

好熱性細菌由来マルチドメインタンパク質の糖転移活性に関する研究

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 三島 英莉

1. 背景と目的

糖質加水分解酵素(GH)は、アミノ酸配列の類似性に基づき分類され、同一ファミリーの酵素は共通の反応機構を持つとされている。GHはまた、反応により2種に大別される。すなわち、基質と生成物間でアノマー型が保持される保持型反応と、反転する反転型反応の2種である。近年、反転型酵素のファミリーであるGH15に保持型酵素のデキストランデキストリナーゼ(DDase, マルトオリゴ糖を基質とした α -(1 \rightarrow 6)-転移によりデキストランを合成)が分類された。これにより、GH15における更なる糖転移酵素の存在が予想された。本研究では、DDaseの触媒ドメインと高い配列同一性を持つ好熱性細菌由来マルチドメインタンパク質に注目し、酵素の触媒反応等詳細を解析した。

2. 結果と考察

本タンパク質はN末端側からGH66触媒ドメイン、糖結合モジュール35ドメイン、GH15触媒ドメインを持つ。各触媒ドメインを欠損させた変異酵素2種を作製した。大腸菌宿主により生産し、精製し、各触媒ドメインの機能を解析した。

(1) GH15触媒ドメイン(Δ N)の解析

N末端のGH66触媒ドメインを欠損させた Δ Nをマルトオリゴ糖(Gn, nは重合度)およびイソマルトオリゴ糖(IGn)に作用させた。Gnに対し、① α -(1 \rightarrow 4)-グルカン不均化段階、② α -(1 \rightarrow 6)-グルカン伸長段階、③加水分解段階の3段階を経ることが明らかになった。①では、G3-G9への反応では α -(1 \rightarrow 4)-転移による不均化反応が見られた。G2への反応では主として α -(1 \rightarrow 6)-転移によるパノース(α -Glc-(1 \rightarrow 6)-G2)の生成が見られた。②では、Gnおよびグルコース(Glc)に α -(1 \rightarrow 6)-転移した生成物が確認された。G5への反応生成物の重合度組成を経時的に測定した結果、重合度16までの反応生成物が見られた。DDase反応とは異なり、高分子生成物は蓄積しなかった。③では、転移生成物が分解され、Glcにむけて収束した。IG2-IG6への反応では α -(1 \rightarrow 6)-転移を触媒し、不均化反応が見られた。これらより、 Δ Nは1,4/1,6- α -グルカン- α -1,4/1,6-グルコシルトランスフェラーゼ活性を持つことが明らかになった。

(2) GH66触媒ドメイン(Δ C)の解析

C末端のGH15触媒ドメインを欠損させた Δ CをデキストランおよびIGnに作用させた。デキストランに対して還元糖の生成が見られ、加水分解活性が確認された。反応液の糖組成を分析した結果、これらは数種類の環状糖であり、環状化活性が確認された。環状糖とGlcの混合液の反応では、環状糖の環が切断されGlcへ α -(1 \rightarrow 6)-転移したことに由来するIGnの生成が見られた(カップリング反応)。IG3およびIG4ではGlc単位の、IG5-IG7では3または4糖単位の α -(1 \rightarrow 6)-転移を触媒し、不均化反応が見られた。 Δ CはCITaseが持つ4つの活性を全て持つことが明らかになった。

好熱性細菌における本タンパク質の機能は、澱粉などの α -(1 \rightarrow 4)-グルカンからの環状糖合成と考えられる。菌体外でGH15触媒ドメインが α -(1 \rightarrow 4)-グルカンから α -(1 \rightarrow 6)-グルカンへの変換を触媒し、これを介してGH66触媒ドメインが環状糖を合成すると考えられる。本タンパク質遺伝子近傍には、菌体内で環状糖の取り込みおよび分解に関わるタンパク質の遺伝子が存在する。これにより合成された環状糖は菌体内に取り込まれ、分解酵素によりGlc単位まで分解され、栄養源として用いられると推定された。