

デキストリンから環状イソマルトオリゴ糖を生成する *Thermoanaerobacter siderophilus* 由来マルチドメインタンパク質の各ドメインの機能に関する研究

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生物化学 竹田 夏美

1. 背景と目的

環状イソマルトオリゴ糖 (CIn, nは重合度) は, Glycoside hydrolase (GH) family 66 に属する CI 合成酵素 CITase によってデキストラン (α 1-6 グルカン) から生産される。CIn は低分子化合物の包接や齧歯の抑制などの作用を持つ。 *T. siderophilus* 由来 TsGT-CIT は, 推定 1559 残基からなるタンパク質であり, 一次構造から 3 ドメイン, A (GH66), B (Carbohydrate-Binding Module 35, CBM35) および C (GH15) を含むと推定される。ドメイン A は CITase 活性を持つ。ドメイン B は *Bacillus circulans* T-3040 由来 CITase の CBM35 と 53% の配列同一性を, ドメイン C はデキストリン (α 1-4 グルカン) からデキストランを生成するデキストランデキストリナーゼ (DDase) と 34% の配列同一性を示す。本研究では, TsGT-CIT の各ドメインの機能と協調的な作用を明らかにすることを目的として, 全長酵素 (TsGT-CIT_ABC), ドメイン A 欠失酵素 (TsGT-CIT_BC) ならびにこれらのドメイン B 変異酵素 (TsGT-CIT_AbC および TsGT-CIT_bC) の機能を解析した。

2. 結果と考察

1) **全長酵素 (TsGT-CIT_ABC) の生成物の解析** TsGT-CIT_ABC をデキストラン, 可溶性澱粉 (SS) および G5 (マルトオリゴ糖, Gn) に作用させた。デキストランのみならず, SS および G5 から CI7-9 の生成が見られた。

2) **GH15 ドメインの機能解析** TsGT-CIT_BC の各基質への初期反応では, Gn ($n \geq 3$) に対しては α 1-4 転移, G2 およびイソマルトオリゴ糖 (IGn) に対しては α 1-6 転移を主として触媒した。TsGT-CIT_BC の SS への反応を追跡した。まず加水分解によるグルコース (Glc) の遊離が見られた。その後は Glc に対する連続的な α 1-6 転移による IGn が主として生成した。G5 への反応を追跡した。まず α 1-4 グルコシル転移による G5 の鎖長不均化とデキストランの生成が見られた。その後, G2 の蓄積に伴い, G2 への α 1-6 転移によるパノース (Pan) および Pan に α 1-6 転移した一連のグルカンが生成した。加水分解および G2 が糖供与体となる反応で遊離した Glc が蓄積すると, Pan に由来する一連の α 1-6 グルカンは消失して IGn が生成した。IGn は加水分解され, 反応時間の経過に伴い低分子化した。TsGT-CIT_ABC の同基質に対する反応の推移は, TsGT-CIT_BC と同様であったが, 顕著なデキストランの生成は見られなかったことから, ドメイン A により多糖生成物は即座に CI に変換されたと考えられた。上記 G5 に対する反応の推移は, 各糖受容体に対するグルコシル転移生成物の結合特異性, および SS に対する反応生成物により理解された。

3) **CBM35 ドメインの機能解析** CBM35 ファミリーに保存される糖結合残基 His771, Trp838 および Asn870 を全て Ala に置換したドメイン B 変異酵素 TsGT-CIT_AbC および TsGT-CIT_bC を作製し, 機能を親酵素と比較した。多糖含有ゲルを用いた Native-PAGE では, 特にデキストラン結合能の低下が示された。SS およびデキストランに対する加水分解反応の k_{cat}/K_m 値も 50% 以下であった。したがって, CBM35 は SS およびデキストランとの生産的結合の向上に寄与すると判断された。ただし, ドメイン A を欠いた TsGT-CIT_BC と TsGT-CIT_bC では k_{cat}/K_m 値に大きな差異はなかった。CBM35 の基質結合は, ドメイン A を含む立体構造が重要であると推定された。