

学 位 論 文 題 名

植物起源 α -glucosidase の活性部位一次構造に
関する研究

学位論文内容の要旨

近年の遺伝子工学の発展により、酵素の触媒機能や生理活性を持つタンパク質の作用機構を解明するための情報量が多くなってきた。一方、アフィニティーラベリングは従来からの化学修飾法の1つであり、酵素反応に直接関与する活性解離基あるいは反応部位近傍のアミノ酸残基を同定するために有力な方法である。これらの手法は相互に連携し合うことにより、酵素反応機構の解明、酵素反応触媒部位の同定もしくは酵素機能の改変へも応用できる可能性をもたらしている。

本研究は植物 α -glucosidase、すなわち、テンサイ、ソバおよびコメ起源の各酵素について酵素活性に直接関与する活性解離基をアフィニティーラベリング法により修飾した。また、これらのうちマルトースよりもデンプンに対する水解速度の方が大きいglucoamylaseに類似の加水分解作用を示すテンサイ α -glucosidaseについて、タンパク質工学および遺伝子工学的方法を用いて、活性アミノ酸残基を含む活性部位近傍のアミノ酸配列および全一次構造の解析を行い、他の糖質加水分解酵素の一次構造との関連を考察した。研究の結果は以下のように要約される。

(1) 植物 α -glucosidaseのconduritol B epoxide (CBE) による化学修飾

種々の植物起源 α -glucosidaseについては、反応速度論および化学修飾試薬を用いた研究により、触媒作用において2つのカルボキシル基 ($-\text{COO}^-$, $-\text{COOH}$) の関与が提唱されているが、反応部位における活性解離基のアミノ酸残基や一次構造上の位置を特定するためには、この残基と特異的に結合する試薬で酵素を修飾する必要がある。本実験では、アフィニティーラベリング試薬のCBEを使用した。CBEはその構造上、酵素の触媒機構かそ

れに類似の機構に従って活性部位のAsp残基あるいはGlu残基のカルボキシレート ($-COO^-$) と特異的に結合する。

植物起源 α -glucosidase (テンサイ、ソバ、コメ) について、CBEによるアフィニティーラベリングを行い、CBE濃度と経時的失活から算出される見かけの一次速度定数、 k_{obs} 、の関係を見るといずれの酵素においても飽和曲線が得られ、酵素とCBEがMichaelis-Menten型の酵素-基質複合体を形成する酵素反応と同様の反応中間体を形成した後、共有結合複合体を生じていることが考えられた。さらに、いずれの酵素についても1分子あたりCBE1分子の結合が確認され、また、 K_i 値の40倍以上の濃度のTrisを共存させた実験において、酵素がCBEの修飾から保護されることを確認した。部分修飾酵素の K_m 値は変化せずに、 V 値のみの減少が認められた。

(2) テンサイ α -glucosidaseの活性解離アミノ酸残基の同定と活性部位一次構造の解析

アフィニティーラベリングによる修飾酵素のCBE結合アミノ酸残基を調べることにより、本酵素の活性解離アミノ酸残基を同定することができる。また、これを含むペプチドのアミノ酸配列を調べることにより、活性部位の部分一次構造を決定することが可能である。

テンサイ α -glucosidaseを 3H ラベルCBEにより修飾後、Lysyl Endopeptidaseを用いて断片化した。HPLCで放射性ペプチドを単離し、ペプチドシーケンシングによりアミノ酸残基の配列を解析したところ、13残基が決定され、それ以降の解読は不可能であった。非修飾酵素を同様に処理し、上記ペプチドに相当する断片を解読したところ、30アミノ酸残基の全てが解析され、その1~13残基の配列は放射性ペプチドの結果に一致した。したがって、CBEは14番目のAspに結合したものと考えられた。このAsp以降の配列が解読されない理由として、*cis*-ヒドロキシルグループの分子内触媒反応によりscyllo-inositolとAspの β -カルボキシル基間のエステル結合の求核性の解裂反応により4員環ピロアスパルテートが形成されるものと推定された。

テンサイ α -glucosidaseの酵素反応部位の30アミノ酸残基の一次構造は、他起源の酸性 α -glucosidaseの活性部位一次構造と非常に高い相同性を示した。テンサイ酵素の14番目のAspに相当する他起源 α -glucosidaseのAsp残基はいずれも活性に必須なアミノ酸残基と推定されているものである。全体から判断して、特に下記

— DGIWIDMNE —

の配列に相同性が高い。すなわち、この領域は酸性 α -glucosidaseにおける共通の保存配列であることが示唆された。

(3) テンサイ α -glucosidase の cDNA のクローニングおよび塩基配列の決定

テンサイ α -glucosidase の活性中心の配列が全体のいずれの位置に存在するか、また、amylase family と同様に糖質加水分解酵素に特有の保存領域が存在するかどうかを確認するために、 α -glucosidase の cDNA のクローニングを行った。

テンサイ葉身細胞より懸濁培養細胞を調製し、緑色系培養細胞および白色系培養細胞を誘導した。このうち α -glucosidase の発現が認められた白色培養細胞から本酵素の遺伝子発現時期の特定を行った。ここから常法により調製したライブラリーより、 α -glucosidase をコードする cDNA を pSBAG1 上にクローニングし、2,766 塩基のオープンリーディングフレームを明らかにした。それらの塩基配列に基づいて 921 アミノ酸残基からなる本酵素のアミノ酸配列を決定した。本研究によって植物起源 α -glucosidase の全一次構造がはじめて明らかにされた。

テンサイ α -glucosidase の推定アミノ酸配列を他起源 α -glucosidase のアミノ酸配列と比較したところ、*Aspergillus niger* α -glucosidase および *Schwanniomyces occidentalis* α -glucosidase の 610 前後から 670 前後にかけての約 65 アミノ酸残基が欠除していた。しかし、同様な事実はヒトやウサギの動物起源酵素についても認められる。一方、806 から 865 にかけての 60 アミノ酸残基はテンサイ α -glucosidase にのみ認められ、他起源酵素と大きく異なる特徴である。本酵素の活性部位部分一次構造のうち、特に他起源酵素との相同性の高い -DGIWIDMNE- の 9 アミノ酸残基の配列は 466 から 474 の位置に存在することが確認された。これは推定されるテンサイ α -glucosidase の全体的アミノ酸配列のほぼ中間に位置すると考えられる。

α -amylase family の一次構造中には 4 箇所の高い保存領域があるが、本酵素にはこれらのうちの 2 番目の相同領域のみが認められた。この部分の一次構造は上述の活性解離基の Asp 残基を含む配列であり、多くの糖質分解酵素に共通する機能上重要な領域と思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 本 間 守

副 査 助教授 松 井 博 和

学 位 論 文 題 名

植物起源 α -glucosidase の活性部位一次構造に関する研究

本論文は、和文109頁、図43、表7、5章からなり、ほかに参考論文3編が付されている。

α -glucosidaseは、 α -amylaseや β -amylaseなどの加水分解作用によりデンプンから生成したオリゴ糖をブドウ糖にまで分解する酵素として植物のデンプン代謝系において重要な位置を占めている。しかしこれまで植物起源の α -glucosidaseの構造についてはほとんど解析がなされていない。

本研究は、数種の植物 α -glucosidaseの加水分解活性発現に直接関与する活性解離基を化学修飾し、その修飾反応機構の反応速度論的解析を行ない、またこれらの酵素のうち特にテンサイ α -glucosidaseについてタンパク質工学および遺伝子工学的手法により、活性解離基を含む活性部位近傍のアミノ酸配列ならびに本酵素の全一次構造の解析を行ったものである。研究の結果は、以下のように要約される。

1. 植物 α -glucosidaseのconduritol B epoxide (CBE) による化学修飾

テンサイ、ソバおよびコメ α -glucosidaseをそれぞれ未発芽種子から単一な標品にまで精製した。これらの酵素の活性解離基は、反応速度論的解析によってカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) とカルボキシレート基 ($-\text{COO}^-$) であることが推定されている。各酵素をアフィニティーラベリング試薬であるCBEを用いて化学修飾した。CBEは α -glucosidaseや β -glucosidaseの触媒反応における基質の反応中間体と構造的に類似しており、活性部位のAspあるいはGlu残基のカルボキシレート基 ($-\text{COO}^-$) と特異的に反応して酵素を失活させる試薬として知られている。

テンサイ、ソバおよびコメ α -glucosidaseのCBEによる失活反応の速度論的解析結果は、酵素とCBEの反応が通常のMichaelis-Menten型の酵素-基質複合体を形成する酵素反応と同様の反応中間体を形成した後、共有結合複合体 (scyllo-inositol ester) を生じ失活すると推定された。いずれの酵素の修飾反応においても酵素1分子当りCBE1分子の結合が確認され、部分修飾酵素の K_m 値 (Michaelis定数) は変化せず、 V 値 (最大速度) のみの減少が認められた (All or None型失活反応)。

2. テンサイ α -glucosidase の活性部位一次構造の解析

^3H ラベルCBEを合成し、テンサイ α -glucosidase (分子量: 91,000) を修飾後、Lysyl Endopeptidaseを用いて断片化した。それらの断片化ペプチドから逆相HPLCにより約30アミノ酸残基の放射性ペプチドを単離し、ペプチドシークエンサーによりアミノ酸配列を解析した。このペプチドのN末端から14番目のAsp (D) 残基 (RFRDILPIDGIWIDMNEASNFITSAPTPGS) のCBEによる修飾が確認され、このAsp残基が本酵素の活性発現に直接関与しているアミノ酸残基の一つであることが明らかとなった。また、本酵素の活性部位を含む約30残基ペプチドの一次構造は、他起源の α -glucosidase の活性部位近傍の一次構造と高い相同性を示し、特にこの配列中の - DGIWIDMNE - 部分は α -glucosidaseに限らず α -amylaseやその関連酵素の活性部位に共通した相同性の高い保存領域である。

3. テンサイ α -glucosidase のcDNAクローニングおよび塩基配列の決定

テンサイ葉身細胞より懸濁培養細胞を調製し、緑色および白色系培養細胞を誘導し、 α -glucosidaseの発現が認められた白色培養細胞から本酵素の遺伝子発現時期を調べた。精製酵素のLysyl Endopeptidase分解により得られた2種のペプチドのアミノ酸配列 (10残基) に基づきオリゴヌクレオチドプライマーを作成し、常法により調製したライブラリーより α -glucosidaseをコードするcDNAを組換え体プラスミド (pSBAG1) 上にクローニングした。得られたcDNAの塩基配列を解析することにより、2,766塩基のオープンリーディングフレームを明らかにした。それらの塩基配列に基づいて921のアミノ酸残基からなる本酵素の全一次構造を推定した。

テンサイ α -glucosidaseの推定全アミノ酸配列は、哺乳動物 (ヒト、ウサギ) の肝臓や小腸粘膜に存在する α -glucosidaseのアミノ酸配列と高い相同性がみられ、これらの酵素は共に共通の祖先から進化してきたものと推定される。活性部位に存在する - (466) DGIWIDMNE - の9アミノ酸残基の配列は全アミノ酸配列のほぼ中央466から474番目に位置しているが、806 (R) から865番目に存在する60アミノ酸残基の配列は本酵素にのみ認められ、他起源の α -glucosidaseには全く見られない特徴的な配列である。

以上のように本研究は、テンサイ α -glucosidaseの活性発現に直接関与するアミノ酸残基および活性部位近傍のアミノ酸配列を解析すると共に、植物 α -glucosidaseとしてその全一次構造をはじめて明らかにしたものである。それらの成果は、学術的に高く評価されます。

よって審査員一同は、別に行った最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者岩波俊介は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格あるものと認定した。