

## *Podospora anserina* $\alpha$ -glucosidase の基質特異性に関わる

### アミノ酸残基に関する研究

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子酵素学 土谷 瑛大

#### 1. 背景と目的

$\alpha$ -glucosidase は加水分解と糖転移の 2 つの反応を触媒する。一般的に基質濃度の増加に伴い反応中の糖転移の割合（糖転移率）が増加するが、これは酵素種によって異なる。本研究では加水分解酵素という位置づけながら、低基質濃度でも高い  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グルコシル転移能を示す *Podospora anserina* 由来  $\alpha$ -glucosidase (PAG) を対象とし、基質特異性に関与するアミノ酸残基を同定することを目的とした。 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グリコシド結合特異性に関与していると予測される PAG の Glu673 残基及び His530 残基に着目し、これらの点変異酵素を解析した。

#### 2. 方法

PAG の組換え酵素をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を宿主として生産した。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、SDS-PAGE により精製度を確認した。酵素反応による糖転移生成物を HPAEC-PAD により解析した。

#### 3. 結果と考察

立体構造既知の相同タンパク質の構造ならびに多重配列アライメントの解析から Glu673 および His530 が PAG の  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グリコシド結合特異性に関与していると予測した。Glu673 および His530 を Ala 残基に置換した変異酵素 E673A および H530A を作製した。各種基質に対する反応速度を測定し基質特異性を評価した。maltose に対する反応速度を 100 としたとき、nigerose [ $\alpha$ -Glc(1 $\rightarrow$ 3)-Glc] に対する反応速度は、野生型 PAG で 47 であるのに対し、E673A および H530A ではそれぞれ 78, 106 と変化していた。このことから E673A および H530A は PAG の  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グリコシド結合特異性に関わるアミノ酸残基であることがわかった。また、糖転移反応においては E673A で WT と比べて糖転移産物である 3<sup>H</sup>-O- $\alpha$ -D-glucosyl maltose の生成物量が少なくなっていることがわかった。糖転移反応においても Glu673 が結合位置特異性に影響を与えているということがわかった。