

学 位 論 文 題 名

Catalytic Mechanism and Molecular Structure of α -Glucosidase from Yellow Dent Corn

(イエローデントコーン α -グルコシダーゼの機能と構造に関する研究)

学位論文内容の要旨

α -グルコシダーゼ (α -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.20) は、 α -グルコシド結合を有する基質を非還元末端側から加水分解し、 α -グルコースを遊離するエキソ型の酵素である。微生物・植物・動物に普遍的に存在し、澱粉・グリコーゲン・オリゴ糖などの代謝に関与する重要な糖質加水分解酵素の一つである。特に、植物組織の澱粉分解において最終的にグルコースに導く酵素は α -グルコシダーゼである。重要な作物の 1 つにコムギが挙げられるが、この種子発芽時に α -グルコシダーゼの阻害剤処理を行うと澱粉分解が低下し、本酵素の基質であるマルトースの大量蓄積が認められる。また、イネなどの单子葉植物の登熟期にも酵素活性が発現する。従って、穀類の澱粉合成・分解時においてエネルギー供給を行うなど重要な役割を担う酵素と考えられている。トウモロコシの種子にも本酵素活性が認められる。本研究では、重要な飼料用作物であるイエローデントコーンの種子内にある α -グルコシダーゼに着目し、2 種類の酵素の存在を示し、それらの性質や蛋白構造を解析した。それと同時に、 α -グルコシダーゼに見られる分子内転移反応についても究明を行った。

(1) 2 種の α -グルコシダーゼの単離、性質および構造

種子破砕液から 2 種の α -グルコシダーゼの精製を行った。両者は、表面荷電や疎水性が異なり、陽イオン交換体や疎水クロマト担体を用いて両酵素 (ydcg I および ydcg II と仮称) を分離し精製を行った。両酵素は非変性条件における電気泳動では単一のバンドを与えるが、SDS を用いた変性条件の電気泳動では、ydcg I は 82 kDa と 7 kDa の、ydcg II は 88 kDa と 7 kDa の分子量を示す蛋白バンドを示した。それぞれの酵素標品から得られた分子量が異なる 2 つの因子は、ゲル濾過、イオン交換および疎水クロマトなどの分離操作で分割できないため、立体構造内に強固に組み込まれていると想像された。大サブユニット (ydcg I の 82 kDa、ydcg II の 88 kDa) の N-末端アミノ酸配列は、全一次構造が明らかにされた植物 α -グルコシダーゼの N-末端から約 100 アミノ酸離れた領域に高い相同性を示した。従って、翻訳後にこの部位が特異的な切断を受け、2 つのサブユニットが形成されると推察された。前駆体の存在も確認でき、本酵素のユニークな翻訳後修飾の一端が究明された。一方、両酵素の小サブユニ

ット (7 kDa) の N-末端は閉塞されていた。

ydcg I および ydcg II の性質を解析した。至適 pH は極く僅か異なるが、pH や温度に対する安定領域はほぼ一致した。基質に対する作用を定量的に解析し、2 つの α -グルコシダーゼは似た特異性を示すことが認められた。各基質への分解力は ydcg I の方が若干高い。マルトオリゴ糖および可溶性澱粉に高い活性を示し、 α -グルコ二糖類についてはマルトース (α -1,4-結合) よりニゲロース (α -1,3-結合) を速く切断する特徴を有していた。コジビオース (α -1,2-結合) も良好な基質とするが、イソマルトース (α -1,6-結合) やトレハロース (α -1,1-結合) には殆ど作用を示さなかった。 α -1,6-結合に対する加水分解力が低いため、糖転移作用ではイソマルトースやパノースの蓄積が認められた。また、i) マルトースなどのホロシド基質への活性は大きい、アリル α -グルコシドなどのヘテロシド基質への作用は低いことや ii) アミノ酸配列の保存性から、両酵素は α -グルコシダーゼのファミリー II に属することが判明した。

(2) α -グルコシダーゼが示す分子内糖転移作用

本酵素の研究過程で α -グルコシダーゼが触媒する分子内糖転移作用の可能性が得られた。実験に必要な酵素量を考慮し、大量入手が可能であり、かつ、本酵素と同様に α -1,6-グルコシド結合 (イソマルトース) の分解能が全くないミツバチ α -グルコシダーゼを用いて解析を行った。本酵素を高濃度のグルコースに作用させるとイソマルトースが大量に生成した。 α -グルコシダーゼは加水分解反応の他に糖転移反応ならびに縮合反応を触媒する。ミツバチ酵素は糖転移作用でイソマルトースを生成せず、 α -1,4-結合のマルトースを与える。また、縮合作用は脱水反応であり、加水分解作用の逆向きに進行するため、縮合反応で直接的にグルコースからイソマルトースは生成できないと考えられた。本現象を詳細に解析し、次の結果が得られた。1) グルコースからイソマルトースの生成反応において、生成量の経時変化は時間に対して直線性を与えず、反応初期に立ち遅れ (lag) が認められた。すなわち、グルコースからイソマルトースに至るまでに中間物質が存在し、中間物質を経由しイソマルトースが形成されることが示唆された。2) その際、イソマルトース出現の前にマルトースやコジビオースなどが生成され、これらの反応初期における経時変化は直線的であった。従って、この現象は「グルコース→マルトース (or/and コジビオース) →イソマルトース」の反応機構によると考えられた。次に、本機構を証明するため、逆向きに進行する反応 (イソマルトース→マルトース (or/and コジビオース) →グルコース) を調べた。イソマルトースに大量の酵素を作用させると、グルコースの遅い生成が観察された。この際、グルコースの生成曲線には lag が見られ、中間物質経由の反応であることが判明した。反応液を経時的に分析すると、コジビオースやマルトースがグルコースよりも速く生成することが観察され、「イソマルトース→マルトース (or/and コジビオース) →グルコース」から成る逆向き反応が確認された。本反応の第一段階である「イソマルトース→マルトース (or/and コジビオース)」は分子内糖転移反応と考えられる。本現象では安価なグルコースからイソマルトースが蓄積され、分解されない。イソマルトースは高機能素材として食品産業で活用され、また、良好な生理作用を示すので付加価値の高い反応と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 淳 夫

副 査 教 授 内 藤 哲

副 査 助 教 授 森 春 英

学 位 論 文 題 名

Catalytic Mechanism and Molecular Structure of α -Glucosidase from Yellow Dent Corn

(イエローデントコーン α -グルコシダーゼの機能と構造に関する研究)

本論文は、英文153頁、図84、表12、7章からなり、他に参考論文2編が添えられている。

α -グルコシダーゼ (α -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.20) は、 α -グルコシド結合を有する基質を非還元末端側から加水分解し、 α -グルコースを遊離するエキソ型の酵素である。微生物・植物・動物に普遍的に存在し、澱粉・グリコーゲン・オリゴ糖などの代謝に関与する重要な糖質加水分解酵素の一つである。特に、植物組織の澱粉分解において最終的にグルコースに導く酵素は α -グルコシダーゼである。重要な作物の1つにコムギが挙げられるが、この種子発芽時に α -グルコシダーゼの阻害剤処理を行うと澱粉分解が低下し、本酵素の基質であるマルトースの大量蓄積が認められる。また、イネなどの単子葉植物の登熟期にも酵素活性が発現する。従って、穀類の澱粉合成・分解時においてエネルギー供給を行うなど重要な役割を担う酵素と考えられている。トウモロコシの種子にも本酵素活性が認められる。本研究では、重要な飼料用作物であるイエローデントコーンの種子内にある α -グルコシダーゼに着目し、2種類の酵素の存在を示し、それらの性質や蛋白構造を解析した。それと同時に、 α -グルコシダーゼに見られる分子内転移反応についても究明を行った。

(1) 2種の α -グルコシダーゼの単離、性質および構造

種子破碎液から2種の α -グルコシダーゼの精製を行った。両者は、表面荷電や疎水性が異なり、陽イオン交換体や疎水クロマト担体を用いて両酵素 (ydcg Iおよびydcg IIと仮称) を分離し精製を行った。両酵素は非変性条件における電気泳動では単一のバンドを与えるが、SDSを用いた変性条件の電気泳動では、ydcg Iは82 kDaと7 kDaの、ydcg IIは88 kDaと7 kDaの分子量を示す蛋白バンドを与えた。それぞれの酵素標品から得られた分子量が異なる2つの因子は、ゲル濾過、イオン交換および疎水クロマトなどの分離操作で分割できないため、立体構造内に強固に組み込まれていると想像された。大サブユニット (ydcg Iの82 kDa、ydcg IIの88 kDa) のN-末端アミノ酸配列は、全一次構造が明らかにされた植物 α -グルコシダーゼのN-末端から約100アミノ酸離れた領域に高い相同性を示した。従って、翻訳後にこの部位

が特異的な切断を受け、2つのサブユニットが形成されると推察された。前駆体の存在も確認でき、本酵素のユニークな翻訳後修飾の一端が究明された。一方、両酵素の小サブユニット (7 kDa) のN-末端は閉塞されていた。また、2種の α -グルコシダーゼの内部アミノ酸配列も異なっており、本酵素遺伝子が少なくとも2つ存在することが判明した。

ydcg Iおよびydcg IIの性質を解析した。至適pHは極く僅か異なるが、pHや温度に対する安定領域はほぼ一致した。基質に対する作用を定量的に解析し、2つの α -グルコシダーゼは似た特異性を示すことが認められた。各基質への分解力はydcg Iの方が若干高い。マルトオリゴ糖および可溶性澱粉に高い活性を示し、 α -グルコ二糖類についてはマルトース (α -1,4-結合) よりニゲロース (α -1,3-結合) を速く切断する特徴を有していた。コジビオース (α -1,2-結合) も良好な基質とするが、イソマルトース (α -1,6-結合) やトレハロース (α -1,1結合) には殆ど作用を示さなかった。 α -1,6-結合に対する加水分解力が低いため、糖転移作用ではイソマルトースやパノースの蓄積が認められた。また、i) マルトースなどのホロシド基質への活性は大きい、アリル α -グルコシドなどのヘテロシド基質への作用は低いことやii) アミノ酸配列の保存性から、両酵素は α -グルコシダーゼのファミリーIIに属することが判明した。

(2) α -グルコシダーゼが示す分子内糖転移作用

本酵素の研究課程で α -グルコシダーゼが触媒する分子内糖転移作用の可能性が得られた。実験に必要な酵素量を考慮し、大量入手が可能であり、かつ、本酵素と同様に α -1,6-グルコシド結合 (イソマルトース) の分解能が全くないミツバチ α -グルコシダーゼを用いて解析を行った。本酵素を高濃度のグルコースに作用させるとイソマルトースが大量に生成した。 α -グルコシダーゼは加水分解反応の他に糖転移反応ならびに縮合反応を触媒する。ミツバチ酵素は糖転移作用でイソマルトースを生成せず、 α -1,4-結合のマルトースを与える。また、縮合作用は脱水反応であり、加水分解作用の逆向きに進行するため、縮合反応で直接的にグルコースからイソマルトースは生成できないと考えられた。本現象を詳細に解析し、次の結果が得られた。1) グルコースからイソマルトースの生成反応において、生成量の経時変化は時間に対して直線性を与えず、反応初期に立ち遅れ (lag) が認められた。すなわち、グルコースからイソマルトースに至るまでに中間物質が存在し、中間物質を経由しイソマルトースが形成されることが示唆された。2) その際、イソマルトース出現の前にマルトースやコジビオースなどが生成され、これらの反応初期における経時変化は直線的であった。従って、この現象は「グルコース→マルトース (or/and コジビオース) →イソマルトース」の反応機構によると考えられた。次に、本機構を証明するため、逆向きに進行する反応 (イソマルトース→マルトース (or/and コジビオース) →グルコース) を調べた。イソマルトースに大量の酵素を作用させると、グルコースの遅い生成が観察された。この際、グルコースの生成曲線にはlagが見られ、中間物質経由の反応であることが判明した。反応液を経時的に分析すると、コジビオースやマルトースがグルコースよりも速く生成することが観察され、「イソマルトース→マルトース (or/and コジビオース) →グルコース」から成る逆向き反応が確認された。本反応の第一段階である「イソマルトース→マルトース (or/and コジビオース)」は分子内糖転移反応と考えられる。本現象では安価なグルコースからイソマルトースが蓄積され、分解されない。イソマルトースは高機能素材として食品産業で活用され、また、良好な生理作用を示すので付加価値の高い反応と考えられる。

以上のように本研究は、イエローデントコーン種子に存在する2種類の α -グルコシダーゼの単離、性質および構造の解析、翻訳後修飾や分子内糖転移作用の証明を行ったものであり、植物 α -グルコシダーゼの構造と機能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、Mee Son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。