

多糖合成酵素の分子機構に関する構造因子の探索

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子酵素学 佐々木 優希

1. 目的

酢酸菌由来の多糖合成酵素は糖供与体基質の非還元末端のグルコース残基を糖受容体の非還元末端に連続的に転移する反応を触媒する。マルトオリゴ糖を基質とした場合、 α -1,6 グルコシド結合からなるデキストラン（重合度 >100 ）と、 α -1,6 グルコシド結合と α -1,4 グルコシド結合からなるイソマルトメガロ糖（ $10 < \text{重合度} < 99$ ）を蓄積する。我々はこれまでに、マルトデキストリンを基質とした際の生成物量（デキストラン：イソマルトメガロ糖（mg/ml））が、野生型酵素では20：20であるのに対し、C末端側の配列を削除した変異酵素では6：41であることを見出した。この結果から、本酵素のC末端側にはデキストラン合成に関与する構造因子があることが示唆された。本研究ではデキストラン合成を担う構造因子を明らかにすることを目的とし、種々のC末端削除変異酵素を作製して生成物特異性を解析した。

2. 方法

C末端側から段階的にアミノ酸配列を削除した変異酵素（変異酵素A, 変異酵素B, 変異酵素Cおよび変異酵素D。削除の大きさは $D > C > B > A$ の順であり、CとDはBよりそれぞれ1残基および2残基短い。AはBより3残基長い）を作製した。変異酵素の生産には大腸菌を用い、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。酵素反応条件はマルトデキストリン 100 mg/ml を基質とし、酵素 0.10 U/ml, pH 4.2, 35°C, 6時間で行った。反応生成物からデキストラン画分とイソマルトメガロ糖画分をアルコール沈殿法により分画し、それぞれをフェノール硫酸法により定量した。

3. 結果と考察

各変異酵素の生成物量（デキストラン：イソマルトメガロ糖）は、36.3：16.0（変異酵素A）、32.8：20.7（変異酵素B）、0.6：48.3（変異酵素C）、1.9：48.3（変異酵素D）だった。この結果から、変異酵素BのC末端にデキストラン合成を担う構造因子が存在することが明らかとなった。変異酵素BのC末端アミノ酸（CT-aa）をAlaに置換した点変異酵素の生成物量（デキストラン：イソマルトメガロ糖）は3.5：57.9であり、点変異酵素の生成物特異性は変異酵素Cと同様のメガロ糖優位型であった。この結果から、本酵素のデキストラン合成能は、CT-aaがAla（サイズが小さな疎水性残基）に置換されることで大きく低下することが明らかとなった。

変異酵素C, 変異酵素Bおよび点変異酵素（変異酵素BのCT-aaをAlaに点置換）の間では比活性と温度安定性の差が見られなかったことから、CT-aaの有無が立体構造に大きな影響を与えると考えるのは考えにくい。CT-aaは触媒ドメインにないため、活性部位から離れた位置にあることが予想される。プログラムを用いた予測によると、CT-aaを含む前後の配列が二次構造を形成している確率は低く、加えて糖質結合ドメイン（CBM）に特有な配列も存在しないため、この配列がCBMとしての機能を持つ可能性は低い。しかし活性部位から離れた位置にあるアミノ酸が長鎖基質特異性に関与する例は α -アミラーゼで見つかっているため、CT-aaも同様に長鎖の受容体基質に強い親和性を示し、デキストラン合成を促進させる可能性が考えられた。