

学位論文題名

トラマメ (*Phaseolus vulgaris* L.cv Toramame) 登熟種子

Branching enzyme の構造と機能に関する研究

学位論文内容の要旨

植物種子に貯蔵される澱粉は粒を形成し、主にアミロースとアミロペクチンからなる。アミロースはグルコースが α -1,4結合により直鎖状に結合した多糖で、アミロペクチンは α -1,4結合のほかに α -1,6結合の分岐構造を持つ多糖である。両成分の比やそれぞれの性質が、澱粉の性質の決定に大きくかかわっている。分岐構造の形成に関与する酵素は Branching enzyme (EC 2.4.1.18) と呼ばれ、アミロース等のグルコースが直鎖状に結合した鎖を切断し、断片を転移して枝を作るところから枝づくり酵素とも呼ばれている。Branching enzyme の詳細な研究は近年になって開始され、イネやトウモロコシ等の単子葉植物に比較して、双子葉植物では知見は極めて少ない。本論文は澱粉を貯蔵するトラマメの Branching enzyme について、精製と精製酵素の性質、酵素をコードする cDNA の単離と塩基配列の決定、大腸菌による発現、種子の成熟に伴う澱粉粒の形態変化と酵素活性の消長の観察等の実験結果を述べ、澱粉粒形成と Branching enzyme との関係を明らかにしたものである。

1. トラマメ Branching enzyme の精製

電気泳動ゲル上に分離された Branching enzyme の活性染色法を考案し、トラマメ種子の登熟時期における活性の変化を調査した。その結果、登熟初期から中期に現れる酵素と後期に現れる酵素のバンドを見つけた。初期から中期に出現する酵素は2種類に分けられ、それぞれを精製した (KBE1, KBE2)。分子量は、75,000 (KBE1) と 73,000 (KBE2)、アミロースに対する K_m は 0.62 mg/ml (KBE1) と 0.36 mg/ml (KBE2)、温度安定性は KBE2 が高く、20℃以下の低温における活性は KBE1 が高い、などの差が認められた。他方、N末端アミノ酸配列は解析した 25 残基で完全に一致し、クエン酸による活性促進、2価カチオンによる活性阻害で両酵素に差がなく、また共にアミロースからグルコース鎖長 8～10 の枝を主として持つアミロペクチンを合成した。以上の結果を総合して KBE1 と KBE2 は同一遺伝子の産物であると推定した。

2. cDNA の単離と塩基配列の決定

登熟中期のトラマメ種子から mRNA を抽出し、cDNA ライブラリーを調製した。一方、精製酵素 KBE1 を酵素分解して分離されたペプチドのアミノ酸配列を調べ、全配列の約 25 % を解析した。その配列を用いて、cDNA ライブラリーから2種の cDNA を分離した。その一方は全長 3,360bp から

成り内部に 870 アミノ酸残基をコードし、その配列は KBE1 で解析された配列全てを含んでいた。他方は全長 2,732bp で内部に 847 アミノ酸残基をコードし、その残基の 49 %のみが前者と同一で、明らかに異なる酵素をコードしており KBE3 とした。両者共に、KBE1 の N 末端より上流にあって、アミロプラストへ移行する時に作用するペプチドの配列を含み、更に α -Amylase ファミリーに共通した 4 ヶ所の保存領域を含んでいた。分離された cDNA の配列を用いて、登熟過程にある種子から抽出した RNA を分析した結果、KBE1 をコードする mRNA は登熟初期から中期に増加し、KBE3 をコードする mRNA は中期から後期に増加した。KBE1 に関する結果は酵素活性の分析結果と一致し、KBE3 の結果は登熟後期に現れた活性バンドが KBE3 であることを示唆した。

3. 大腸菌における大量発現系の構築

分離された cDNA はそれぞれ発現ベクターを用いて大腸菌に導入し、酵素活性を発現させた。大腸菌の培養 1 ℓ から KBE1 は 13.3 mg、KBE3 は 2.6 mg が精製された。精製酵素の性質は KBE1 に関しては種子から精製された酵素と等しい性質を示した。KBE3 は KBE1 とは異なる性質を示し、アミロースから合成されるアミロペクチンの枝は KBE1 に比較して長い鎖長（グルコース鎖長 12-34）であった。

4. 登熟種子澱粉粒の顕微鏡観察

登熟過程にあるトラマメ種子から澱粉粒を調製し、粒の形態を顕微鏡で観察した。登熟初期には小さい球形の粒が観察され、中期にかけては突起を持った構造や三角形、Y 字型などの不定形の粒が大部分を占めた。この突起部分ではアミロペクチンの性質が強く現れていることがヨード染色によって判明し、この時期に現れる KBE1 が活動していると推定された。また、ヨード呈色は粒の中心部分はアミロースの分布が高いことも示した。成長した澱粉粒は後期には球形になり、同時に小さい球形の粒の出現が認められた。これらの観察からトラマメ種子の登熟初期から中期にかけて、澱粉粒は突起状に成長して不定形の粒となり、この時期に短い鎖の枝を形成する KBE1 および、その修飾形の KBE2 が活発に働き、中期から後期にかけて澱粉粒が球形に完成していく時期に KBE3 が現れ、長い鎖長の枝を形成しているという結論に達した。

以上の結果から、1) トラマメの Branching enzyme は性質の明らかに異なる 2 種類の酵素を含むこと、2) 登熟初期から中期にかけて出現する酵素は同一遺伝子の産物と推定される 2 種を含み、比較的短い鎖長の枝を形成すること、3) この酵素の出現は澱粉粒が突起を形成して不定形の粒に成長する時期に一致すること、4) 不定形の粒が球形に整えられる登熟の中期から後期に別種の酵素が出現し比較的長い鎖長の枝を形成することを明らかにした。更にこれらの酵素のアミノ酸配列を cDNA の分析によって決定し、cDNA を用いて大腸菌に大量発現させることに成功した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 本 間 守
副 査 教 授 千 葉 誠 哉
副 査 助 教 授 松 井 博 和

学 位 論 文 題 名

トラマメ (*Phaseolus vulgaris* L.cv Toramame) 登熟種子

Branching enzyme の構造と機能に関する研究

本論文は、序論と総合考察を含めて6章で構成され、図 84、表 12、引用文献 68 を含む 161 頁の和文論文である。別に参考論文 2 編が添えられている。

澱粉は主にアミロースとアミロペクチンからなる。アミロースはグルコースが一種類の結合により直鎖状に結合した多糖で、アミロペクチンは分岐構造を持つ多糖である。分岐構造の形成に関与する酵素は Branching enzyme(EC 2.4.1.18) と呼ばれ、アミロース等のグルコースが直鎖状に結合した鎖を切断し、断片を転移して枝を作るところから枝づくり酵素とも呼ばれる。Branching enzyme の詳細な研究は近年になって開始され、イネやトウモロコシ等の単子葉植物に比較して、双子葉植物では研究は極めて少ない。本論文は澱粉を貯蔵するトラマメの Branching enzyme について、精製と精製酵素の性質、酵素をコードする cDNA の単離と塩基配列の決定、大腸菌による発現、種子の成熟に伴う澱粉粒の形態変化と酵素活性の観察等の実験結果を述べ、考察を加えたものである。

1. Branching enzyme の電気泳動ゲル上の活性染色法を考案し、トラマメ種子の登熟時期における活性の変化を調査した。その結果、登熟初期から中期に現れる酵素と後期に現れる酵素のバンドを見つけた。初期から中期に出現する酵素は2種類に分けられ、それぞれを精製した (KBE1, KBE2)。分子量は、75,000 (KBE1) と 73,000 (KBE2)、アミロースに対する K_m は 0.62 mg/ml (KBE1) と 0.36 mg/ml (KBE2)、温度安定性および 20 °C 以下の低温における活性に両酵素間の差が認められた。他方、N末端アミノ酸配列は解析した 25 残基で完全に一致し、クエン酸による活性促進、2価カチオンによる活性阻害で両酵素に差がなく、また共にアミロースからグルコース鎖長 8 ~ 10 の枝を持つアミロペクチンを合成した。以上の結果を総合して KBE1 と KBE2 は同一遺伝子の産物であると推定した。

2. 登熟中期のトラマメ種子から mRNA を抽出し、cDNA ライブラリーを調製した。精製酵素 KBE1 のアミノ酸配列を部分的 (約 25 %) に解析し、その配列を用いて、cDNA ライブラリーから2種の cDNA を分離した。その一方

は 870 アミノ酸残基をコードし、その配列は KBE1 で解析された配列全てを含んでいた。他方は 847 アミノ酸残基をコードし、その残基の 49 % のみが前者と同一で、明らかに異なる酵素をコードしており KBE3 とした。両者共に、KBE1 の N 末端より上流に、アミロプラストへ移行する時に作用するペプチドの配列と α -Amylase ファミリーに共通した 4 ヶ所の保存領域とを含んでいた。分離された cDNA の配列を用いて、登熟過程にある種子から抽出した RNA を分析した結果、KBE1 をコードする mRNA は登熟初期から中期に増加し、KBE3 をコードする mRNA は中期から後期に増加した。KBE1 に関する結果は酵素活性の分析結果と一致し、KBE3 の結果は登熟後期に現れた活性バンドが KBE3 であることを示唆した。

3. 分離された cDNA はそれぞれ発現ベクターを用いて大腸菌に導入し、酵素活性を発現させた。大腸菌の培養 1 l から KBE1 は 13.3 mg、KBE3 は 2.6 mg が精製された。精製酵素の性質は KBE1 に関しては種子から精製された酵素と等しい性質を示した。KBE3 は KBE1 とは異なる性質を示し、アミロースから合成されるアミロペクチンの枝は KBE1 に比較して長い鎖長であった。

4. 登熟過程にあるトラマメ種子から澱粉粒を調製し、粒の形態を顕微鏡で観察した。登熟初期には小さい球形の粒が観察され、中期にかけては突起を持った構造や三角形、Y 字型などの不定形の粒が大部分を占めた。この突起部分ではアミロペクチンの性質が強く現れていることがヨード染色によって判明し、この時期に現れる KBE1 が活動していると推定された。成長した澱粉粒は後期には球形になり、同時に小さい球形の粒の出現が認められた。

以上の結果からトラマメ種子の登熟初期から中期にかけて、澱粉粒は突起状に成長して不定形の粒となり、この時期に短い鎖の枝を形成する KBE1 および、その修飾形の KBE2 が活発に働き、中期から後期にかけて澱粉粒が球形に完成していく時期に KBE3 が現れ、長い鎖長の枝を形成しているという結論に達した。

以上の成果は、菜豆の澱粉粒形成について、アミロペクチンの分岐構造の観点から酵素化学的に解析したものであり、学術的に高く評価されるのみならず、多面的に応用可能な知見を含むものと考えられる。よって審査員一同は 野崎 功一が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認めた。