

glycoside hydrolase family 97 α -galactosidase 求核触媒残基変異酵素におけるケミカルレスキュー反応とグリコシターゼ反応に関する研究

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子酵素学 松永 夏奈

1. 背景と目的

glycoside hydrolase family 97 α -galactosidase は Asp を求核触媒残基, Glu を一般酸塩基触媒残基として有し, これらの協同的な働きにより加水分解反応を触媒する。水の代わりに糖質などのアルコール分子が基質となった場合には, 新たに α -ガラクトシド結合を合成する糖転移反応も触媒する。Asp を Gly に置換した求核触媒残基変異酵素 (D415G) は触媒活性を失うが, 外用性求核試薬 (ギ酸ナトリウムおよびアジ化ナトリウム) 存在下ではこれを回復する。ケミカルレスキューと呼ばれるこの反応は, 外用性求核試薬が求核触媒残基の働きを相補することで進行する。この反応を利用し, ギ酸ナトリウム存在下で供与体として野生型酵素が作用するアノマー型と同じフッ化糖である α -ガラクトシルフルオライド (α -GalF) を用いると, 高い収率で糖転移産物を得ることができる。また, D415G はこの糖転移反応により α -(1 \leftrightarrow 1)- β 結合をもつ非還元糖を生成する。本研究では, ラクトースを受容体とした場合の糖転移産物 α -ガラクトシルラクトース (Gal-Lac) と D415G の複合体結晶構造解析を行い, 活性ポケットの構造と糖転移産物の生成物特異性について考察した。また, D415G は野生型酵素が作用する基質とは逆アノマー型の β -ガラクトシルフルオライド (β -GalF) を供与体として用いるとグリコシターゼ反応と呼ばれる糖転移反応を触媒する。しかし, β -GalF は非常に不安定であり糖転移産物の収率を上げるのは困難である。そこで, β -ガラクトシルアザイド (β -GalN₃) を供与体としたグリコシターゼ反応を検討した。

2. 方法

D415G と Gal-Lac の共結晶の X 線回折データを測定し, 複合体構造を解析した。ギ酸ナトリウム存在下で供与体を α -GalF, 受容体をセロビオースおよび *p*-ニトロフェニル (*p*NP) 配糖体 (*p*NP α -グルコシド, *p*NP β -グルコシド, *p*NP α -マンノシド, *p*NP β -マンノシド) とした場合の糖転移産物を TLC で解析し, 結合様式をメチル化分析によって決定した。供与体を β -GalN₃, 受容体を単糖・二糖類 (グルコース, キシロース, ラクトース, マルトース, セロビオース) および *p*NP 配糖体とした場合の, 48 時間後の糖転移産物を HPLC もしくは HPAEC-PAD で定量した。また, 受容体をラクトースとした場合に生成される Gal-Lac の生成速度を HPAEC-PAD を用いて測定した。

3. 結果と考察

複合体構造から, サブサイト+1 の空間的に狭い構造が α -(1 \leftrightarrow 1)- β 結合をもつ Gal-Lac の生成に関わっていることが示唆された。一方, セロビオースを受容体とした場合には, D415G は α -(1 \leftrightarrow 1)- β 結合をもつ非還元糖のみでなく α -(1 \rightarrow 6) 結合をもつ還元糖も生成した。*p*NP 配糖体を受容体として用いた場合も同様に α -(1 \rightarrow 6) 結合を形成した。これら α -(1 \rightarrow 6) 結合の形成にはサブサイト+2 に位置する Trp474 の環状構造との相互作用が関わっていると考えられる。また, D415G は β -GalN₃ を供与体としたグリコシターゼ反応を触媒することがわかった。受容体の種類にかかわらず, ギ酸ナトリウム存在下で α -GalF を供与体とした糖転移産物の収率は β -GalN₃ を供与体としたグリコシターゼ反応での収率に比べ高かった。 β -GalN₃ のアザイドイオンは α -GalF のフルオライドイオンに比べ遊離しにくく, 糖転移反応が進行しにくいと考えられる。