

## 学位論文題名

Reaction and Structure of Two  $\alpha$ -Amylase Isoforms  
from Azuki Beans(2つのアズキ  $\alpha$ -アミラーゼアイソフォームの機能と構造)

## 学位論文内容の要旨

$\alpha$ -アミラーゼ (1,4- $\alpha$ -D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) は、 $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を有する高分子基質をランダムに加水分解し、 $\alpha$ -アノメリック構造を有する生成物を遊離させるエンド型の酵素である。植物・動物・微生物に普遍的に存在し、澱粉やグリコーゲンなどの分解代謝に関する重要な糖質加水分解酵素の一つである。特に、植物細胞において基質となる澱粉は不溶性の粒子であり、澱粉粒分解の初期段階において作用する酵素とされている。その後、フォスホリラーゼ系や $\beta$ -アミラーゼ- $\alpha$ -グルコシダーゼ系が作動し、最終的にグルコース-1-リン酸やグルコースに導かれる。これまで、単子葉類や双子葉類の種子発芽時に複数の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子が植物ホルモンの制御下で発現されることが明らかになっており、菜豆類の発芽時にも本酵素活性が認められる。本研究では、重要な食用作物であるアズキの種子発芽において発現する $\alpha$ -アミラーゼに着目し、2種類の酵素の存在を示した。それらの緒性質や蛋白構造を解析した結果、2つの $\alpha$ -アミラーゼは澱粉粒への吸着能の異なるアイソフォームであると推定された。

(1) 発芽過程で発現する2種の $\alpha$ -アミラーゼの単離と性質

7品種のアズキ種子を暗所下 30°C において発芽させ、 $\alpha$ -アミラーゼ活性の経日変化を調べた。いずれの種子も吸水処理後、酵素活性の上昇が観察され、8日目に最大値を与えた。最も高い活性を示した品種（ホクトダイナゴン）を研究試料に選び、発芽後8日のものを各器官（根・茎・葉・種皮・子葉）に分割し、それぞれの酵素活性を測定した。子葉に高い $\alpha$ -アミラーゼ活性が観察され、それ以外の部分の活性は極めて低いことが認められた。発芽8日目の子葉 300 g を材料にし、 $\alpha$ -アミラーゼの精製を開始した。0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0, 5 mM  $\text{CaCl}_2$  とプロテアーゼ阻害剤を含む) 中で磨砕して得られた抽出液を粗酵素液とした。酵素活性の殆どを 40-70 %硫酸分画で回収後、アフィニティークロマトグラフィーに供した。担体には、 $\beta$ -サイクロデキストリン ( $\beta$ -CD と略) を固定化したセファロース 6B を用いた。本操作で $\alpha$ -アミラーゼは2つの活性区分に分離した。一方は $\beta$ -CD 担体に弱い相互作用（遅延溶出）を示し、他方は溶出に $\beta$ -CD を要する強い吸着を示した。それぞれを VAAmy1 および VAAmy2 と命名した。 $\beta$ -CD は $\alpha$ -アミラーゼ分子における澱粉粒の吸着部位と相互作用することが知られている。2つの活性画分は非変性

条件における電気泳動および SDS を用いた変性条件の電気泳動で単一のバンドを与え、精製標品として以降の実験に使用した。両精製酵素の粗酵素液からの活性回収の総和は 78% (VAAmy1 で 37%、VAAmy2 で 41%) であり、高い収率を与えた。

VAAmy1 および VAAmy2 の性質を解析した。SDS を用いた電気泳動で VAAmy1 は 47,000 の、VAAmy2 は 44,000 の分子量を与えた。5.2 の pI 値は一致した。両者の至適 pH (pH 5.3 と 5.2)、至適温度 (70°C) および pH や温度に対する安定領域 (pH 4.6-10.4 と pH 3.9-11.9、70°C 以下) はほぼ同様の結果を示した。グルコース重合度が 17 および 7 の基質に対する作用を定量的に解析し、2つの  $\alpha$ -アミラーゼは似た特異性を示すことが認められた。重合度が 5 の基質を用いて、活性部位を構成するサブサイト構造と基質切断様式の関係を調べた。両酵素ともに基質を形成するグルコース残基のうち非還元末端から 4 と 5 残基間で主な切断が生じることが判明し、基質はサブサイト-4 から +1 に結合することが明らかになった。植物  $\alpha$ -アミラーゼは活性発現や分子構造の保持のため、 $\text{Cl}_2^{2+}$  を要求する。 $\text{Cl}_2^{2+}$  を酵素液に加えたが活性の上昇は認められず、既に酵素分子に  $\text{Cl}_2^{2+}$  が結合していることが想像された。EDTA 処理により酵素活性が低下し、 $\text{Cl}_2^{2+}$  を与えても活性の回復が認められず、EDTA 処理は不可逆な失活を与えることが明らかになった。 $\beta$ -CD 吸着が異なる VAAmy1 および VAAmy2 を澱粉粒に作用させた。VAAmy1 の約 40%ならびに VAAmy2 の約 90%が澱粉粒に保持され、澱粉粒への吸着能が相違することが認められた。

## (2) 構造解析と 2つの酵素アイソフォーム

VAAmy1 および VAAmy2 のアミノ末端 15 残基の配列は完全に一致した。内部配列の解析は、両酵素をトリプシン消化後、生成するペプチド断片を飛行時間型質量分析装置に供することでを行った。得られたスペクトラムも一致することから 2つの酵素のアミノ酸配列は同一のものと判断できた。これらの配列情報は、*Vigna radiata* 酵素のものと符号するため、*Vigna radiata* 酵素の遺伝子配列を基にヌクレオチドプライマーを作製し、アズキ子葉の cDNA ライブラリーから PCR 法 (5'RACE) で本酵素の DNA 断片の増幅を行った。DNA 配列解析の結果から、5'領域に相当する 1 種類の増幅断片が得られた。本配列の一部からプライマーを合成し 3'RACE 法で酵素遺伝子の全域にわたるクローニングを行った。PCR 法における幾つかの誤反応もあったが、1 種類の転写産物から増幅された遺伝子であることが明らかになった。本遺伝子の ORF は 1,266 bp からなり、421 アミノ酸残基をコードする。推定された全アミノ酸一次配列は、VAAmy1 および VAAmy2 の N 末端配列を含み、内部配列を構成するペプチドの質量解析の結果と完全に一致した。23 アミノ酸からなるシグナルペプチドの配列および 1 箇所の糖鎖付加モチーフが存在した。 $\alpha$ -アミラーゼの活性部位を構成する 4つの特徴的な配列が確認され、触媒残基を含み活性クレフトを構築する ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> 構造のドメイン A、もう一方の活性クレフトを形成するドメイン B ならびに澱粉粒吸着に関与するドメイン C の存在が示された。全アミノ酸配列からの推定分子量 (44,379) は VAAmy1 (47,000) より小さく VAAmy2 (44,000) と一致した。従って、分子量が増加するタイプの翻訳後修飾、すなわち糖鎖修飾により澱粉粒吸着能が低下したと考えられた。

VAAmy1 および VAAmy2 は同じ基質特異性を与え、それらのアミノ末端とカルボキシル末端の

両配列ならび内部配列が同一である。得られた配列情報が ORF から推定された全アミノ酸一次構造に認められ、かつ同一遺伝子に起因することから2つの $\alpha$ -アミラーゼはアイソフォームと推定した。澱粉粒吸着能が異なる両酵素はアズキ種子の発芽に伴い活性が増加し同程度存在するため、澱粉粒の分解機構に関し異なる役割を担っていると想像される。すなわち、VAAmy2 が粒の分解に主に関与し、遊離したグルコースポリマーを VAAmy1 が分解する機構を想定した。

# 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

## Reaction and Structure of Two $\alpha$ -Amylase Isoforms from Azuki Beans

(2つのアズキ  $\alpha$ -アミラーゼアイソフォームの機能と構造)

本論文は、英文97頁、図27、表13、4章からなり、他に参考論文3編が添えられている。

$\alpha$ -アミラーゼは、澱粉やグリコーゲン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り、高分子基質をランダムに分解し、 $\alpha$ -アノメリック構造を有する生成物を遊離させる。植物細胞において澱粉は不溶性の粒子であり、澱粉粒分解の初期段階に作用する酵素とされている。これまで、単子葉類や双子葉類の種子発芽時に複数の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子が発現されることが明らかになっている。本研究では、重要な食用作物であるアズキの種子発芽において発現する $\alpha$ -アミラーゼに着目し、2種類の酵素の存在を示した。それらの緒性質や蛋白構造を解析し、2つの $\alpha$ -アミラーゼは澱粉粒への吸着能の異なるアイソフォームであると推定された。

### (1) 発芽過程で発現する2種の $\alpha$ -アミラーゼの単離と性質

7品種のアズキ種子を発芽させ、最も高い活性を示した品種（ホクトダイナゴン）を研究試料とした。吸水後8日目に最大活性となり、子葉に高い酵素活性の局在が観察された。発芽8日目の子葉から抽出液を調製し、40-70%硫酸分画、アフィニティークロマトグラフィーに供した。アフィニティー担体には、 $\beta$ -サイクロデキストリン（ $\beta$ -CD と略）を固定化したセファロースを用いた。本操作で $\alpha$ -アミラーゼは2つの活性画分に分離した。一方は $\beta$ -CD 担体に弱い相互作用を、他方は強い吸着を示した。それぞれを VAAmy1 および VAAmy2 と命名した。 $\beta$ -CD は $\alpha$ -アミラーゼ分子における澱粉粒の吸着部位と相互作用する。両活性画分は電気泳動で単一バンドを与え、精製標品として以降の実験に使用した。活性回収は78%（VAAmy1 で37%、VAAmy2 で41%）であり、高い収率を与えた。

SDS 電気泳動法で VAAmy1 は 47,000 の、VAAmy2 は 44,000 の分子量を与えたが、pI 値は一致した。両者の至適 pH、至適温度および pH や温度に対する安定領域はほぼ同様であった。グルコース重合度が 17 および 7 の基質に対する特異性も似た結果を与え、重合度が 5 の基質への切断様式も一致した。植物  $\alpha$ -アミラーゼは分子構造の保持に  $\text{Cl}_2^{2+}$  を要求する。 $\text{Cl}_2^{2+}$  を酵素に与えたが活性上昇はなく、既に  $\text{Cl}_2^{2+}$  の結合が想像された。EDTA 処理により酵素活性が低下し、 $\text{Cl}_2^{2+}$  を与えても活性は回復せず、不可逆な失活であった。澱粉粒への吸着実験を行い、VAAmy1 の約 40% ならびに VAAmy2 の約 90% が澱粉粒に保持され、澱粉粒への吸着能が異なることが認められた。

## (2) 構造解析と 2 つの酵素アイソフォーム

VAAmy1 および VAAmy2 の N 末端配列は完全に一致した。内部配列の解析は、両酵素のトリプシン消化ペプチドを質量分析することで行った。得られたスペクトラムは一致し、2 つの酵素の全アミノ酸配列は同一と判断できた。これらの配列情報は *Vigna radiata* 酵素のものと同符号するため、同酵素の遺伝子配列を基にアズキ子葉の cDNA ライブラリーから PCR 法 (5'RACE) で本酵素の DNA 断片の増幅を行った。5' 領域に相当する 1 種類の増幅断片が得られた。次に、3'RACE 法で酵素遺伝子の全域にわたるクローニングを行い、1 種類の mRNA 由来の遺伝子を得た。本遺伝子の ORF は 1,266 bp からなり、421 アミノ酸残基をコードする。推定された全アミノ酸一次配列は、VAAmy1 および VAAmy2 の N 末端配列ならびに内部配列を完全に含んでいた。シグナル配列および 1 箇所の糖鎖付加モチーフが存在した。 $\alpha$ -アミラーゼの触媒アミノ酸が確認され、澱粉粒吸着ドメインの存在も示された。全アミノ酸配列からの推定分子量 (44,379) は VAAmy1 (47,000) より小さく VAAmy2 (44,000) と一致した。従って、分子量が増加するタイプの翻訳後修飾、すなわち糖鎖修飾により澱粉粒吸着能が低下したと考えられた。VAAmy1 および VAAmy2 は同じ基質特異性を与え、全アミノ酸一次配列が同一である。かつ同一遺伝子に起因することから 2 つの  $\alpha$ -アミラーゼはアイソフォームと推定した。澱粉粒吸着能が異なる両酵素はアズキ種子の発芽に伴い活性が増加し同程度存在するため、澱粉粒の分解機構に関し異なる役割を担っていると想像される。すなわち、VAAmy2 が粒の分解に主に関与し、遊離したグルコースポリマーを VAAmy1 が主に分解する機構を想定した。

以上のように本研究は、アズキ発芽種子に存在する 2 つの  $\alpha$ -アミラーゼの単離、性質および構造の解析を行ったものである。両酵素はアイソフォームであり、他の植物とは異なり 1 種類の  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現によること、さらにそれらが翻訳後修飾により澱粉粒への吸着能が変化することなど、植物  $\alpha$ -アミラーゼに関し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、San San Mar 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。