

好熱菌由来オリゴ-1,6-グルコシダーゼの機能解析

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子酵素学 吉田 強軌

【背景と目的】

糖質加水分解酵素の糖転移反応は、様々なオリゴ糖の工業的生産に用いられる産業上重要な反応である。糖転移反応とは、加水分解酵素の触媒において、水分子以外の水酸基が反応し、新たなグリコシド結合を形成する反応のことである。イソマルトオリゴサッカライド-6-グルコシルトランスフェラーゼ (I6GT) は、糖転移反応によりイソマルトオリゴ糖を基質として、異なる鎖長のイソマルトオリゴ糖を生成する特徴的な酵素である。現在、様々な生物のゲノム配列が明らかとなり、I6GT 様の配列も数多く登録されている。それらの中で好熱菌がコードするオリゴ-1,6-グルコシダーゼ (ThpO16G) は、既知 I6GT とアミノ酸配列が 73%一致し、84%の類似性を示す。本研究では酵素化学的な性質が未知な ThpO16G の機能解析を目的として、大腸菌で組換え ThpO16G を生産し、この酵素化学的な諸性質を調べた。

【結果と考察】

大腸菌により生産した組換え ThpO16G を、Ni-アフニティークロマトグラフィーを用いて精製した。ThpO16G の最適 pH は 5.7、最適温度は 60°C であった。また、各温度で 10 分間静置し、90%以上の残存活性を示す範囲は 40°C 以下であった。各基質 2 mM と反応させ、ThpO16G の基質特異性を評価した。イソマルトースの加水分解速度を 100 とした時、パラチノース、スクロース、コージビオース、ニゲロース、トレハロースに対する加水分解速度はそれぞれ 51、10、7.6、1.7、0.54 であった。このことから、ThpO16G は非還元末端の α -1,6 結合に高い特異性を示すことが分かった。また、I6GT ではイソマルトースの加水分解速度を 100 とした場合、パラチノースに対する加水分解速度が 3.3 であることから、ThpO16G は I6GT に比べてパラチノースに対する反応性が高いことが分かった。合成基質 *p*-ニトロフェニル α -グルコシド (*p*NPG) 濃度変化と反応速度の関係を調べた。反応速度はミカエリス-メンテンの速度式ではなく、加水分解反応に加え糖転移反応を考慮に入れた速度式に従うことが分かった。8 mM *p*NPG を基質としたときの反応生成物を経時的に TLC で解析した。反応生成物として、糖転移産物である *p*-ニトロフェニル α -イソマルトシドの生成が確認された。糖転移率は基質濃度の増加とともに上昇し、4 mM *p*NPG のときの糖転移率は 16% であった。一方 I6GT では、4 mM *p*NPG のときに 96%の糖転移率を示すことが調べられている。すなわち、ThpO16G は I6GT に比べると糖転移能が低い酵素であることが明らかになった。ThpO16G と I6GT の活性ポケットのアミノ酸配列を比較すると、活性ポケットを構成するほとんどのアミノ酸が一致したが、I6GT が有する芳香族アミノ酸が ThpO16G では他のアミノ酸に置換されていることが分かった。このアミノ酸置換が、ThpO16G の低い糖転移能の要因の 1 つではないかと考えられた。