

## 学位論文題名

ミツバチ  $\alpha$ -Glucosidase アイソザイムの  
構造と機能に関する研究

## 学位論文内容の要旨

ミツバチ (*Apis mellifera* L.) 成虫には 3 種の  $\alpha$ -glucosidase (HBGI, II および III) が存在する。これらの酵素は分子量, 至適 pH, pH や温度安定域などの一般的性質のみならず、基質特異性、発現時期、発現部位が異なっている。HBGI は基質の種類により、正および負の協同性を示すアロステリック酵素であり、羽化後、2, 3 日目に胃に相当する中腸で発現する。HBGII は他の酵素が作用できない soluble starch, isomaltose および glucose-1-phosphate を加水分解でき、幼虫から成虫まで定常的に発現し、血リンパや中腸に存在している。HBGIII は羽化後、20 日前後に下咽頭腺で発現し、基質に対する親和力は低いが高分子活性が高いという特徴を持つハチミツ生成に関与する酵素である。本研究では、3 種の  $\alpha$ -glucosidase 遺伝子をクローニングし、それらがアミノ酸一次配列や染色体上での遺伝子構造の異なるアイソザイムであることを明らかにした。また、HBGII および HBGIII 遺伝子を異種細胞で発現させ、酵素作用に関わるアミノ酸残基の解析を行った。

## (1) 酵素遺伝子のクローニングと推定アミノ酸一次配列

各酵素の一次構造を推定するため、常法にしたがって精製酵素の部分アミノ酸配列に基づいたプライマーを合成し、ミツバチ成虫から調製した cDNA ライブラリーおよび 5'RACE (rapid amplification of cDNA 5' end) 法を用いて cDNA のクローニングを行った。 $\alpha$ -glucosidase はその一次構造から family I、および family II に分類され、前者は  $\alpha$ -amylase family の特徴を有する。HBGI, II および III cDNA 塩基配列から予想されるアミノ酸配列は各アイソザイム間で約 40 %の同一性が認められ、いずれも  $\alpha$ -amylase family の特徴である 4 つの保存領域を持ち、 $\alpha$ -glucosidase family I に属していた。これまでに解析されている他起源の酵素との比較では蚊やショウジョウバエの  $\alpha$ -glucosidase homologue あるいは *Saccharomyces cerevisiae* 由来の  $\alpha$ -glucosidase などとそれぞれ 30 %前後の同一性を有していた。また、すでに立体構造が明らかになっている *Bacillus cereus* 由来 oligo-1,6-glucosidase との一次配列および二次構造の比較により三次構造の予測を行った結果、 $(\beta/\alpha)_8$  バレル構造の N-domain、その途中に存在する subdomain、 $\beta$ -sheet 構造の C-domain からなることが予測された。活性

に必須な触媒残基は D212-E281-D343 (HBGI)、D202-E271-D333 (HBGII)、D206-E269-D329 (HBGIII) であると考えられた。

### (2) HBG 遺伝子のゲノムにおける構造

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において 3 つの  $\alpha$ -glucosidase homologue 遺伝子とそのゲノム上で並んで存在することが報告されている。近年、その全ゲノム配列が解読され、その他に 4 つの  $\alpha$ -glucosidase homologue 遺伝子が並んで存在し、計 7 つの  $\alpha$ -glucosidase homologue 遺伝子がゲノム上でクラスター構造をとっていることが明らかになった。HBG 遺伝子がミツバチゲノム上で同様なクラスター構造をとる可能性および染色体における遺伝子の構造を調べるため、サザン解析およびゲノミックライブラリーからクローニングを試み、ゲノム解析を行った。サザン解析により、各遺伝子がミツバチゲノム上でシングルコピーで存在していることが示唆された。また、約 13 kbp のゲノム配列を解析し、HBGI 遺伝子が 8 エキソン 7 イントロンで構成されていること、約 3 kbp のゲノム配列を解析し、HBGII 遺伝子にはイントロンが存在しないこと、約 30 kbp のゲノム配列を解析し、HBGIII 遺伝子が少なくとも 6 エキソン 5 イントロンで構成されていることを明らかにした。また、サザン解析および PCR の結果から、3 種の  $\alpha$ -glucosidase 遺伝子はゲノム遺伝子構造の異なるアイソザイムであり、ショウジョウバエで見られるようなクラスター構造をとる可能性は低いか、あるいは各遺伝子間の距離が大きいことが考えられた。

### (3) 異種宿主発現系の構築

大腸菌、酵母 *Pichia pastoris* の発現系を用いて HBG 遺伝子の異種宿主発現系の構築を行った。大腸菌では生産されたタンパク質は封入体として不溶性画分に存在し、活性を持ったタンパク質として生産されなかった。*P. pastoris* では、HBGI 組換え酵素は生産されなかったが、HBGII および HBGIII では培養液 1 L あたり 30 および 13 mg の組換え酵素の生産に成功した。これらの組換え酵素を精製し、諸性質や基質特異性を調べたところ、糖含量を除いてミツバチ由来の HBGII および HBGIII とそれぞれ同様の性質を有していた。

### (4) HBGIII の触媒残基の確認およびキメラ酵素の作製

HBGIII の触媒残基を確認するため、*Bacillus cereus* 由来 oligo-1,6-glucosidase との配列比較を行った。D206 および D331 の他に、プロトンドナーとして作用するグルタミン酸に関して E259 および E269 の 2 ヶ所が候補となり、部位特異的変異法を用いてそれらの変異酵素 D206N, E259Q, E269Q および D331N 変異酵素を作製した。精製した E259Q 変異酵素は野生型の 50 % の比活性を保持していたのに対し D206N, E269Q および D331N 変異酵素の比活性は 0.004, 0.04 および 0.002 % にまで減少しており、HBGIII の触媒残基は D206, E269 および D331 であることを確認した。

また、HBGIII を 3 つに区切り、その一部を HBGI あるいは HBGII の相当する部分に交

換したキメラ酵素の作製を試みた。しかしながらキメラ酵素は生産されず、そのような交換によってポリペプチド鎖合成あるいはタンパク質のフォールディングに障害が生じたものと考えた。HBGIII の Tyr58 を HBGI 型の Asn に置換した変異酵素 Y58N および HBGIII の Gln262 と Pro263 の間に HBGII で存在する 5 アミノ酸残基を挿入した変異酵素 Q262+5a.a. では maltose に対する  $k_0/K_m$  値が減少していた。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 千葉 誠 哉  
副査 教授 伴 戸 久 徳  
副査 助教授 木 村 淳 夫

学位論文題名

## ミツバチ $\alpha$ -Glucosidase アイソザイムの 構造と機能に関する研究

本論文は、和文163頁、図77、表17、6章からなり、他に参考論文2篇が付されている。

$\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20) は、 $\alpha$ -グルコシド結合をもつ基質の非還元末端から加水分解によって $\alpha$ -glucoseを遊離させる酵素であるが、その基質特異性と一次構造から family I および II の二つのグループに分けられる。ミツバチ(*Apis mellifera* L.) 成虫には三種の $\alpha$ -glucosidase (honeybee  $\alpha$ -glucosidase: HBG I, II および III と略称) が存在する。これらの酵素は、基質特異性をはじめとする諸性質、発現の時期や部位が異なっている。HBG I および II は、基質の種類により正または負の協同性を示すアロステリック酵素であり、前者は中腸に、後者は中腸と血リンパに存在している。HBG III は、下咽頭腺に存在する分泌酵素であり、集められた花蜜中のショ糖を分解することによって蜂蜜の生成に関与している。

本研究は、それら三種の $\alpha$ -glucosidaseのcDNAクローニングによる一次構造の解析、二次および三次構造の予測、ゲノム上での遺伝子構造の解析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) 精製酵素の部分アミノ酸配列に基づいたプライマーを合成し、ミツバチ成虫から調製したcDNAライブラリーからのスクリーニングおよび5'RACE法を用いてcDNAのクローニングを行った。HBG I、II および III のcDNA塩基配列から推定されたアミノ酸配列は各酵素間で約40%の相同性が認められ、これらの酵素はすべてfamily I に属していることを明らかにした。ショウジョウバエや蚊あるいは*Bacillus cereus*や、*Saccharomyces cerevisiae*の $\alpha$ -glucosidaseのアミノ酸一次配列とは約30%の相同性を有していた。 $\alpha$ -glucosidaseでは唯一立体構造が解析されている*B. cereus*  $\alpha$ -glucosidaseとの一次およ

び二次構造の比較に基づき三次構造の予測を試みた結果、ミツバチの三種の酵素は、*B. cereus*の酵素にきわめて類似した三次構造をもち、 $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造のN-domain、それに続くsubdomain、 $\beta$ -sheet構造のC-domainからなることが予測された。触媒活性発現に必須なアミノ酸残基は、Asp212-Glu281-Asp343(HBG I)、Asp202-Glu271-Asp333(HBG II)、Asp206-Glu269-Asp331(HBG III)であると推定された。

2) HBG遺伝子のゲノム上における構造を解析するため、ゲノミックライブラリーからクローニングを試み、ゲノム解析を行った。サザンハイブリット法解析により、各遺伝子がミツバチゲノム上でシングルコピーとして存在することが示唆され、約13kbpのゲノム配列の解析からHBG I 遺伝子が8エクソン7イントロンで構成されていること、約3kbpのゲノム配列の解析からHBG II 遺伝子にはイントロンが存在しないこと、約30kbpのゲノム配列の解析からHBG III 遺伝子が少なくとも、6エクソン5イントロンで構成されることを明らかにした。サザンハイブリット法およびPCR法により、これら三種の $\alpha$ -glucosidase遺伝子はゲノム遺伝子構造の異なるアイソザイムであることを確認した。

3) 大腸菌、酵母(*Pichia pastoris*)の発現系を用いてHBG遺伝子の異種宿主発現系の構築を試みた。大腸菌では、生産されたタンパク質は封入体として不溶性画分に存在し、活性をもったタンパク質としては生産されなかった。一方*Pichia pastoris*では、HBG I の組換え酵素は生産されなかったが、HBG II (30mg/1L培養液)およびHBG III (13mg/1L培養液)の組換え酵素が生産された。これらの組換え酵素を精製し、基質特異性を含む諸性質を検討したところ、糖含量を除いてHBG II およびIIIとそれぞれ同様の性質を有することが認められた。

4) HBG IIIの触媒残基に関して、*B. cereus*  $\alpha$ -glucosidase との一次構造の比較を行った結果、三次構造から推定した触媒残基Asp206-Glu269-Asp331のうち、 $\alpha$ -グルコシド結合切断にプロトン供与体として直接関与するGlu269は、Glu259である可能性が考えられた。このためAsp206Asn、Glu259Gln、Glu269GlnおよびAsp331Asn変異酵素を作製した。精製したGlu259Gln変異酵素は、HBG IIIの50%の活性を保持していたが、Asp206Asn、Glu269Gln、Asp331Asn変異酵素では比活性はそれぞれ0.004、0.04および0.002%にまで減少したことからHBG IIIの触媒残基はAsp206-Glu269-Asp331であることを確認した。

以上のように本研究は、ミツバチのもつ三種の $\alpha$ -glucosidaseのcDNAクローニングにより、それら酵素の一次構造の推定、その結果に基づく二次および三次構造の予測、三種の酵素遺伝子のゲノム上における構造解析を行ったものであり、ミツバチ $\alpha$ -glucosidaseの分子進化を考えるうえで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、西本 完が博士(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。