

イノシトール遊離能をもつフィターゼ Phy9-3B の触媒機構の解明

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 基礎環境微生物学 武生みのり

1. はじめに

フィチン酸 (IP6) は, イノシトール環に 6 つのリン酸基がモノエステル結合した化合物であり, 麦や大豆などの植物種子中における主要なリン酸貯蔵形態である。IP6 から無機リン酸を段階的に遊離させる酵素であるフィターゼは, 豚や鶏などの単胃動物のリン利用効率を改善するために家畜飼料に添加されているが, その多くは最終生成物をイノシトール 1 リン酸 (IP1) としており, IP6 の 6 つのリン酸基全てを加水分解することはできない。一方で, 当研究室にて単離された *Klebsiella pneumoniae* 9-3B 株由来のフィターゼ Phy9-3B は, IP6 を完全に分解することができる。そこで本研究では, イノシトール遊離能をもつ Phy9-3B の触媒機構の解明を目的とし, ①最終生成物決定に関与するアミノ酸残基の特定と②H-NMR を用いた反応中間体の特定の 2 つを試みた。

2. 方法

①Phy9-3B とイノシトール遊離能をもたないことが報告されている大腸菌由来のフィターゼ AppA との間で立体構造比較をした結果, 基質結合部位における IP1 との相互作用に Tyr238 が関わっていると予想された。そこで, Phy9-3B の Tyr238 は, イノシトールの遊離に必須であると仮定し, 本アミノ酸残基とこれに対応する AppA 上のアミノ酸残基 Phe254 を交換した 1 アミノ酸残基置換体 Phy9-3B^{Y238F} 及び AppA^{F254Y} を作成した。実験の精度を高めるために, 酵素純度が 95% 以上になるまで精製後, IP6 と IP1 の 2 つの基質に対する生化学的試験を行った。

②Phy9-3B 及び AppA 酵素の反応中間体を特定するため, H-NMR を用いて IP6 を基質とした際のフィターゼ触媒下の基質変化を 15 分ごとにスペクトルを記録することで, 経時的に追跡した。そして, その結果を元に, 反応が大きく進んだ地点の前後にて分刻みで熱処理にて酵素反応を停止した試料を作成し, 更なる解析を行った。必要に応じて 2 次元解析 (DQF-COSY 及び ¹H-³¹P-HMBC) も行った。

3. 結果と考察

①フィターゼ活性試験の結果から IP6 に対する IP1 の相対活性値を算出したところ, 1 アミノ酸残基置換により Phy9-3B ではこの値が増加し, AppA では低下したことがわかった。また, イノシトール遊離活性においても, 基質が IP6 の場合には, Phy9-3B^{Y238F} は基質の 95.4% をイノシトールまで分解したのに対し, Phy9-3B では 90.8% しか分解できなかった。これらから, Phy9-3B の基質結合部位における Tyr238 は必ずしもイノシトール遊離能に必須なアミノ酸残基とは言えず, むしろ反応中間体であるイノシトールリン酸の基質認識に関与している可能性が示唆された。

②H-NMR による反応中間体の追跡の結果, Phy9-3B の酵素反応は (a) IP6 → IP1 と (b) IP1 → イノシトールの 2 段階に分かれていた。(a) の反応は短時間で激しく進行し, 基質である IP6 はほとんど反応中間体を経ず IP1 まで分解され, 全てが IP1 に変化後, (b) の反応へ穏やかに移行した。その一方で, AppA はリン酸基を 1 つずつ段階的に遊離することで, 特定の反応中間体を生みだし, Phy9-3B に比べて時間をかけながら最終生産物である IP1 まで分解していった。これらのことから, AppA はリン酸基を外す度に基質を放出する反応機構であるのに対し, Phy9-3B は 1 度基質が活性部位に結合したら IP1 に分解するまで放出しない反応機構である可能性が示唆された。