

# 植物 ADP-glucose pyrophosphorylase の構造および 活性調節機構に関する研究

## 学位論文内容の要旨

ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase, EC 2.7.7.27) は, ATP とグルコース 1-リン酸 (Glc 1-P) からデンプン生合成における唯一の基質, ADP-グルコース (ADPG) を生成する反応を触媒し, デンプン生合成量を左右する鍵酵素の一つである. ほぼすべての植物 AGPase は, 3-ホスホグリセリン酸 (3-PGA) による活性化および正リン酸 (Pi) による阻害を介したアロステリック調節を受けるが, その分子機構の詳細は不明である. 植物 AGPase は異なる遺伝子にコードされた大小サブユニットから構成されるヘテロ 4 量体である. 両サブユニットの役割は異なり, 主として小サブユニットが触媒活性を, 大サブユニットがアロステリック特性を担っているが, 両サブユニットの一次構造の類似性は高く, 共通の祖先遺伝子から進化したと考えられている. 一般的に, 植物における大サブユニット遺伝子は, 小サブユニット遺伝子に比べて多様であり, 器官特異的な発現パターンを示す. このことは, 器官によって異なるアロステリック調節特性を有する AGPase が存在することを示すが, その生理的な意義は明らかではない. 本研究では, 大サブユニットに焦点を当て, ① アロステリック特性変異酵素の作製と植物での発現, ② アロステリック特性変異酵素における活性調節機構の解析, ③ ATP 結合機能の解析により, アロステリック調節機構を明らかにすることを目的とした. また, ④ ヘテロ大サブユニット酵素の解析により, 酵素の 4 量体構造の多様性について検討した.

### ① アロステリック特性変異酵素の作製と植物での発現

ジャガイモ塊茎 AGPase 大サブユニット (PLS) で単離された Up1 (E38K) および Up2 (G101N) 変異は, 3-PGA の活性化を受けやすく, Pi 阻害に高い抵抗性をもつ「活性調節上昇型 (up-regulated)」アロステリック特性を示す. 本研究では, さらなる活性調節上昇型酵素を得るため, シロイヌナズナ AGPase 大サブユニット ApL1 に Up1 および Up2 変異に相当する変異を同時に導入 (Up3 変異; A33K and G96N) し, シロイヌナズナ野生型小サブユニット (ApS1) と組み合わせた変異シロイヌナズナ AGPase (AA-Up3) を作製した. AA-Up3 のアロステリック特性は, 両変異の単純な相加的産物ではなく, AA-Up3 は野生型酵素では阻害物質である Pi (低濃度) により活性化された. この特性は, 植物内で高い AGPase 活性維持に貢献すると考えられ, 実際, シロイヌナズナ ApL1 欠損株へ Up3 ApL1 遺伝子を導入した形質転換体は, 野生型植物より高い同化デンプン蓄積量および同化デンプン代謝回転率を示し, 植物生長等を支える炭素供給能の向上が示唆された.

### ② アロステリック変異酵素の活性調節機構の解析

大サブユニットへの Up3 変異導入による Pi 活性化機構を解析するため、Up3 変異を導入した、ジャガイモ塊茎 AGPase (PP-Up3), ApS1 および PLS から構成される hybrid AGPase (AP-Up3) を作製し、AA-Up3 と共にアロステリック特性を調べた。AP-Up3 酵素は、Pi 濃度依存性の活性上昇を示したが、PP-Up3 酵素は Pi 濃度に関係なく一定の活性を示した。いずれの Up3 酵素も 3-PGA 非存在下での高い酵素活性を示し、Up3 変異は酵素を活性型に近い構造に変化させることが示唆された。また、Pi による活性化には 3-PGA が必要なことから、Up3 酵素において Pi は 3-PGA との親和性を増加させて活性を上昇 (活性化) させると考えられた。さらに、結晶構造が解析されているジャガイモ塊茎小サブユニットを鋳型とした大サブユニットの立体構造モデルから、両変異の構造位置および構造変化を予測した。Up1 変異は自身が存在するループ構造は変えず、近傍に存在し、小サブユニットとの相互作用に関係するループ・ヘリックス構造を、また、Up2 変異は Pi 結合部位の後方のループ構造を改変すると予想された。これらのことから、Up3 酵素の Pi 活性化は (1) Up2 変異による Pi 親和性の低下と阻害への抵抗性および (2) Up1 変異による大小サブユニット間の相互作用変化を介したシグナル伝達の改変により生じていると考えられた。

### ③ ATP 結合機能の解析

触媒活性をもたない大サブユニットも ATP 結合能を保持していることが知られている。Up1 変異が位置する領域は ATP 結合部位に相当することから、大サブユニットの ATP 結合はアロステリック調節に寄与していると考えられた。立体構造モデルより ATP 結合残基を予測し、2 種の部位特異的変異 (Q127A と K41A) を PLS に導入し、野生型小サブユニットと組み合わせた変異酵素を作製した。8-azido-ATP によるフォトアフィニティラベル実験から、変異導入は大サブユニットの ATP 結合能を野生型大サブユニットの 80% に低下させるが、小サブユニットの ATP 結合能には影響しないことを明らかにした。一方、反応速度論的解析から、変異導入は酵素の ATP 親和性を野生型酵素の約 50% に減少させ、3-PGA 親和性および Pi 阻害への抵抗性も低下させることを示し、大サブユニットへの ATP 親和性の減少が大サブユニットの調節能力を低下させることを明らかにした。立体構造上、ATP 結合部位はアロステリック因子結合部位とは離れ、大小サブユニットの相互作用に関与する構造に隣接する。したがって、AGPase のアロステリック活性化は、大サブユニットへの 3-PGA の結合、ATP の結合による構造変化が小サブユニットへと伝達し、酵素を活性型へと移行させることにより起こることが示唆された。

### ④ ヘテロ大サブユニット酵素の解析

多くの植物貯蔵器官では複数の大サブユニットが同時に発現しており、シロイヌナズナ長角果にも 2 種の大サブユニット (ApL1 and ApL3) が同時に存在する。大腸菌内で、小サブユニット (ApS1) と ApL1 および ApL3 を共発現させ長角果の AGPase サブユニット発現をモデル化した。菌体抽出液をニッケルカラムクロマトグラフィーに供し、ApL3 に付加した His-tag を用いて分離分画を行った。イミダゾール濃度の低い画分に溶出された酵素は ApS1:ApL1:ApL3 = 2:1:1 で構成されるヘテロ大サブユニット AGPase ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) (S1/L1/L3-AGPase) であることが明らかとなった。S1/L1/L3-AGPase の比活性、熱安定性、基質親和性およびアロステリック特性は、ホモ大サブユニット AGPase (S1/L1- および S1/L3- AGPase) と同等の酵素機能を示した。したがって、異なる大サブユニットが同時に存在すれば、ホモ大サブユニット AGPase だけでなく、ヘテロ大サブユニット AGPase が構造的に安定した酵素として植物体内で十分存在可能であることが示唆され、多様なサブユニット構成の AGPase が貯蔵デンプン合成に寄与する可能性を示した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 伊 藤 浩 之  
副 査 教 授 松 井 博 和  
副 査 教 授 横 田 篤  
副 査 助 教 授 森 春 英

学 位 論 文 題 名

## 植物 ADP-glucose pyrophosphorylase の構造および 活性調節機構に関する研究

本論文は、図 41、表 11、引用文献 191 を含み、6 章からなる総ページ 138 の和文論文である。別に参考論文 2 編が添えられている。

植物が合成するデンプンは人類に欠くことのできないエネルギー源であるが、その生合成経路の詳細は明らかになっていない。ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase; EC 2.7.7.27) はデンプン生合成の基質を供給する鍵酵素であり、その酵素活性はデンプン生合成量を左右する。本研究は、生体内で AGPase 活性を制御するアロステリック調節機構を明らかにするとともに、AGPase の酵素構造の多様性を理解する目的で行われた。

AGPase は、ATP とグルコース 1-リン酸 (Glc 1-P) からデンプン生合成における唯一の基質、ADP-グルコース (ADPG) を生成する反応を触媒する酵素である。植物 AGPase は、3-ホスホグリセリン酸 (3-PGA) による活性化および正リン酸 (Pi) による阻害を介したアロステリック調節を受けるが、その分子機構の詳細は不明である。AGPase のアロステリック特性は、デンプン生合成量を左右することから、この詳細を理解することは植物生産性を向上させるために極めて重要である。植物 AGPase は異なる遺伝子にコードされた大小サブユニットから構成されるヘテロ 4 量体であり、両サブユニットの役割は異なり、主として小サブユニットが触媒活性を、大サブユニットがアロステリック特性を担うと考えられている。植物における大サブユニット遺伝子は小サブユニット遺伝子に比べて多様であり、器官特異的な発現パターンを示す。このことは、器官によって異なるアロステリック特性を有する AGPase が存在することを示すが、その生理的な意義は明らかではない。したがって、どのような酵素特性をもつ AGPase が各器官で機能するかを明らかにすることは、デンプン生合成全体を考える上で重要である。

ジャガイモ塊茎 AGPase 大サブユニット (PLS) のランダム変異導入により得られた 2 種の Up1 および Up2 変異は、3-PGA の活性化を受けやすく、Pi 阻害に高い抵抗性をもつ「活性上昇型 (up-regulated)」酵素を与えた。本研究では、シロイヌナズナ AGPase 大サ

ブユニット ApL1 に Up1 および Up2 変異に相当する変異を同時に導入 (Up3 変異) し、小サブユニット ApS1 と共発現させ、2重変異酵素 (AA-Up3) を作製した。AA-Up3 は野生型酵素では阻害物質である Pi により活性化された。この特性は、植物内での高い AGPase 活性維持に寄与すると考えられ、実際、AA-Up3 を発現するシロイヌナズナ形質転換体は、野生型植物より高い同化デンプン代謝回転率を示し、植物生長等を支える炭素供給能の向上が示唆された。

Up3 変異酵素のアロステリック特性解析ならびに立体構造モデリングから、Up3 変異導入による Pi 活性化機構が、Up2 変異による Pi 親和性の低下と阻害への抵抗性および Up1 変異による大小サブユニット間の相互作用変化を介したシグナル伝達の改変により生じていることを明らかにした。また、Up1 変異が位置する領域は ATP 結合部位に相当することから、推定 ATP 結合部位に変異を導入した変異酵素を作製した。8-azido-ATP によるフォトアフィニティラベル実験から、変異導入は大サブユニットの ATP 結合能を野生型大サブユニットの 80% に低下させるが、小サブユニットの ATP 結合能には影響しないことを明らかにした。一方、反応速度論的解析から、変異導入は酵素の ATP 親和性を野生型酵素の約 50% に減少させ、3-PGA 親和性および Pi 阻害への抵抗性も低下させることが示された。ATP 結合部位は大小サブユニットの相互作用に関与する構造に隣接することから、AGPase のアロステリック活性化は、大サブユニットへの 3-PGA の結合、ATP の結合による構造変化が小サブユニットへと伝達し、酵素を活性型へと移行させることにより起こることが示唆された。

シロイヌナズナ長角果では2種の大サブユニット (ApL1 & ApL3) が同時に存在する。大腸菌内で ApS1 と ApL1 および ApL3 を共発現させ長角果の AGPase サブユニット発現をモデル化した。菌体抽出液から ApL3 に付加した His-tag を利用して酵素精製したところ、ApS1:ApL1:ApL3 = 2:1:1 で構成されるヘテロ大サブユニット AGPase が得られた。この酵素は、ホモ大サブユニット AGPase と同等の酵素機能を示した。したがって、異なる大サブユニットが同時に存在すればホモ大サブユニット AGPase だけでなく、ヘテロ大サブユニット AGPase が安定した酵素として植物体内で十分存在可能であることが示唆された。

本研究では、AGPase のアロステリック特性を改変した「活性上昇型」酵素を作製し、その酵素特性および立体構造モデルの解析から、構造変化をともなう大小サブユニット間のシグナル伝達がアロステリック調節に重要であることを明らかにした。また、ATP が基質としてだけでなく、第3のアロステリック因子として機能することを示した。さらに、異なる大サブユニットをもつ AGPase 存在の可能性を示した。これらの知見は学術的のみならず、植物体内における炭素源を有効に利用しデンプン量を増加させるなどの応用面においても大いに貢献するものと判断した。

よって、審査員一同は、尾花由美子が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。