

α -グルカンに作用する加水分解酵素 AmyL および糖転移酵素 BfGS の機能と糖質合成への応用に関する研究

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 藤岡 郁美

1. 背景と目的

澱粉やグリコーゲンなどの α -グルカンは、生物における貯蔵多糖などとして自然界に豊富に存在することから、糖質合成の出発原料として有用である。本研究では、 α -グルカンの代謝に関連する酵素として、加水分解酵素 α -アミラーゼおよび糖ヌクレオチド依存性糖転移酵素グリコーゲンシンターゼ (GS) に着目した。 α -アミラーゼは、 α -グルカン内部の α 1-4 結合を加水分解する酵素であり、様々な産業で利用されている。GS は、UDP グルコース (UDPG) のグルコシル基をグリコーゲンの非還元末端に転移するが、この逆反応により α -グルカンと UDP から UDPG を生じる。本研究では、これらの酵素の機能解析を通して、新たな酵素的知見を得るとともに希少オリゴ糖や糖ヌクレオチドの合成利用の可能性を見出した。

2. 結果と考察

1) AmyL の糖転移能および $\beta \rightarrow \alpha$ ループ8の機能 *Bacillus* sp. AAH-31 株由来 α -アミラーゼ (AmyL) は、糖質加水分解酵素群 GH13_20 に分類される。ネオプルラーゼをはじめとする GH13_20 酵素の多くは加水分解反応に加えて糖転移反応を触媒する。まず AmyL による糖転移を解析した。マルトトリオース (Glc3) に長時間反応させると、生成物の中にネオトレハロースおよび α 1-3 グルコシルマルトースが確認された。従って AmyL は、 β 1 位および3 位水酸基への単糖転移活性を示し、AmyL の転移活性を利用した希少糖合成の可能性が示された。単糖転移は Glc4 に対しては見られなかったが、Glc5 では認められなかった。次に、AmyL の $\beta \rightarrow \alpha$ ループ8における特異的挿入配列 (N686-R694) の欠失酵素 Δ 9の転移活性を解析した。 Δ 9 は、Glc3-Glc5 いずれに対しても顕著な転移活性を示し、野生型酵素と異なり二糖および三糖単位での転移を触媒した。すなわち、N686-R694 の削除により、AmyL を他の GH13_20 の主要酵素ネオプルラーゼ様の活性に変換した。また興味深いことに、 Δ 9 では γ -シクロデキストリン (γ -CD) に対する k_{cat}/K_m 値が顕著に低下し、AmyL の $\beta \rightarrow \alpha$ ループ8が γ -CDの加水分解に重要であることが明らかになった。

2) BfGS の生化学的諸性質および UDPG 合成 GS は、糖転移酵素群 GT3 および GT5 に分類される。GT3 酵素の機能は、真核生物由来 GS では明らかにされているが、細菌由来 GT3 タンパク質では知られていない。本研究では、*Bacteroides fragilis* NCTC9343 株由来の GT3 タンパク質 BF9343_2657 (BfGS) の機能を解析し、本酵素による糖ヌクレオチドの合成を検討した。組換え BfGS はグリコーゲンおよび UDPG を基質とし、GS 活性を示した。本酵素は、30°C 以下 (pH 7.0, 15 分間), pH 5.0-8.2 (4°C, 24 時間) で安定であった。至適温度は 37°C, 至適 pH は 7.6 であった。活性には Mg^{2+} などの金属イオンを必要とせず、真核生物由来 GS 様の Glc6P による活性化は認められなかった。Glc1-Glc5 および多糖 (グリコーゲン, β -限界デキストリン (β -LD), 可溶性澱粉 (SS) および短鎖アミロース) を糖受容体とし、試験条件では Glc4 および β -LD に特によく作用した。よく作用するオリゴ糖や多糖分岐鎖が比較的短鎖である点で、BfGS は既知の GT3 の GS とは明確に異なっていた。SS を基質とした UDPG 生成反応 (pH 5.0) では、添加した UDP に対して 2.0% の UDPG を生じた。本酵素による澱粉を基質とした UDPG 合成と、他の糖転移酵素による配糖体合成とを組み合わせ、低コストな配糖体合成系の構築が期待される。