

## *Zymomonas mobilis* 由来 levansucrase と invertase の特異性改変に関する研究

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子酵素学 芹沢 領

### 1. 目的

*Zymomonas mobilis* は 2 種の glycoside hydrolase family 68 に属す酵素(levansucrase, invertase)の遺伝子をゲノムに有する。両酵素は互いに高いアミノ酸配列一致性(62%)を示すが、異なる反応を触媒する。levansucrase は sucrose の fructosyl 基を $\beta$ -2,6 結合で転移し 6-kestose や多糖の levan を合成する糖転移反応を触媒する。一方で invertase は sucrose を基質とした際、主に加水分解反応を触媒する。糖転移反応を触媒する際は、fructosyl 基を $\beta$ -2,1 結合で転移し 1-kestose を合成する。本研究では両酵素の反応特異性の違いに関与する構造因子の解析を目的とした。

### 2. 方法

*Zymomonas mobilis* NBRC13576 の染色体 DNA から levansucrase および invertase をコードする遺伝子を PCR により取得し、大腸菌を用いてそれぞれの組換え酵素を生産した。組換え酵素を、Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、sucrose を基質とした際の酵素反応を解析した。酵素反応により生成する glucose, fructose, 6-kestose ならびに 1-kestose を HPAEC-PAD により定量した。変異酵素作製のための変異導入を PCR により行った。

### 3. 結果

1 M sucrose を基質とした際 levansucrase では、反応初期の糖転移反応の生成物が 6-kestose, 1-kestose および neokestose であった。6-kestose および 1-kestose の反応速度は、それぞれ 220 sec<sup>-1</sup>, 207 sec<sup>-1</sup> であり、加水分解を含めた全反応速度は 1,400 sec<sup>-1</sup> であった。invertase では、反応初期の糖転移反応の生成物が 1-kestose であった。6-kestose および 1-kestose の反応速度は、それぞれ 19 sec<sup>-1</sup>, 1,400 sec<sup>-1</sup> であり、加水分解を含めた全反応速度は 4,100 sec<sup>-1</sup> であった。また levansucrase では反応 24 時間後に levan の生成が確認されたが、invertase ではその生成は見られなかった。

両酵素のアミノ酸配列の比較から、invertase の活性中心近傍に存在する His79 と Ala343 に相当するアミノ酸残基が levansucrase ではそれぞれ Asn84 と Ser345 であることが分かった。これらのアミノ酸残基が反応特異性の違いに関与していることが予想された。そこで invertase を levansucrase 型のアミノ酸残基に置換した変異酵素 (H79N<sup>INV</sup>, A343S<sup>INV</sup> および H79N/A343S<sup>INV</sup>) と、levansucrase を invertase 型に置換した変異酵素 (N84H<sup>LS</sup>, S345A<sup>LS</sup> および N84H/S345A<sup>LS</sup>) を作製し、1 M sucrose を基質とした際の反応生成物を解析した。

反応初期の糖転移反応において、H79N<sup>INV</sup>, A343S<sup>INV</sup> および H79N/A343S<sup>INV</sup> は 1-kestose の合成が減少し、6-kestose の合成が増加した。N84H<sup>LS</sup>, S345A<sup>LS</sup> および N84H/S345A<sup>LS</sup> は 1-kestose の合成が増加し、6-kestose の合成が減少した。これらの現象は 2 重置換で特に顕著であった。

すなわち、これら 2 つのアミノ酸残基が糖転移反応における $\beta$ -2,6 転移と $\beta$ -2,1 転移の特異性に関与する構造因子であることが明らかとなった。