質とすると, 全反応速度に対する CNN 生成速度が親酵素の 0%から 38%に上昇した。サブサイト+2 の親和力が isomaltosylpanose を基質とした際の反応特異性に寄与していることが示された。