

学 位 論 文 題 名

インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.)

登熟種子 Starch branching enzyme の酵素化学的特性と
アミロペクチン生合成に関する研究

学位論文内容の要旨

Starch branching enzyme (SBE) は、 α -1,4 グルカン鎖に作用して α -1,6 結合の分岐構造を持つアミロペクチンの生合成に不可欠な酵素であり、澱粉の食味や粘性などの質的要因を決める。一次構造から大きく2つのアイソザイムに分類され、それぞれのグルカン鎖に対する親和性や遺伝子の発現パターンの相違等が指摘されてきた。これらのアイソザイムには α -アミラーゼファミリーに共通する4つの保存領域が存在するが、このファミリーに属する酵素の一次構造をアライメントすると、4つの保存領域が存在する内部配列の長さは類似するが、それ以外のN末およびC末の両末端領域では長さも配列も酵素によってかなり異なっている。したがって、SBE のアイソザイム間の酵素機能特性の相違には末端構造が関わっていると推測される。

本研究では、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) 登熟種子を材料とし、SBE アイソザイムの単離と一次構造の解析、酵素化学的特性の解析、キメラ酵素を用いた反応速度論的解析などにより SBE アイソザイムの末端構造と酵素としての機能の関係を明らかにすることを目的とした。

1) SBE アイソザイム (PvSBE1 および PvSBE2) の機能解析

インゲンマメより2つのクラスに分類されるアイソザイムの遺伝子(pvsbe1、pvsbe2)をクローニングした。大腸菌発現酵素の解析より、両者は特にアミロースに対する親和性、クエン酸による活性化度が大きく異なることが分かった。PvSBE1は澱粉粒結合型、PvSBE2 はアミロプラスト可溶性型であり、これまで

他の植物で報告された結果と異なるものだった。これら酵素の大きな特徴は、6 グルコース残基を優位に転移することである。インゲンマメ澱粉から抽出したアミロペクチンにおいても、鎖長6の割合はイネやトウモロコシに比べて高いことから、これら酵素の性質を最終的に反映したものであると考えられた。

2) N末端伸長型 SBE の機能および遺伝子発現

PvSBE2アイソフォームであるN末端伸長型のLF-PvSBE2は、その一部が澱粉粒結合型として存在することを明らかにした。PvSBE2が可溶性画分のみに局在する性質は、他の植物には見られない特異な性質であるとともに、インゲンマメより精製された PvSBE2 は他の SBE と比較し、そのN末端が大きく欠損した型であった。本研究では、正常な長さを持つPvSBE2 (N末に 111 アミノ酸残基が付加された型: LF-PvSBE2) が澱粉粒局在能を有すること明らかにした。大腸菌発現酵素の解析より、この 111 アミノ酸残基が作り出す構造は、内部と独立した flexible domain であり、その存在によってアミロペクチンに対する親和性を高めることが分かった。さらに、LF-PvSBE2 と PvSBE2 は単一遺伝子の、選択的スプライシングによって生じる可能性が示された。このような事実は、本報告が初めてである。

3) キメラ酵素および変異酵素による SBE 末端領域の機能解析

アイソザイム間で末端構造を置換したキメラ酵素およびその他の変異酵素を作製し解析した。作製した6種のN末キメラ酵素のうち活性を有したものは1種であり、最終比活性も 6% にまで低下した。111 アミノ酸残基からなる flexible domain を除いた PvSBE2は、それ以上のN末の構造変化には不安定であり、内部との強い相互作用により構造を維持するものと考えられた。N末の構造変化は、基質アミロースに対する親和性を変えことなく触媒能を低下させていた。さらに PvSBE2 のN末から28残基目のアルギニンは、同様に構造の安定化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方、作製した6種類のC末キメラ酵素のうち3 種が活性を有しており、N末領域に比べて構造変化に比較的柔軟であった。C末キメラ酵素の解析から、特に末端側がアミロースに対する親和性および6グルコース残基の転移に関わることを明らかにした。C末領域欠損変異酵素の解析からもこのことが明らかにされた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 井 博 和

副 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 横 田 篤

副 査 助 教 授 伊 藤 浩 之

学 位 論 文 題 名

イヌゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.)

登熟種子 Starch branching enzyme の酵素化学的特性と アミロペクチン生合成に関する研究

本論文は図40、表12、引用文献163を含み、5章からなる総頁147の和文論文である。別に参考論文4編が添えられている。

Starch branching enzyme (SBE) は、 α -1,4 グルカン鎖に作用して α -1,6 結合の分岐構造を持つアミロペクチンの生合成に不可欠な酵素であり、澱粉の食味や粘性などの質的要因を決める。一次構造から大きく2つのアイソザイムに分類され、それぞれのグルカン鎖に対する親和性や遺伝子の発現パターンの相違等が指摘されてきた。これらのアイソザイムには α -アミラーゼファミリーに共通する4つの保存領域が存在するが、このファミリーに属する酵素の一次構造をアライメントすると、4つの保存領域が存在する内部配列の長さは類似するが、それ以外のN末およびC末の両末端領域では長さも配列も酵素によってかなり異なっている。したがって、SBE のアイソザイム間の酵素機能特性の相違には末端構造が関わっていると推測される。

本研究では、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) 登熟種子を材料とし、SBE アイソザイムの単離と一次構造の解析、酵素化学的特性の解析、キメラ酵素を用いた反応速度論的解析などにより SBE アイソザイムの末端構造と酵素としての機能の関係を明らかにすることを目的とした。

1) SBE アイソザイム (PvSBE1 および PvSBE2) の機能解析

インゲンマメより2つのクラスに分類されるアイソザイムの遺伝子(pvsbe1、

pvsbe2)をクローニングした。大腸菌発現酵素の解析より、両者は特にアミロースに対する親和性、クエン酸による活性化度が大きく異なることが分かった。PvSBE1は澱粉粒結合型、PvSBE2 はアミロプラスト可溶性型であり、これまで他の植物で報告された結果と異なるものだった。これら酵素の大きな特徴は、6 グルコース残基を優位に転移することである。インゲンマメ澱粉から抽出したアミロペクチンにおいても、鎖長6の割合はイネやトウモロコシに比べて高いことから、これら酵素の性質を最終的に反映したものであると考えられた。

2) N末端伸長型 SBE の機能および遺伝子発現

PvSBE2アイソフォームであるN末端伸長型のLF-PvSBE2は、その一部が澱粉粒結合型として存在することを明らかにした。PvSBE2が可溶性画分のみに局在する性質は、他の植物には見られない特異な性質であるとともに、インゲンマメより精製された PvSBE2 は他の SBE と比較し、そのN末端が大きく欠損した型であった。本研究では、正常な長さを持つPvSBE2 (N末に 111 アミノ酸残基が付加された型: LF-PvSBE2) が澱粉粒局在能を有すること明らかにした。大腸菌発現酵素の解析より、この 111 アミノ酸残基が作り出す構造は、内部と独立した flexible domain であり、その存在によってアミロペクチンに対する親和性を高めることが分かった。さらに、LF-PvSBE2 と PvSBE2 は単一遺伝子の、選択的スプライシングによって生じる可能性が示された。このような事実は、本報告が初めてである。

3) キメラ酵素および変異酵素による SBE 末端領域の機能解析

アイソザイム間で末端構造を置換したキメラ酵素およびその他の変異酵素を作製し解析した。作製した6種のN末キメラ酵素のうち活性を有したものは1種であり、最終比活性も 6% にまで低下した。111 アミノ酸残基からなる flexible domain を除いた PvSBE2は、それ以上のN末の構造変化には不安定であり、内部との強い相互作用により構造を維持するものと考えられた。N末の構造変化は、基質アミロースに対する親和性を変えことなく触媒能を低下させていた。さらに PvSBE2 のN末から28残基目のアルギニンは、同様に構造の安定化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方、作製した6種類のC末キメラ酵素のうち3 種が活性を有しており、N末領域に比べて構造変化に比較的柔軟であった。C末キメラ酵素の解析から、特に末端側がアミロースに対する親和性および6グルコース残基の転移に関わることを明らかにした。C末領域欠損変異酵素の解析からもこのことが明らかにされた。

以上のように本研究は、インゲンマメより2つのアイソザイム遺伝子を取得し、大腸菌発現酵素の性質を調べ、それらの酵素特性やアイソフォーム生成過程の推定、末端領域の機能解析などを行った。これらは学術的大いに価値ある成果と判

断される。

よって審査員一同は、濱田茂樹が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。