

マルトシドホスホリラーゼ Blon_0282 の酵素機能とその利用 および反応特異性に関わるアミノ酸残基に関する研究

共生基盤学専攻 食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学 小谷 真由

1. 背景と目的

糖質加水分解酵素ファミリーGH13 は、 α -アミラーゼを始めとした α -グルカンに作用する酵素により構成されている。共通した触媒部位の構造を有するが、GH13 には加水分解酵素、糖転移酵素および加リン酸分解酵素が含まれており機能的に多様である。中でも、加リン酸分解酵素は GH13 においてごく少数であり、加リン酸分解活性が発現する分子機構に対する理解は十分ではない。GH13 加リン酸分解酵素の一つであるマルトシドホスホリラーゼ (MP) は、サブファミリー3 (GH13_3) に分類される。MP は Pi 存在下で α 1-4 グルカンを加リン酸分解して α -マルトース 1-リン酸 (α -Mal1P) を生成する。Pi 非存在下ではマルトシル転移反応を触媒する。本研究では *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* 由来 GH13_3 タンパク質 Blon_0282 の酵素化学的諸性質の解析と、酵素利用による長鎖多糖合成を行った。さらに、推定リン酸結合残基への部位特異的変異導入により反応特異性を改変した。

2. 結果と考察

組換え Blon_0282 を大腸菌より調製した。可溶性澱粉を基質とし、Pi 存在下で α -Mal1P を生成したことより、本酵素は MP 活性を持つことが確認された。マルトオリゴ糖 (Gn, n は重合度) G2-G7 に対する反応を調べた。Pi 非存在下では G7 に対し、マルトシル転移による鎖長不均化を示した。10 mM α -Mal1P 存在下で、加リン酸分解の逆反応 (以下逆反応) について解析した。G2-G7 を受容体とした k_{cat}^{app}/K_m^{app} は鎖長依存的に増加し、G4 以上に対し高い受容体特異性を示した ($0.523\text{--}426\text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)。10 mg/mL 多糖すなわちアミロース ($\overline{DP}17$)、可溶性澱粉、デキストリン (DE4)、 β -リミットデキストリンおよびグリコーゲンを受容体とした逆反応速度は、10 mM G5 を受容体とした反応速度 (337 s^{-1}) を上回った ($398\text{--}1120\text{ s}^{-1}$)。これら多糖と 100 mM α -Mal1P を平衡に達するまで反応させた。27-37 mM Pi と不溶性多糖が生成した。受容体多糖と不溶性多糖の分岐鎖の鎖長分布を、蛍光標識キャピラリー電気泳動により解析した。重合度 10 程度の分岐鎖が顕著に減少し、重合度 30-40 程度の分岐鎖が増加した。5 mM pNPG5 存在下での加リン酸分解および糖転移反応速度より Pi 濃度依存性を解析した。反応速度より加リン酸分解反応と糖転移反応の比率を表す速度論的定数を求め、本酵素において糖転移反応は加リン酸分解反応より優勢であると判断された。次に、推定リン酸結合残基 Asn382, Tyr387 および Asn425 の変異酵素 (N382A, Y387A および N425A) を解析した。10 mM α -Mal1P, G5 に対する逆反応における比活性 (Pi 生成速度) は、野生型では 255 U/mg に対し、N382A では 0.693 U/mg, Y387A は 4.41 U/mg, N425A は 0.300 U/mg であった。リン酸に対する親和性を評価するため、加リン酸分解反応の Pi に対する k_{cat}^{app}/K_m^{app} (5 mM pNPG5 存在下) および逆反応の α -Mal1P に対する k_{cat}^{app}/K_m^{app} (50 mM G5 存在下) を比較した。全ての変異酵素において Pi および α -Mal1P に対する k_{cat}^{app}/K_m^{app} は大幅に低下した。5 mM pNPG5 を基質とした反応速度より加リン酸分解反応と糖転移反応の比率を表す速度論的定数を求め、N382A および N425A では加リン酸分解に対する特異性の低下が確認された。なお、興味深いことに G7 および可溶性澱粉に対し野生型酵素では加水分解活性が観察されなかったが、変異酵素では僅かながらも明確な加水分解活性を示した。以上より、本研究ではリン酸結合残基の改変により反応特異性の改変が可能であると示された。