

## イネ $\alpha$ -Glucosidase の構造と機能に関する研究

### 学位論文内容の要旨

植物種子が発芽する際に、貯蔵物質（澱粉粒）の分解に関与する各種の加水分解酵素が発現する。これらの中には、乾燥種子中に既に含まれ水和によって活性を示すもの、プロテアーゼの作用を受け活性型となるもの、そして新たに合成される酵素が存在する。本研究では 12 品種のイネ種子を用いて、品種間における  $\alpha$ -glucosidase の活性発現様式の差異を調べ、2 種類に大別した。2 種のイネ品種の中から日本晴および赤米を選択し、乾燥および発芽種子を用いて  $\alpha$ -glucosidase の精製を行い、諸性質および一次構造を解析した。さらに日本晴では、精製した酵素とは異なる 3 種の  $\alpha$ -glucosidase 様遺伝子の単離および機能解析を行った。

植物種子の貯蔵物質である澱粉は不溶性の澱粉粒として存在する。そのため澱粉粒吸着能を持つ  $\alpha$ -amylase のみが澱粉粒分解の初期段階に作用する酵素であり、 $\alpha$ -glucosidase は、 $\alpha$ -amylase により生成した可溶性の dextrin を debranching enzyme や  $\beta$ -amylase と協同的に加水分解し、glucose に転換する酵素と考えられてきた。しかし本研究により、植物  $\alpha$ -glucosidase が澱粉粒吸着部位を持ち、かつ単独で分解することを示した。すなわち、植物における澱粉代謝の際に  $\alpha$ -amylase のみが澱粉粒に単独で作用するのではなく、 $\alpha$ -glucosidase が澱粉粒に直接作用する分解系も存在することを初めて明らかにした。

#### (1) 異なる品種間でのイネ $\alpha$ -glucosidase の発現解析

12 品種のイネ種子を暗所下 30°C において発芽させ、 $\alpha$ -glucosidase 活性の経日変化を調べた。発芽種子には可溶性の  $\alpha$ -glucosidase の他に、界面活性剤 (Triton X-100) でのみ可溶化される不溶性  $\alpha$ -glucosidase が存在することを見出し、さらにそれらの発現様式からイネ品種を 2 つに分類した。I) 可溶性および不溶性の酵素が乾燥種子に検出される品種（日本晴など）：これらの  $\alpha$ -glucosidase が登熟期で合成されることを明らかにした。発芽期間中では両酵素の活性は変化せず、一定のレベルで推移する。II) 不溶性酵素のみが乾燥種子に検出されるイネ品種（赤米など）：不溶性  $\alpha$ -glucosidase が登熟期で合成され、完熟に伴い種子中に保存されるが、発芽の進行につれ消失した。これらの品種では発芽後に可溶性酵素が新たに合成されることが分かった。

#### (2) イネ $\alpha$ -glucosidase の単離および一次構造解析

I) のタイプからは日本晴を、II) のタイプでは赤米を実験対象に選び、 $\alpha$ -glucosidase の精製を

行った。日本晴の乾燥種子から 2 種の可溶性酵素 (ONG2-I, ONG2-II) を精製した。両酵素はプロテアーゼ限定分解を受け、2 つのポリペプチド鎖からなる成熟タンパク質として構築されることを明らかにした。ONG2-I と ONG2-II は限定分解の部位の異なるアイソフォームであった。一方、赤米の乾燥種子にプロテアーゼ限定分解を受けていない不溶性酵素 (OAG2-II) と OAG2-II がプロテアーゼ限定分解を受けることで生成する OAG2-I を見出し、限定分解は基質特異性に変化を与えることを確認した。赤米の発芽種子から乾燥種子由来の OAG2 とは一次構造が異なる可溶性  $\alpha$ -glucosidase アイソザイム (OAG1) を精製した。発芽時に特異的に発現する OAG1 は OAG2 と比べ、各種基質に対する親和性および分子活性が高いことが分かった。

### (3) 日本晴 $\alpha$ -glucosidase 様遺伝子の単離と発現ならびに機能解析

日本晴の乾燥種子に存在する ONG2 の cDNA (*ong 2*) をクローニングした際に、さらに 3 種の  $\alpha$ -glucosidase 様遺伝子 (*ong 1, 3, 4*) の存在を確認した。イネゲノム配列から、*ong 2* および *ong 3* はエキソン 1 の選択的スプライシングによって生成される遺伝子産物であることが分かった。*ong 1* から推定されるアミノ酸配列は、既知の植物起源の  $\alpha$ -glucosidase のそれと高い一致性を示すことから、 $\alpha$ -glucosidase をコードすると予想された。一方、*ong 4* から推定されるアミノ酸配列は植物起源の  $\alpha$ -xylosidase と高い一致性を示した。これらの酵素の機能解析を行うため、3 種の遺伝子にコードされるタンパク質 (ONG1, ONG3, ONG4) を、*Pichia pastoris* を用いた異種宿主発現により生産した。ONG1 および ONG3 組換え酵素は、培養液 1 L あたり 172 および 110 mg と大量生産されたため、精製し諸性質を調べたところ、糖含量を除いて既知のイネ  $\alpha$ -glucosidase と同様な性質を示した。ONG1 に関しては、日本晴  $\alpha$ -glucosidase アイソザイムの中で特に isomaltose に対する特異性が高いことが明らかとなった。ONG4 では培養液 1 L あたり 14 mg の組換え酵素の生産が認められた。本酵素を精製し、 $\alpha$ -glucoside および  $\alpha$ -xyloside に対する基質特異性を調べた。 $\alpha$ -glucoside をほとんど分解せず  $\alpha$ -xyloside に対して特異性を示すことから、ONG4 が  $\alpha$ -xylosidase であることを明らかにした。

### (4) 植物起源の $\alpha$ -glucosidase の澱粉粒への作用および吸着部位の解明

植物起源 (イネ、ソバ、トウモロコシ、およびテンサイ) の  $\alpha$ -glucosidase を用いて澱粉粒に対する吸着能および分解能を解析したところ、用いた全ての酵素が澱粉粒に吸着し、単独で分解することが分かった。植物酵素と一次構造上の類似性が高いカビおよび酵母  $\alpha$ -glucosidase は、全く澱粉粒に吸着・分解しなかった。これらのことから、植物  $\alpha$ -glucosidase はカビと酵母の酵素に存在しない澱粉粒吸着部位を有すると予想した。これら酵素の一次構造を比較し、植物酵素にのみ存在する特異的な配列が C 末端領域に認められたため、本領域を澱粉粒への吸着部位と考えた。澱粉粒吸着能を持たない酵母 *Schwanniomyces occidentalis* (SOG) の酵素の C 末端領域 (Leu876-Trp960) をイネ酵素 (OAG1) の C 末端領域 (Phe793-Tyr906) に組み換えたキメラ酵素を作製し、澱粉粒への作用を調べた。キメラ酵素 (N 末から中央部分が SOG で C 末端領域が OAG1) が、澱粉粒吸着能および分解能を獲得したことから、OAG1 の C 末端領域が澱粉粒吸着部位であること

を明らかとした。さらに、この領域に存在する芳香族アミノ酸残基（OAG1 の W803 および F885 に相当）に部位特異的変異を導入したキメラ酵素において澱粉粒吸着能および分解能に低下が認められたため、これら芳香族アミノ酸残基が澱粉粒吸着に関与すると推定した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 淳 夫

副 査 教 授 佐 野 芳 雄

副 査 助 教 授 森 春 英

## 学 位 論 文 題 名

### イネ $\alpha$ -Glucosidase の構造と機能に関する研究

本論文は、和文 303 頁、図 216、表 51、7 章からなり、参考論文 3 編が添えられている。

植物の種子発芽における澱粉粒（生澱粉）の分解には  $\alpha$ -glucosidase などの複数の加水分解酵素が関与する。本研究では、イネ発芽種子における  $\alpha$ -glucosidase 活性発現の品種間差異から 2 つのグループに各品種を大別した。それぞれの代表として日本晴と赤米を選択し、乾燥種子や発芽種子を用いて本酵素の分子解析ならびに生理的機能を究明することを目的とした。

#### （1）異なる品種間でのイネ $\alpha$ -glucosidase の発現解析

12 品種のイネ種子を発芽させ、 $\alpha$ -glucosidase 活性の経日変化を調べた。発芽種子に可溶性の酵素の他に界面活性剤でのみ可溶化される不溶性酵素を見出し、それらの発現様式からイネ品種を 2 つに分類した。I) 可溶性と不溶性の  $\alpha$ -glucosidase が乾燥種子に検出される品種（日本晴など）：これらの酵素は登熟期で合成された。発芽時では両酵素の活性は変化せず、一定のレベルを保持する。II) 不溶性酵素のみが乾燥種子に検出されるイネ品種（赤米など）：不溶性  $\alpha$ -glucosidase が登熟期で合成され、乾燥種子に保存されるが、発芽の進行に伴い消失する。発芽後に可溶性酵素が新たに合成される。

#### （2）イネ $\alpha$ -glucosidase の単離および一次構造解析

I) のタイプからは日本晴を、II) のタイプでは赤米を選び、 $\alpha$ -glucosidase の精製を行った。日本晴の乾燥種子から 2 種の可溶性酵素（ONG2-I, ONG2-II）を精製した。両酵素は、プロテアーゼ限定分解を受け 2 つのポリペプチド鎖からなる成熟タンパク質として存在した。これらは限定分解の部位が異なるアイソフォームであり、澱粉粒に対する吸着能が異なった。一方、赤米の乾燥種子にプロテアーゼ限定分解を受けていない不溶性酵素（OAG2-II）と OAG2-II がプロテアーゼ限定分解を受けることで生成する OAG2-I が見出された。限定分解は基質特異性や澱粉粒への吸着能を変化させた。赤米の発芽種子から OAG2 と一次構造が異なる可溶性酵素（OAG1）を精製した。発芽時に特異的に発現する OAG1 は OAG2 に比べ各基質に対する親和力と分子活性が高い。

### (3) 日本晴 $\alpha$ -glucosidase 様遺伝子の単離と発現ならびに機能解析

日本晴の乾燥種子に存在する ONG2 の cDNA (*ong2*) をクローニングした際に、さらに 3 種の  $\alpha$ -glucosidase 様遺伝子 (*ong1*, 3, 4) を確認した。イネゲノム配列との比較から、*ong2* および *ong3* はエキソン 1 の選択的スプライシングにより生成される遺伝子産物であった。3 遺伝子にコードされる蛋白質（それぞれ ONG1, ONG3, ONG4）を異種宿主発現により生産した。ONG1 と ONG3 は  $\alpha$ -glucosidase であり、精製した酵素の性質は既知のイネ酵素と同様であった。ONG1 は、日本晴アイソザイムの中で特に isomaltose に対する作用が高い。ONG1 と ONG3 の遺伝子は大量に発現した（培養液 1L あたり 110 から 170 mg の生産）。これまで植物  $\alpha$ -glucosidase 遺伝子に関し少量発現は報告されていたが、本研究のような大量発現は初めてである。ONG4 は  $\alpha$ -xylosidase であり、性質を明らかにした。

### (4) 植物起源の $\alpha$ -glucosidase の澱粉粒への作用および吸着部位の解明

植物（イネ、ソバ、トウモロコシとテンサイ） $\alpha$ -glucosidase を用いて澱粉粒に対する吸着能および分解能を解析した。用いた全ての植物酵素が澱粉粒に吸着し、単独で分解することを見出した。植物酵素に一次構造が相同するカビおよび酵母  $\alpha$ -glucosidase は、全く澱粉粒に吸着・分解しなかった。この結果は、植物酵素にのみ澱粉粒への吸着部位が存在することを暗示する。植物と微生物酵素の一次構造を比較すると、植物酵素のみに認められる特異配列が C 末端領域に認められたので、本領域を澱粉粒への吸着部位と予想した。吸着能がない *Schwanniomyces occidentalis* 酵素（SOG、酵母）の C 末端領域をイネ酵素（OAG1）の C 末端領域に置換したキメラ酵素を作製し、澱粉粒への作用を調べた。キメラ酵素（N 末端から中央部分が SOG で C 末端領域が OAG1 由来）が吸着能および分解能を獲得したので、OAG1 の C 末端領域が澱粉粒吸着部位であると決定した。本領域の Trp と Phe（植物酵素にのみ存在）に部位特異的変異を導入すると、吸着能および分解能が失われたため、これら 2 残基の芳香族アミノ酸が澱粉粒吸着に寄与すると推定した。

植物種子の貯蔵物質である澱粉粒は不溶性である。そのため吸着能を持つ  $\alpha$ -amylase のみが澱粉粒の分解における初期段階に作用し、 $\alpha$ -glucosidase は、 $\alpha$ -amylase が生成する可溶性の dextrin を debranching enzyme や  $\beta$ -amylase とともに協同的に加水分解し glucose に転換する酵素と考えられてきた。しかし本研究により、植物  $\alpha$ -glucosidase が澱粉粒への吸着部位を持ち、かつ単独で分解することが示された。すなわち植物において  $\alpha$ -glucosidase が澱粉粒に直接分解する代謝経路を初めて明らかにした。

以上のように本研究は、イネ発芽時の  $\alpha$ -glucosidase 活性の発現に品種間格差を見出し 2 種に大別した後に、それぞれの代表品種の登熟・発芽種子に見出された  $\alpha$ -グルコシダーゼ・アイソザイムやアイソフォームに関し、単離、性質および構造の解析、それらの遺伝子の転写や翻訳さらに翻訳後修飾の機構究明、ホモログ遺伝子の大量発現に成功しコードされた蛋白質の機能解明、特に植物酵素のみが示す澱粉粒への吸着・分解の分子解析から新たな澱粉粒の代謝機構の発見など、

イネのみならず植物 $\alpha$ -グルコシダーゼに関し学術的に重要な基礎的知見を提供した。

よって審査員一同は、中井博之が博士（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。