

Parageobacillus calodoxylosilyticus 由来 oligo-1,6-glucosidase

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 陣内 恒平

1. 目的

Parageobacillus calodoxylosilyticus にコードされる WP_017436613 (PcGH13a) は *Bacillus* sp. KM13 由来 isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyltransferase (I6GT) と 72%のアミノ酸配列一致性, 85%の配列類似性を示す。I6GTは *p*-nitrophenyl α -glucoside (pNPG) やイソマルトオリゴ糖を基質として加水分解反応および α -1,6 グルコシル糖転移反応を触媒するが主に転移反応を触媒する。すなわち 2 mM pNPG および 12 mM イソマルトース, イソマルトトリオースを基質としたときには, 全反応速度中の糖転移反応速度がそれぞれ 89%, 78%, 82%に達する。I6GT と高いアミノ酸配列類似性を示す PcGH13a も同様に高い糖転移能を持つと予測され, 保湿効果, 非う蝕性およびプレバイオティクス効果等の生理機能を保持する α -1,6 結合を有するオリゴ糖の酵素合成に利用できる可能性が期待される。

2. 方法

大腸菌を用いて組み換え酵素を生産した。組換え酵素を Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。PcGH13a の pNPG, イソマルトース, イソマルトトリオースを基質にした際の酵素反応を解析した。酵素反応によって生じる生成物を比色法および HPAEC-PAD により定量した。Quikchange 法により点変異を導入し, 変異体 C143F を調製した。

3. 結果

PcGH13a は I6GT と同様に pNPG, パラチノースおよびイソマルトオリゴ糖に対して基質特異性を示した。いずれの基質に対しても反応速度は I6GT よりも低く, 2 mM pNPG に対する反応速度は約 1/37 の 18 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった。また糖転移活性が低く, 24 mM pNPG を基質とした場合に糖転移反応生成物は観察されず, 12 mM イソマルトースおよびイソマルトトリオースを基質とした際には糖転移率が 3.7%および 4.4%であった。PcGH13a と I6GT では活性ポケットを構成するアミノ酸残基はよく保存されていたが, I6GT でサブサイト+1 に位置する Phe が PcGH13a では Cys143 に変化していた。Cys143 を Phe に置換した変異体 C143F の 2 mM pNPG に対する反応速度は 441 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ と野生型の約 25 倍に上昇した。また 2 mM pNPG および 12 mM イソマルトース, イソマルトトリオースに対する糖転移率もそれぞれ 81%, 64%, 69%と野生型と比べ大幅に上昇した。