

Ruminococcus albus 由来マンノシルグルコースホスホリラーゼの基質結合

およびアロステリック特性に関与するアミノ酸残基の機能に関する研究

共生基盤学専攻 食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学 塩田 咲耶子

1. 背景と目的

4-*O*- β -D-マンノシルグルコースホスホリラーゼ (MGP) は Man β 1-4Glc を加リン酸分解する酵素であり, β -マンナン代謝に寄与する。逆反応 (合成反応) ではマンノース 1-リン酸を糖供与体, D-グルコースをマンノシル基を受容する糖受容体とし, Man β 1-4Glc とリン酸が生じる。MGP の D-グルコースに対する特異性は, サブサイト+1 の構造に起因すると考えられ, 本研究では類縁酵素の間での構造機能相関に注目した。*Ruminococcus albus* 由来 MGP (RaMP1) は, リン酸により正の協同性を示すホモ三量体のアロステリック酵素である。本研究では, RaMP1 の基質結合およびアロステリック特性に関与するアミノ酸残基の機能を解析した。

2. 結果と考察

1) RaMP1 の基質結合に関与するアミノ酸残基の機能解析 : RaMP1 の Arg92 は, サブサイト+1 でグルコース残基の 1-OH および 2-OH と水素結合し, MGP において完全に保存される。D-マンノースや *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) を糖受容体とする β -1,4-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼや β -1,4-マンノシルキトビオースホスホリラーゼでは, この Arg の配向が異なる。RaMP1 変異酵素 R92L では合成反応における D-グルコースへの見かけの k_{cat}/K_m が野生型酵素の 0.068%, R92V では 2.6% であり, D-グルコースに対する親和性が著しく低下した。しかし, 両変異酵素は GlcNAc を糖受容体とし, β -D-マンノシル-(1 \rightarrow 4)-*N*-アセチル-D-グルコサミンを生成した。これは Arg92 の側鎖による立体障害が解消され, かさ高い GlcNAc の結合が可能となったためと考えられる。

2) RaMP1 のアロステリック特性に関与するアミノ酸残基の機能解析 : 他起源由来の MGP 2 種では協同性は観察されず, 協同性は RaMP1 に特有の特性であると考えられる。RaMP1 のサブユニット間にあるループ構造上の His245 を Ala に置換した H245A では, 各無機リン酸濃度に対する反応速度から得られるヒル係数 (アロステリックの強度を示す) が 2.41 であり, 野生型酵素の 1.44 より大きい。このため, このループ構造を介したサブユニット間の相互作用がアロステリック特性に関連すると考えられた。本研究では, 基質リン酸が結合する Lys251 と Arg188, さらに Tyr128 および Glu147 を介して His245 に至る水素結合ネットワークに注目し, 各残基の Ala 置換体を作製し, Arg188 近傍に位置する Met208 変異酵素 M208Q と合わせて解析した。M208Q 以外の変異酵素は無機リン酸に対する見かけの k_{cat}/K_m が著しく低下した。ヒル係数を比較すると, K251A, R188A および Y128A では 1.5~1.7 と野生型酵素よりやや高い値を示したが, E147A では 1.15 であり, ミカエリスメンテン型の 1.00 に近づいた。この水素結合ネットワークはアロステリック特性に関与しており, 特に Glu147 が重要な役割を担っていると考えられた。M208Q では見かけの k_{cat}/K_m は野生型酵素と同程度, しかしヒル係数が 1.24 に低下した。Gln と Arg188 の間の水素結合により, Arg の配向変化が制御されたと考えられ, Arg188 がフレキシブルであることがアロステリック特性に重要であることが示唆された。