

Streptomyces sp.由来 β -glucosidase の D-glucose 耐性メカニズムに関する研究

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生物化学 戸塚惇子

1. 背景と目的

β -glucosidase は微生物, 植物, 動物など生物界に普遍的に存在し, β -グリコシド結合を有する少糖類および配糖体を非還元末端側から加水分解して β -glucose を生成する。cellulose 糖化におけるキー酵素であるが, 多くの β -glucosidase は生成物である D-glucose によって阻害される。このため, D-glucose によって阻害されない, すなわち D-glucose 耐性を持つ β -glucosidase は cellulose 糖化に有用である。*Streptomyces* sp. 由来 β -glucosidase は, 添加する D-glucose 濃度により活性化と阻害という 2 つの相反する挙動を示す。本研究では, *Streptomyces* sp. 由来 β -glucosidase の D-glucose 耐性メカニズムを明らかにすることを目的とした。また, 本酵素の cellulose 糖化における有用性を検証した。

2. 結果と考察

p-nitrophenyl (PNP) β -D-glucoside および PNP β -D-fucoside の分解速度を測定し, 0-400 mM D-glucose 存在による影響を解析した。D-glucose 非存在下を 100%としたとき, PNP β -D-glucoside では 100 mM で最大活性 184%となり, 400 mM で 116%となった。PNP β -D-fucoside では 60 mM で最大活性 317%となり, 400 mM で 164%となった。これは単糖が基質結合部位とは異なるエフェクターサイトに結合し, 活性化しているためだと考えた。

D-glucose 存在下での PNP β -D-fucoside に対する反応速度パラメータを測定した。D-glucose 濃度の増加に伴い K_m が上昇し, k_{cat} に変化がなかったことから, D-glucose は基質結合部位に結合する, 競争阻害剤として働くことが示された。

laminaribiose, laminaritriose および laminaritetraose を基質とし, 基質濃度の影響を解析した。laminaribiose および laminaritriose に対する反応では, 高基質濃度下において Michaelis-Menten の速度式に従わず, 反応速度の上昇がみられた。この現象は, 基質の結合部位への結合に加えて, エフェクターサイトにも結合すると予測してアロステリックモデルを想定した。laminaribiose および laminaritriose に対する反応速度は, このアロステリックモデルの速度式によく従った。一方で laminaritetraose に対する反応速度は, 通常の Michaelis-Menten の速度式によく従った。以上より, エフェクターサイトはサブサイト+3 付近に存在すると予想された。

本酵素の cellulose 糖化における有用性を確かめるために, 高濃度 cellobiose (200 mM) の加水分解を解析した。対照として, 工業用酵素 *Aspergillus niger* 由来 β -glucosidase を cellobiose に対する活性を一致させ用いた。実験条件下 72 時間の反応により, *A. niger* β -glucosidase の反応では cellobiose の分解率が 28%に留まったのに対し, 本酵素では 91%に達した。