

学 位 論 文 題 名

インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.cv.Toramame) α -アミラーゼの機能と発現に関する分子機構

学位論文内容の要旨

α -アミラーゼ (EC 3.2.1.1, 1,4- α -D-glucan glucanohydrolase)は、デンプン加水分解酵素の最も主要な酵素の一つであり、多糖またはオリゴ糖の α -1,4-グルコシド結合をエンド様式に加水分解し α -アノマーの生成物を生じさせる。微生物から動物、植物、昆虫に至るまで生物界に広く存在し、酵素化学的にあるいはまた遺伝子発現など、幅広く研究されている。近年 α -アミラーゼの三次構造の解析が進み、(β/α)₈バレル構造をとること、一次配列上に保存される4つの機能領域を持ち、ここに活性部位を形成するアミノ酸残基が含まれることが明らかにされた。これらの保存領域は、ブルナーゼ、 α -グルコシダーゼ（ファミリー1）、枝作り酵素、CGTaseなどにも認められる。これらの酵素は α -アミラーゼファミリーを形成し、いずれも類似した構造および反応機構をとると考えられている。

本研究では、この α -アミラーゼについてインゲンマメの一種であるトラマメ (*Phaseolus vulgaris* L.cv.Toramame)を材料として、機能及び発現について検討した。 α -アミラーゼは植物において主要な炭素源であるデンプン粒を分解できる唯一の酵素であり、単子葉植物種子の発芽における α -アミラーゼの発現制御は特に古くから調べられてきた。イネ、オオムギなどの単子葉植物において α -アミラーゼは多くのアイソザイムを有し、その多くはジベレリンにより、一部は糖飢餓により発現誘導される。ジベレリンや糖に応答するプロモーターのシス領域も同定されている。これに対し、双子葉植物においてこれらの研究は十分に行なわれておらず、アイソザイムの有無についてさえ明らかではない。

本研究は、双子葉植物における α -アミラーゼの機能と発現機構を明らかにすることを目的となされた。

1. 発芽種子に発現する α -アミラーゼの酵素化学的性質と構造

トラマメを暗所で6日間発芽させた幼苗より子葉を収穫し、これを材料として精製を行った。子葉100gより、硫酸分画（30-70% 飽和画分）、 β -サイクロデキストリンカラムによるアフィニティークロマトグラフィーおよびBio-Gel P-100を用いたゲルろ過によって、比活性90.1 U/mgの α -アミラーゼ標品、613U、6.8mgを精製した。精製倍率819倍、活性の回収率31.4%であった。本酵素は、分子量46,000のモノマーで、糖含量1.25% (mannose換

算)、至適pHは6.0、pH5.5-7.0において安定である。温度安定性は、15分間の処理で40℃までであるが、5mM 酢酸カルシウムの存在下では、70℃、15分処理まで安定であった。これらの一般的性質は、他の植物 α -アミラーゼの示す性質によく一致した。Maltoseから maltooctaoseまでの一連のマルトオリゴ糖に対する速度定数から、本酵素のサブサイト数は8、切断部位はサブサイト6および7の間と推定した。これは、液化型 α -アミラーゼの示すサブサイト構造に類似し、特にオオムギ α -アミラーゼで推定されたサブサイト構造のサブサイト1から8までによく類似した。

次に、トラマメ α -アミラーゼの一次構造を明らかにした。常法に従い、部分アミノ酸配列を解析しその情報からcDNAをクローニングした。予想されるアミノ酸配列はヤエナリ (*Vigna radiata*)由来 α -アミラーゼのアミノ酸配列に94%、イネなど植物由来のものに約60%、その他動物、微生物、昆虫由来のものには10-22%程度の相同性を示した。Taka-amylaseA (TAA)とは13%と相同性は低いものであったが、推定二次構造が概ね一致し、また触媒基を提供するアミノ酸残基D178 (TAA, D206), E203 (TAA, E230), D285 (TAA, D297) および切断部位周辺のサブサイトを形成するアミノ酸残基が保存されていることから、本酵素もまたTAAと同様 (β/α)₈バレル構造をとると推定された。しかし、トラマメ酵素は、TAAにおける (β/α)₈バレル構造からC末端ドメインにかけて連結領域を含む相当領域を一次配列上で大きく欠損するものであった。

2. トラマメ植物体における α -アミラーゼの発現

植物体における α -アミラーゼの発現を調べた。まず、他の器官に比べて圧倒的に大量に発現する子葉において、 α -アミラーゼが発芽に際して *de novo* 合成されることを確認した。重水素による密度標識法、ウェスタンおよびノザンブロットング解析、いずれの結果も発芽後に合成されることを示し、発芽種子の子葉において転写レベルで発現制御がなされていることが明らかになった。発芽子葉に比べ微量ではあるが緑葉、登熟中期から後期にかけての種子にも α -アミラーゼが発現することを示した。これらの解析には α -アミラーゼ以外のデンプン分解活性と区別する必要があり、電気泳動後活性染色により半定量する方法を用いた。 α -アミラーゼが示す熱安定性、基質特異性、生成物特異性の特徴から活性バンドを示す活性を β -アミラーゼなどと区別して特定できた。いずれの器官に発現する α -アミラーゼも電気泳動において同じ易動度を示した。各器官での発現をノザンブロットング解析した結果、根、茎においても α -アミラーゼが発現していることを確認した。

緑葉から α -アミラーゼを単離精製し一般的性質と共に、構造解析を行った。トラマメ緑葉5kgより比活性104U/mgを示す精製酵素0.27mgを得た。本精製は精製倍率80,000倍、回収率3%であった。精製酵素の示す一般的性質、部分アミノ酸配列およびペプチドマップは、いずれも緑葉由来の酵素が発芽子葉のものと同じであることを示した。転写産物の解析も行った。非翻訳領域の配列を3' RACEにより増幅し解析した。その結果は発芽子葉と同一遺伝子産物であることを示したが、ポリAサイトの異なるいくつかの配列を得た。この意味するところは明らかではない。また、緑葉に発現する α -アミラーゼの生理的意義も明確ではない。

3. α -アミラーゼ遺伝子の単離と構造

サザンブロッティング解析の結果から、前項の結果と合わせて、本植物体において α -アミラーゼはハプロイドあたり1コピーの遺伝子にのみコードされ、これと相同な遺伝子は存在しないと判断された。したがって、アイソザイムは存在しない。この α -アミラーゼ遺伝子をクローニングし、このうちXbaI-HincII断片4,587bpの塩基配列を解析した。他の植物起源の α -アミラーゼ遺伝子に保存される同様のスプライスサイトを有し、4エキソン-3イントロンの構造をとることが明らかとなった。上流プロモータの配列はブラックグラム (*Vigna mungo*)由来のものに-502bpまで高い相同性を示した。-1,300bp近傍にジベレリン応答に関与するシス因子様配列が複数存在しGARCを形成している可能性を認めた。約-800bpまでの領域をGUS遺伝子に連結し、これをシロイヌナズナに導入しGUSの発現を組織化学的に解析した結果、ロゼット葉維管束部および発芽後の子葉において発現が確認された。これにより、発現に必須なシス因子は-800bpまでの領域に存在していることが示された。

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 教 授 内 藤 哲

学 位 論 文 題 名

インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.cv.Toramame)

α -アミラーゼの機能と発現に関する分子機構

本論文は、和文171頁、図65、表9、7章からなり、他に参考論文14篇が付されている。

α -アミラーゼ (EC 3.2.1.1, 1,4- α -D-glucan glucanohydrolase)は、デンプンなどの多糖またはオリゴ糖の α -1,4-グルコシド結合をエンド様式に加水分解し、微生物から動植物、昆虫まで生物界に広く分布している。植物において α -アミラーゼはデンプン粒を分解できる唯一の酵素であり、イネ、オオムギなどの単子葉植物において数種のアイソザイムとして存在し、多重遺伝子族を形成している。その多くはジベレリンにより発現誘導される。これに対し、双子葉植物ではその研究は十分になされておらず、アイソザイムの有無さえ明らかではない。

本研究は、インゲンマメの一種であるトラマメ (*Phaseolus vulgaris* L.cv.Toramame)を用いて、双子葉植物における α -アミラーゼの構造、機能および発現機構を明らかにすることを意図してなされたものであり、研究の結果は以下のように要約される。

1. 発芽種子に発現する α -アミラーゼの酵素化学的性質と構造

トラマメを暗所で6日間発芽させた幼苗の子葉100gより、比活性90.1 U/mgの α -アミラーゼ標品、6.8mgを精製した。本酵素の一般的性質 (分子量46,000、至適pH)は、一般の植物 α -アミラーゼの示す性質によく一致した。一連のマルトオリゴ糖の水解に関する速度定数から、本酵素のサブサイト数は8、切断部位はサブサイト6および7の間と推定された。これは、液化型 α -アミラーゼの示すサブサイト構造に類似している。

次に、部分アミノ酸配列を解析し、その情報から cDNAをクローニングした。予想される全一次アミノ酸配列はヤエナリ (*Vigna radiata*)由来 α -アミラーゼのアミノ酸配列に94%の相同性を示した。Taka-amylase A(TAA)との相同性は13%ながら、推定二次構造の類似、ならびに触媒基や切断部位周辺のサブサイトを形成するアミノ酸残基、D178(TAA, D206), E203(TAA, E230)およびD285(TAA, D297)が保存されていることから、本酵素も

TAAと類似の三次構造をとると推定された。

2. トラムメ植物体における α -アミラーゼの発現

発芽幼苗の子葉における本酵素の発現量は他の器官に比べて圧倒的に多い。 α -アミラーゼが発芽に際して *de novo* 合成されることならびに転写レベルで発現制御されていることを、重水素による密度標識法、ウエスタンおよびノザンブロットティング解析により確認した。この他、緑葉および登熟中期から後期にかけての種子にも微量ではあるが α -アミラーゼが発現することを認めた。いずれも電気泳動的に同一であった。各器官での発現をノザンブロットティング解析した結果は、根、茎においても α -アミラーゼが発現していることを示した。

このうち緑葉から α -アミラーゼを単離精製し一般的性質と共に、構造解析を行った。トラムメ緑葉5kgより比活性104U/mgを示す精製酵素0.27mgを得た。本精製酵素は、精製倍率80,000倍、回収率3%であった。精製酵素の示す一般的性質、部分アミノ酸配列及びペプチドマップは、いずれも緑葉由来の酵素が発芽子葉のものと同じであることを示した。転写産物を3' RACEによる増幅断片から解析し結果は、ポリAサイトに多様性がある以外は発芽子葉と同一遺伝子産物であることを示した。

3. α -アミラーゼ遺伝子の単離と構造

サザンブロットティング解析および前項の結果から、本植物体において、 α -アミラーゼは、ハプロイドあたり1コピーの遺伝子にのみコードされ、これと相同な遺伝子は存在しないと判断された。したがって、アイソザイムは存在しない。本 α -アミラーゼ遺伝子をクローニングし、このうちXbaI-HincII断片4,587bpの塩基配列を解析した。本遺伝子は他の植物起源の α -アミラーゼ遺伝子に保存されるスプライスサイトを有し、4エキソン-3イントロンの構造をとることが明らかとなった。上流プロモータの配列はブラックグラム (*Vigna mungo*) 由来のものに -502bpまで高い相同性を示した。-1,300bp近傍にジベレリン応答に関与する3つのシス因子様配列が存在し、ジベレリン応答複合体GARCを形成している可能性を見出した。約 -800bpまでの領域をGUS遺伝子に連結し、これをシロイヌナズナに導入しGUSの発現を組織化学的に解析した結果、ロゼット葉維管束部および発芽後の子葉において発現が確認された。これにより、発現に必須なシス因子は-800bpまでの領域に存在していることが示された。

以上のように本研究は、双子葉植物における α -アミラーゼの発現と遺伝子構造および酵素の構造と機能について検討を行ったものであり、学術的に貴重な基礎的知見を提供している。

よって審査員一同は、森 春英は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。