

学 位 論 文 題 名

インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) starch synthase

アイソザイムの酵素化学的特性と

デンプン生合成に関する研究

学位論文内容の要旨

デンプンはアミロペクチンとアミロースからなるグルコースのポリマーである。アミロペクチンは α -1,4 グルカン鎖を主鎖とし、 α -1,6 結合の分岐構造を持つ分子であり、アミロースはほぼ直鎖上の α -1,4 グルカン鎖である。デンプンは植物の貯蔵組織や葉で合成され、植物にとって必要不可欠な貯蔵物質である。また、デンプンは人類の主要なカロリー源であり、様々な産業における原材料としても重要な多糖である。しかし、植物においてデンプンが合成されるメカニズムはほとんど明らかにされていない。

Starch synthase (SS, EC 2.4.1.21) は、プライマーである α -1,4 グルカン鎖の非還元末端に ADP グルコースのグルコース残基を転移する反応を触媒し、グルカン鎖の伸長を行う酵素である。本酵素はアミロペクチンやアミロースの合成に関与し、デンプンの性質を決定すると考えられている。植物体には複数の SS アイソザイムが存在し、一次構造から 4 種類 (SSI, SSII, SSIII, GBSSI) に分類される。このうち、デンプン粒画分にもみ存在する GBSSI クラスのアイソザイムがアミロースの合成を行っており、それ以外のクラスのアイソザイムはアミロペクチンの合成に関与していると考えられている。しかしながら、植物体からの酵素精製が困難であるため、各種の SS の機能特性は理解されておらず、デンプン生合成における各アイソザイムの詳細な役割は不明なままである。

本研究では、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) を材料とし、3 種類の SS アイソザイムの一次構造の解析、生体内における各アイソザイムの局在性解析、大腸菌発現酵素の機能解析などにより、SS アイソザイムの酵素化学的特性とデンプン生合成の関係を明らかにすることを目的とした。

1) SS アイソザイムの一次構造および遺伝子発現

インゲンマメ登熟種子から SS アイソザイム (PvSSI、PvSSII および PvGBSSI) の

cDNA を単離し、一次構造を決定した。各アイソザイムの前駆体はプラスチド移行シグナルを有し、成熟タンパク質は C 末端側の類似性が高いことが判明した。pvss1 および pvss2 遺伝子の発現は葉において顕著であり、また登熟初期の種子でも確認された。一方、pvgbss1 遺伝子の発現レベルは種子の登熟にともない増加した。しかし、葉における pvgbss1 遺伝子の発現は確認されなかった。

2) SS アイソザイムの局在性

3 種のアイソザイムの組換え酵素 (rPvSSI、rPvSSII および rPvGBSSI) を大腸菌中で発現し精製した。精製酵素に対する抗体を用いて、各アイソザイムの局在性を調べた。植物体の可溶性画分にはいずれのアイソザイムも検出されなかったが、PvSSI および PvSSII は種子および葉のデンプン粒中に存在することが明らかとなった。一方、PvGBSSI は種子のデンプン粒にその存在が確認された。各登熟期の種子における PvGBSSI の存在量とアミロース含量に相関が認められないことから、PvGBSSI はアミロースだけでなくアミロペクチンの合成に関与していることが示唆された。葉には PvGBSSI が存在しないため、葉のアミロースは、異なる GBSSI クラスのアイソザイムによって合成されると考えられた。

3) rPvSSI および rPvSSII の諸性質

種々のマルトオリゴ糖や部分分解したアミロペクチンに対する rPvSSI と rPvSSII の反応性について詳細に解析した。それぞれの酵素活性はプライマー分子の鎖長に依存することが確認された。速度論解析の結果、rPvSSI は鎖長の増加にともないプライマーに対する親和性が増し、最大速度が減少することが明らかとなった。一方、rPvSSII は鎖長の増加によりプライマーに対する親和性は増加するが、最大速度はほぼ一定であった。また、両酵素の ADP グルコースに対する親和性は、プライマーの鎖長により変化しないことが判明した。アミロペクチンやグリコーゲンを基質とした場合の反応生成物を解析したところ、rPvSSI および rPvSSII はそれぞれ重合度 10 以下および 15 程度の鎖を選択して伸長する特性を持つことが明らかとなった。

4) rPvGBSSI の諸性質

アミロペクチンを基質とした場合、rPvGBSSI は重合度 15 程度の鎖を連続的に伸長し、極めて長い鎖 (重合度 50 以上) を生成した。このような連続的伸長反応は rPvSSI や rPvSSII では観察されなかった。GBSSI アイソザイムの連続的な伸長反応はデンプン中におけるアミロース合成に関与する重要な特性であると考えられた。一方、マルトトリオースを基質とした場合、rPvGBSSI は非連続的な伸長反応を行いマルトテトラオースを生成するため、基質の種類によって rPvGBSSI の伸長特性が変化することが判明した。

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

インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) starch synthase

アイソザイムの酵素化学的特性と

デンプン生合成に関する研究

デンプンはアミロペクチンとアミロースからなるグルコースのポリマーである。アミロペクチンは α -1,4 グルカン鎖を主鎖とし、 α -1,6 結合の分岐構造を持つ分子であり、アミロースはほぼ直鎖上の α -1,4 グルカン鎖である。デンプンは植物の貯蔵組織や葉で合成され、植物にとって必要不可欠な貯蔵物質である。また、デンプンは人類の主要なカロリー源であり、様々な産業における原材料としても重要な多糖である。しかし、植物においてデンプンが合成されるメカニズムはほとんど明らかにされていない。

Starch synthase (SS, EC 2.4.1.21) は、プライマーである α -1,4 グルカン鎖の非還元末端に ADP グルコースのグルコース残基を転移する反応を触媒し、グルカン鎖の伸長を行う酵素である。本酵素はアミロペクチンやアミロースの合成に関与し、デンプンの性質を決定すると考えられている。植物体には複数の SS アイソザイムが存在し、一次構造から 4 種類 (SSI, SSII, SSIII, GBSSI) に分類される。このうち、デンプン粒面分にもみ存在する GBSSI クラスのアイソザイムがアミロースの合成を行っており、それ以外のクラスのアイソザイムはアミロペクチンの合成に関与していると考えられている。しかしながら、植物体からの酵素精製が困難であるため、各種の SS の機能特性は理解されておらず、デンプン生合成における各アイソザイムの詳細な役割は不明なままである。

本研究では、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) を材料とし、3 種類の SS アイソザイムの一次構造の解析、生体内における各アイソザイムの局在性解析、大腸菌発現酵素の機能解析などにより、SS アイソザイムの酵素化学的特性とデンプン生合成の関係を明らかにすることを目的とした。

1) SS アイソザイムの一次構造および遺伝子発現

インゲンマメ登熟種子から SS アイソザイム (PvSSI、PvSSII および PvGBSSI) をコードする cDNA を単離し、一次構造を決定した。各アイソザイムの前駆体はプラスチド移行シグナルを有し、成熟タンパク質は C 末端側の類似性が高いことが判明した。pvss1 および pvss2 遺伝子の発現は葉において顕著であり、また登熟初期の種子でも確認された。一方、pvgbss1 遺伝子の発現レベルは種子の登熟にともない増加した。しかし、葉における pvgbss1 遺伝子の発現は確認されなかった。

2) SS アイソザイムの局在性

3種のアイソザイムの組換え酵素 (rPvSSI、rPvSSII および rPvGBSSI) を大腸菌中で発現し精製した。精製酵素に対する抗体を用いて、各アイソザイムの局在性を調べた。植物体の可溶性画分にはいずれのアイソザイムも検出されなかったが、PvSSI および PvSSII は種子および葉のデンプン粒中に存在することが明らかとなった。一方、PvGBSSI は種子のデンプン粒にその存在が確認された。各登熟期の種子における PvGBSSI の存在量とアミロース含量に相関が認められないことから、PvGBSSI はアミロースだけでなくアミロペクチンの合成に関与していることが示唆された。葉には PvGBSSI が存在しないため、葉のアミロースは、異なる GBSSI クラスのアイソザイムによって合成されると考えられた。

3) rPvSSI および rPvSSII の諸性質

種々のマルトオリゴ糖や部分分解したアミロペクチンに対する rPvSSI と rPvSSII の反応性について詳細に解析した。それぞれの酵素活性はプライマー分子の鎖長に依存することが確認された。速度論解析の結果、rPvSSI は鎖長の増加にともないプライマーに対する親和性が増し、最大速度が減少することが明らかとなった。一方、rPvSSII は鎖長の増加によりプライマーに対する親和性は増加するが、最大速度はほぼ一定であった。また、両酵素の ADP グルコースに対する親和性は、プライマーの鎖長により変化しないことが判明した。アミロペクチンやグリコーゲンを基質とした場合の反応生成物を解析したところ、rPvSSI および rPvSSII はそれぞれ重合度 10 以下および 15 程度の鎖を選択して伸長する特性を持つことが明らかとなった。

4) rPvGBSSI の諸性質

アミロペクチンを基質とした場合、rPvGBSSI は重合度 15 程度の鎖を連続的に伸長し、極めて長い鎖 (重合度 50 以上) を生成した。このような連続的伸長反応は rPvSSI や rPvSSII では観察されなかった。GBSSI アイソザイムの連続的な伸長反応はデンプン粒中におけるアミロース合成に関与する重要な特性であると考えられた。一方、マルトトリオースを基質とした場合、rPvGBSSI は非連続的な伸長反応を行いマルトテトラオースを生成するため、基質の種類によって rPvGBSSI の伸長特性が変化することが判明した。

以上のように本研究は、インゲンマメより 3種の starch synthase cDNA を取得

し、それぞれのアイソザイムの植物における局在性解析や組換え酵素の諸性質解析などを行い、各酵素の機能を明らかにした。これらは学術的に大いに価値ある成果と判断される。

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