

学位論文題名

Catalytic Mechanism and Molecular Structure of α -Glucosidase Isozymes from Asian Honeybees

(アジア原産ミツバチの α -グルコシダーゼアイソザイムの
構造と機能に関する研究)

学位論文内容の要旨

博物学全盛時代に 600 種以上あったミツバチ属は、現在 9 種に整理された。欧州・アフリカ原産の 1 種 (西洋ミツバチ) 以外は、全てアジアに生息する。ミツバチは植物が分泌するショ糖を集め蜂蜜を生産するが、生化学的にはショ糖の加水分解反応である。その特徴は 0.8 M 以上の高基質濃度で行われることである。第 2 の特徴は、遺伝子が違う 3 種類のアイソザイムが存在することであり、体内の局在部位や発現時期が異なる。第 3 の特徴は、3 酵素の基質特異性に相違があり、単量体でありながらアロステリック的な挙動を示す酵素が存在する点である。これらは西洋ミツバチ (*Apis mellifera*) における知見である。一方、マルハナバチには 2 種の α -グルコシダーゼしか見出せず、膜翅類に属する昆虫では、アイソザイムの数や生理的役割が異なることが予想された。また、単量体アロステリック酵素の解析は基礎学問的に興味深い知見を与える。本研究は、2 種のアジア原産ミツバチである東洋ミツバチ (*Apis cerana*) とコミツバチ (*Apis florea*) に α -グルコシダーゼアイソザイムが存在することを明らかにし、それらの構造と機能を究明した。

(1) 東洋ミツバチ α -グルコシダーゼの精製と性質解析

東洋ミツバチは入手が容易なニホン亜種 (*A. cerana japonica*) を用いた。試料を磨砕し得た粗酵素液を硫酸塩析クロマトに供すると、活性は 2 つに分離した (画分 1 および 2)。硫酸の高濃度で溶出した画分 1 に対し、さらにイオン交換とゲル濾過のクロマト操作を行い、電気泳動的に単一な酵素標品 (JHG I) を得た。JHG I は分子量 82,000 の単量体であり、21%の糖を含む糖タンパク質であった。酵素活性は、pH 5.0 に至適を与え、pH 4.5-10.5 および 40°C 以下で安定であった。N 末アミノ酸は閉塞していた。JHG I は基質の種類に応じて 3 つの挙動を示した。高濃度で反応速度が活性化する負の協同性を示す基質 (マルトース、ショ糖、合成配糖体)、正の協同性を示す基質 (ツラノース) およびミカエリス型の反応を示す基質 (マルトース以外のマルトオリゴ糖とコジビオース) である。反応の詳細な解析から、特に負の協同性を与える基質については、加水分解反応と切断反応の速度パラメータを求めた。高分子の可溶性澱粉に対する分解活性はなかった。硫酸塩析クロマトの画分 2 (低濃度の硫酸で溶出する活性画分) からは、イオン交換、ゲル濾過および疎水クロマトのカラム操作で電気泳動的に単一な α -グルコシダーゼ (JBG II) を精製した。JBG II は分子量 76,000 のモノマー酵素で 17%の糖を含み、N 末端配列を確認できた。至適

pH は 4.5、温度や pH に対しそれぞれ 40°C 以下および pH 4.5-11 の範囲で安定であった。JHG I より広い基質特異性を示し、マルトオリゴ糖より合成配糖体への活性が強かった。可溶性澱粉のような高分子基質も分解したが、正の協同性が観察されたためアロステリック酵素であることが判明した。以上の結果から東洋ミツバチに性質の異なる 2 種の酵素を確認できた。

(2) 東洋ミツバチ α -グルコシダーゼの遺伝子単離とアイソザイムの確認

PCR により JHG I および JHG II の遺伝子を単離した。JHG I および JHG II の cDNA は、それぞれ 1,930bp および 1,863bp からなり、577 および 579 残基のアミノ酸配列をコードしていた。両酵素をプロテアーゼ分解し得られたペプチド断片のエドマン分析や質量分析から遺伝子の照合を行った。JHG I および JHG II のアミノ酸一次配列は一致しないことから、2 つの酵素はアイソザイムであることが明らかになった。glycoside hydrolase family (GH) 13 酵素に見られる触媒作用や基質認識に重要な 4 つの領域があることから GH13 に属し、3 ドメイン (N、B および C ドメイン) の構造を形成すると予想された。配列比較から JHG I および JHG II は、西洋ミツバチのアイソザイム I および II に相当することが判明した。単量体アロステリック酵素であるアイソザイム I と JBG I を比較すると、B および C ドメインにアミノ酸の置換や欠損が集中していた。アミノ酸の保存度が高い N ドメインに協同性を発揮させる構造があると考えられた。立体構造が既知の類縁酵素との二次構造予測を行い、特徴的な性質に関し考察を行った。

一方、西洋ミツバチにはアイソザイム III (HBG III) が存在する。その存在を調べるため、cDNA ライブラリーに対し HBG III に特異的な DNA 配列を有するプライマーを用いて PCR を行った。得られた増幅 DNA 断片の塩基配列を解析したところ、HBG III 様蛋白質 (JBG III) 遺伝子の一部であることが確認できた。単離した JBG III の cDNA は 1,922bp の塩基配列を有していた。コードされた 567 残基のアミノ酸配列は、JHG I および JHG II のものとは異なり、むしろ HBG III に高い相同性を示した。しかし、東洋ミツバチ成虫における HBG III 様蛋白質の存在量は少ないと予想された。配列解析を行い本タンパク質も GH13 に属することを認めた。これらの知見から東洋ミツバチには 3 種類の α -グルコシダーゼアイソザイムが存在することが判明した。

(3) コミツバチ α -グルコシダーゼの精製と性質

タイに生息するコミツバチから α -グルコシダーゼの精製を行った。粗酵素液の硫酸塩析クロマトで酵素活性は大きく 4 つの画分に分離した。マルターゼ活性とイソマルターゼ活性が異なるため、コミツバチにもアイソザイムの存在が確認された。そのうち画分 1 と 2 をさらに疎水クロマト、ゲル濾過やイオン交換の各種分離に供し、電気泳動的に単一な α -グルコシダーゼを 2 つ精製した (それぞれ TBGI と TBGII)。

TBG I は、分子量 89,000 を与える単量体の糖タンパク質であった。至適 pH は 5.5 であり、pH 5.0-10.5 および 45°C 以下の安定性を示した。 α -1,3 および α -1,6 グルコシド結合をそれぞれ有するニゲロースやイソマルトースおよび高分子の可溶性澱粉に対する作用が認められなかった。マルトオリゴ糖、ショ糖や合成配糖体に対し高い活性を示した。JBG I と同様に基質の分解に対し、正および負の協同性やミカエリス型の反応様式を与えた。従って、本酵素はアイソザイム I に相当すると考えられた。単量体タンパク質で基質の種類により正および負の協同性を示すアロステリック酵素の報告例は極めて稀である。特に、アイソザイム I の反応速度は、ショ糖の高濃度で飽和せず、分解作用が活性化されるため、高い基質濃度に適した α -グルコシダーゼである。また、

TBG II は、分子量 71,000 の単量体糖タンパク質であり、pH 5.0 に至適を、pH 4.5-10.9 および 45°C 以下の安定域を示した。基質認識は広く、特にコジビオースや可溶性澱粉の分解に対し、正の協同性を示すアロステリック酵素であった。性質の比較から、TBG II はアイソザイム II に相当すると判断した。アイソザイム I と II は、調べたミツバチ種全てに見出されたことから、*Apis* 属に共通する重要な酵素である。これらの結果から *Apis* 属には α -グルコシダーゼがアイソザイムとして存在すると予想された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 淳 夫

副 査 教 授 伴 戸 久 徳

副 査 助 教 授 森 春 英

学 位 論 文 題 名

Catalytic Mechanism and Molecular Structure of α -Glucosidase Isozymes from Asian Honeybees

(アジア原産ミツバチの α -グルコシダーゼアイソザイムの
構造と機能に関する研究)

本論文は、英文 166 頁、図 62、表 23、7 章からなり、参考論文 3 編が添えられている。

博物学全盛時代に 600 種以上あったミツバチ属は、現在 9 種に整理された。欧州・アフリカ原産の 1 種 (西洋ミツバチ) 以外は、全てアジアに生息する。ミツバチは植物が分泌するショ糖を集め蜂蜜を生産するが、生化学的には α -グルコシダーゼが触媒するショ糖の加水分解反応である。その特徴は 0.8 M 以上の高基質濃度で行われることである。第 2 の特徴は、基質特異性や遺伝子が違う 3 種類のアイソザイムが存在し、単量体アロステリック酵素としての α -グルコシダーゼが存在する点である。これらは西洋ミツバチにおける知見である。一方、マルハナバチには 2 種の α -グルコシダーゼしか見出せず、膜翅類に属する昆虫では、アイソザイムの数や生理的役割が異なると予想された。また、単量体アロステリック酵素の解析は基礎学問的に興味深い知見を与える。本研究は、2 種のアジア原産ミツバチである東洋ミツバチとコミツバチに α -グルコシダーゼアイソザイムが存在することを明らかにし、それらの構造と機能を究明した。

(1) 東洋ミツバチ α -グルコシダーゼの精製と性質解析

東洋ミツバチの粗酵素液を塩析クロマトに供すると、活性は 2 つに分離した (画分 1 と 2)。画分 1 から精製された α -グルコシダーゼ (JHG I) は分子量 82,000 の単量体糖タンパク質であった。至適は pH 5.0 にあり、pH 4.5-10.5 および 40°C 以下で安定であった。N 末アミノ酸は閉塞していた。基質の種類に応じて 3 つの挙動を示した。高濃度で反応速度が活性化する負の協同性を示す基質、正の協同性を示す基質とミカエリス型の反応を示す基質であ

る。反応の解析から切断反応や協同性に対する速度パラメータを求めた。高分子基質は分解しなかった。塩析クロマトの画分 2 から酵素 (JBG II) を精製した。JBG II は分子量 76,000 のモノマー酵素で糖を含み、N 末端配列を確認できた。至適 pH は 4.5、温度や pH に対しそれぞれ 40°C 以下および pH 4.5-11 の範囲で安定であった。JHG I より広い基質特異性を示し、合成配糖体への活性が強かった。可溶性澱粉 (高分子基質) も分解したが、正の協同性が観察されアロステリック酵素であることが判明した。以上の結果から東洋ミツバチに性質の異なる 2 種の酵素を確認できた。

(2) 東洋ミツバチ α -グルコシダーゼの遺伝子単離とアイソザイムの確認

単離した JHG I および II の cDNA (それぞれ 1,930bp および 1,863bp) は、577 および 579 残基のアミノ酸配列をコードした。配列は一致せず、両酵素はアイソザイムである。配列比較から JHG I および JHG II は、西洋ミツバチのアイソザイム I および II に相当することが判明した。立体構造既知の類縁酵素との二次構造予測を行い、特徴的な性質に関し考察を行った。西洋ミツバチにはアイソザイム III (HBG III) が存在する。その存在を調べるため、HBG III 様蛋白質 (JBG III) 遺伝子のクローニングを行った。単離した 1,922bp の cDNA にコードされたアミノ酸配列 (567 残基) は、JHG I や II とは異なり、HBG III に高い相同性を示した。これらの知見から東洋ミツバチには 3 種類の α -グルコシダーゼアイソザイムが存在することが判明した。

(3) コミツバチ α -グルコシダーゼの精製と性質

コミツバチの粗酵素液を用いた塩析クロマトで酵素活性は 4 画分に分離した。画分 1 と 2 から α -グルコシダーゼを精製した (それぞれ TBG I と TBG II)。TBG I は、分子量 89,000 を与える単量体の糖タンパク質であった。至適 pH は 5.5 であり、pH 5.0-10.5 および 45°C 以下の安定性を示した。 α -1,3 や α -1,6 結合のグルコ 2 糖および高分子基質への作用がなかった。基質の種類により正および負の協同性やミカエリス型の反応様式を与えた。従って、本酵素はアイソザイム I に相当すると考えられた。TBG II は、分子量 71,000 の単量体糖タンパク質であり、pH 5.0 に至適を、pH 4.5-10.9 および 45°C 以下の安定域を示した。基質認識は広く、コジビオースや可溶性澱粉の分解に対し、正の協同性を示すアロステリック酵素であった。性質の比較からアイソザイム II に相当すると判断した。コミツバチにもアイソザイムが存在することが分った。

以上のように本研究は、アジア原産ミツバチにおいて初めて α -グルコシダーゼアイソザイムを単離し、性質ならびに分子構造を明らかにした。さらに、アイソザイム I と II が報告例の極めて稀な単量体アロステリック酵素であることを証明し、*Apis* 属に本アイソザイムシ

システムが普遍的に存在することを提唱した。本研究で究明された新知見は、昆虫酵素学の理解や単量体アロステリック酵素の基礎研究に対し大きく貢献するものである。

よって審査員一同は、Jintanart Wongchawalit 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。