

# イネ由来スクロースシンターゼ 3 組換え酵素の基質特異性の変換および

## 生化学的糖質合成への応用

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生物化学 岩藤 伸治

### 1. 諸言

スクロースシンターゼ (SUS) はスクロース (Suc) とヌクレオチド二リン酸 (NDP) を基質として NDP-グルコース (NDP-Glc) を生成する。一般的に植物由来 SUS では UDP への特異性が高いが、一部の微生物由来 SUS では ADP への特異性が高い。これらの特異性の違いに関する構造因子は明らかにされていない。一方、SUS による反応産物 NDP-Glc は、各種糖転移酵素の反応において糖供与体として利用され、多様な糖質・配糖体合成の基質となる。糖転移酵素トレハロース-6-リン酸シンターゼ (T6PS) は UDP-Glc とグルコース 6-リン酸 (Glc6P) からトレハロース 6-リン酸 (Tre6P) を合成する。Tre6P は植物におけるシグナル物質として注目されているが、試薬として高価であり、安価な合成法の構築が求められている。SUS と T6PS によるワンポット Tre6P 合成経路の利用により、Suc を出発物質とした UDP-Glc の合成および UDP の再利用が可能なことから、低コストでの Tre6P 生産が期待できる。以上により本研究では、(1) 植物 SUS の NDP 特異性に関わるアミノ酸残基の特定および特異性の改変、(2) SUS と T6PS による Tre6P の高効率合成系確立を目的とした。

### 2. 方法

SUS にはイネ由来 SUS3 を、T6PS には大腸菌由来 OtsA を用いた。いずれも大腸菌を宿主として生産した組換え酵素を精製して用いた。酵素反応速度および反応の経時変化解析では、定量キットおよび HPLC により各種基質および生成物を定量した。各種 SUS の立体構造の予測には Phyre2 を用いた。鋳型はシロイヌナズナ由来 SUS1 であった。

### 3. 結果と考察

(1) 組換え SUS3 の NDP 特異性を解析した。50 mM Suc 存在下 1 mM UDP, ADP, TDP, CDP, GDP に対する反応速度はそれぞれ 12.6, 1.88, 3.11, 0.0852, 0.0234  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  であり、既報の植物由来 SUS と同様に UDP に高い特異性を示した。組換え SUS3 の UDP および ADP に対する  $k_{\text{cat}}/K_m$  はそれぞれ 5780 および 70.1  $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$  であった。SUS3 の予測立体構造を、ADP 特異性の高いシアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* 由来 TeSUS と比較した。一致しないアミノ酸残基のうち、予測基質結合部位周辺の 2 残基にまず注目し、TeSUS 型に置換した。2 重変異酵素は、UDP に対する  $k_{\text{cat}}/K_m$  の顕著な低下 (29.9  $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ ) と ADP に対する増加 (115  $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ ) を示し、ADP 特異的に変化した。更に周辺 2 残基も置換した 4 重変異酵素では、 $k_{\text{cat}}/K_m$  が UDP に対して更に低下 (5.08  $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ ) する一方 ADP に対しては大きく増加 (304  $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ ) して、顕著な ADP 特異性へ変換された。以上より、これら 4 アミノ酸残基が SUS3 の高い UDP 特異性に寄与することが明らかとなった。(2) SUS3 および OtsA 組換え酵素を用いて、300 mM スクロース、200 mM Glc6P および 5.0 mM UDP から Tre6P を合成した。2 週間の反応で 192 mM の Tre6P が合成された。SUS による UDP-Glc 合成および T6PS による Tre6P 合成と同時に SUS への UDP 供給が反応時間内に進行したと判断される。本結果は、既報の SUS と糖転移酵素を用いた糖質合成と比べ、目的糖質が最も高い濃度で合成されたものであり、NDP 特異性改変酵素作出と併せて、本手法の糖質合成への応用を拓くものである。