

微生物由来 α -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 佐藤 宏樹

1. 緒言

α -グルコシダーゼは基質の非還元末端の α -グルコシド結合に作用し, α -glucose を遊離する酵素である。真核生物および原核生物の様々な生物に見出されており, 糖質の資化に関わる酵素として生物界に広く存在している。また, α -グルコシダーゼの中には糖転移活性を有するものがあり, オリゴ糖の工業的な生産にも利用されている。様々な生物起源の α -グルコシダーゼについて研究がなされてきたが, アミノ酸配列から α -グルコシダーゼの基質特異性や糖転移能を予測することは未だ困難である。本研究では既報の α -グルコシダーゼとはアミノ酸配列類似性の低い α -グルコシダーゼについて, その組換え酵素の生産および機能解析を行った。

2. 方法と結果

酵素遺伝子をクローニングし, 大腸菌を用いた組換え酵素の生産と Ni-アフィニティークロマトグラフィーによる精製を行った。精製酵素について, pH および温度の影響, 基質特異性, 各種基質に対する速度パラメーターおよび糖転移産物について解析した。

本酵素は 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (pNPG) に対して加水分解活性を示した。2 mM pNPG を基質とした際, その分解速度は pH 7.5-7.7 の間で最大であった。また, 各 pH で 4°C で 24 時間処理した後に 90%以上の残存活性を示す範囲は 6.5-9.9 であった。各温度で 15 分間処理した後に同様の残存活性の保持範囲を求めると, 30°C 以下であった。各基質 10 mM と精製酵素を反応させ, 加水分解速度を測定することで基質特異性を評価した。pNPG, maltose, nigerose および α -glucosyl-(1 \rightarrow 3)- α -glucosyl-(1 \rightarrow 4)-glucose (3GM) に対して加水分解活性を示し, その加水分解速度はそれぞれ 14.0, 0.0670, 13.4 および 19.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった。nigerose および 3GM に対する加水分解速度定数 (k_{cat}/K_m) は, それぞれ 2.90 $\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$, 3.60 $\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ であった。

pNPG を基質とした際に糖転移反応が確認された。10 mM の pNPG を基質とした場合, 糖転移産物は反応 360 分で最大 (403 μM) となり, その後は減少した。糖転移産物の単離をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで行い, その構造を NMR で解析することで糖転移産物を 4-nitrophenyl α -glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -glucopyranoside と決定した。

3. 結論

非還元末端に α -1,3-グルコシド結合を有する nigerose および 3GM を基質とした際の加水分解速度が大きかったため, 本酵素は α -1,3-グルコシダーゼであると結論づけた。本酵素は α -1,3-グルコシドにのみ高い活性を示したことから, α -1,3-グルコシドと α -1,4-グルコシドに高い特異性を有する既報の α -1,3-glucosidase とは異なるものであった。また, 3GM に対する k_{cat}/K_m 値が nigerose の 1.24 倍であることから, 本酵素はサブサイト+2 を有することが示唆された。