

フッ化糖を用いた酸塩基触媒変異酵素による糖転移反応に関する研究

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子酵素学 米山 琢馬

1. 背景と目的

糖質加水分解酵素には加水分解反応に加えて、糖転移反応も起こすものがある。糖転移反応によって生成された糖転移産物は通常の加水分解によって分解されるため、糖転移産物の収量を制御するのは難しい。故に、ニゲロースやコウジビオースといったオリゴ糖が含まれる製品は依然として高価である。これらのオリゴ糖を如何に高い収率で得るか、その研究が多く行われている。その1つに、加水分解に必要な触媒残基に変異導入することで糖転移産物の加水分解を抑制し、糖転移産物の合成や蓄積を試みた研究がある。例えば、求核触媒残基に変異を導入した glycosynthase と呼ばれる酵素は、 β -glucopyranose fluoride (β -GF) を糖供与体とし、ラクトースやガラクトースを糖受容体として糖転移反応をするという報告がある。本研究では、*Aspergillus niger* 由来の α -glucosidase (ANG) の野生型酵素と一般酸塩基触媒残基に変異を導入した酵素 (D660N, D660A) を用い、これらの変異酵素がフッ化糖 (α -glucopyranose fluoride, 以下 α -GF) を糖供与体として糖転移反応するかどうかを調べた。

2. 方法

10 mM α -GF を糖供与体として 10 mM グルコース, マルトース, スクロース, イソマルトース, および pNPG を糖受容体として, 37°C で 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 分, 24 時間反応させ, 各々の反応生成物の経時的変化を TLC で観察した。また 25 mM α -GF と野生型 ANG および変異酵素を 37°C で 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 分, 24 時間反応させて, 反応生成物の経時的変化を TLC で観察した。

3. 結果と考察

ANG の一般酸塩基触媒残基 (D660) の変異酵素, D660N と D660A を精製した。これらの変異酵素と野生型 ANG を α -GF と各種糖質を受容体として反応させたとき, 野生型酵素の糖転移反応の受容体となる糖は, グルコース, マルトース, スクロースの 3 種類であったことが TLC 分析の結果から分かった。野生型 ANG と D660N, D660A の糖転移産物を TLC で分析して現れたスポットの位置を比較したところ, 野生型 ANG と変異酵素によって生じる糖転移産物は異なることが分かった。しかし, 野生型 ANG と比べて一般酸塩基触媒残基の変異酵素では糖転移反応による産物がほとんど得られなかったことが分かった。ANG の一般酸塩基触媒残基の変異酵素による糖転移産物が得られないのは, 受容体の求核性が低く, 塩基として十分に作用せず, 糖供与体に対して求核攻撃が起こりにくいため, ANG の一般酸塩基触媒残基の変異酵素による糖転移反応が野生型酵素と比べて起こりにくいと推測される。