

## 腸内細菌由来 $\alpha$ -グルコシドヒドロラーゼの機能解析

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子酵素学研究室 Park Jiyeon

### 1. 背景と目的

糖質加水分解酵素は、そのアミノ酸配列類似性から、149の糖質加水分解酵素ファミリー (GH) に分類されている。ファミリーに属するタンパク質は共通祖先から分子進化した一群であり、それらのタンパク質立体構造、触媒に必須なアミノ酸残基や触媒機構は保存されているということが経験的に知られている。しかし、いくつかのファミリーでは、タンパク質構造は類似しているが、触媒残基や触媒機構が保存されていないことも知られている。それらのひとつである GH97 では、ファミリー内で触媒残基が保存されておらず、反転型触媒機構と保持型触媒機構が混在する。腸内に存在する嫌気性グラム陰性桿菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 ゲノム配列中には糖質の代謝に関わる糖質加水分解酵素をコードする遺伝子が数多く存在することが知られており、GH97 に属するタンパク質もそのゲノム中に 10 種コードされている。これらのうち、5つのパラログで機能解析がなされており、これらは反転型  $\alpha$ -glucoside hydrolase (SusB)、3種の保持型  $\alpha$ -galactosidase、保持型  $\beta$ -L-arabinopyranosidase/ $\alpha$ -galactosidase であることがわかっている。残りのパラログのうち、locus tag BT\_0683 にコードされる。タンパク質 BT0683 は、SusB と同じく触媒残基が配置されていることから、反転型  $\alpha$ -glycosidase であることを予想できる。しかし、SusB とのアミノ酸配列の一致性は 38.2% とさほど高くはなく、あらたな機能を有する可能性が考えられる。本研究では BT0683 の組換えタンパク質を大腸菌で生産し、その機能解析を行った。

### 2. 方法と結果

発現用プラスミド pHATrc の trc プロモータ下流に BT\_0683 を配置した pHAT-BT\_0683 で大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換し、組換え BT0683 を生産した。Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより組換え酵素を精製した。*p*-nitrophenyl  $\alpha$ -glucoside (pNPG)を基質として、酵素の諸性質を解析した。

GH97 酵素の特徴である  $\text{Ca}^{2+}$ イオン依存性について解析した。 $\text{CaCl}_2$ 濃度の増加とともに反応速度が増加し、10 mM  $\text{CaCl}_2$ 存在下で  $\text{CaCl}_2$ 非存在下の 570%までで飽和した。以降、すべての実験を 10 mM  $\text{CaCl}_2$ 存在下で行った。反応の至適 pH は 6.0 で、各 pH で 24 時間処理したのちに 90%以上の残存活性を示す pH 域は 4.9–9.8 であった。pH 6.0 で 15 分間温度処理後に 90%以上の残存活性を示す温度域は 50°C以下であった。pNPG を基質としたときの反応速度パラメータはそれぞれ、 $k_{\text{cat}}$  が  $4.4 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_m$  が 0.072 mM、 $k_{\text{cat}}/K_m$  が  $62 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ であった。

BT0683 をオリゴ糖に作用させ、反応速度を測定した。2 mM kojibiose もしくは nigerose に対する反応速度はそれぞれ 0.083  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 、0.014  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  であったが、2 mM maltose, isomaltose を基質とした際の速度は検出限界以下であった。また、5mg/ml amylose, 5mg/ml 澱粉, 5mg/ml デキストランに作用させた場合、デキストランのみの分解が認められた。