

学位論文題名

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

アイソザイムの網羅的機能解析

学位論文内容の要旨

Starch synthase (SS; EC 2.4.1.21 and EC 2.4.1.242) はデンプンの構成成分であるアミロースおよびアミロペクチンの合成を担う酵素であり, ADP グルコースのグルコース残基を既存の α -1,4 グルカン鎖の非還元末端に転移する反応を触媒する. 植物には複数の SS アイソザイムが存在し, 一次構造から GBSS, SSI, SSII, SSIII および SSIV の 5 クラスに分類される. 特定の SS アイソザイムを欠損した変異体植物ではデンプンの微細構造が変化するが, その影響は欠損したアイソザイムによって異なることが知られており, 各アイソザイムはデンプン合成において異なる生理的機能を担うと考えられている. GBSS は主にアミロース合成を, その他のアイソザイムはアミロペクチン合成を担うとされているが, 各アイソザイムの酵素特性については理解が進んでおらず, デンプン合成の分子機構は明らかにされていない. 特に SSIII および SSIV に関しては知見が少なく, 酵素機能に関しては一切報告がない. 本研究ではインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) を対象に, デンプン合成に果たす各 SS アイソザイムの固有の役割を明らかにすることを目的とし, 種々の SS アイソザイムの構造, 発現特性および酵素特性などを解析した.

1. SS アイソザイムの一次構造解析

これまでに, インゲンマメ由来の GBSS, SSI および SSII (PvGBSSa, PvSSI および PvSSIIb) をコードする cDNA が単離され, 一次構造ならびに大腸菌組換え酵素の特性が解析されてきた. 本研究では, PvGBSSb, PvSSIIa, PvSSIII および PvSSIV をコードする 4 種の cDNA を新たに単離した. SS はアイソザイム間で保存性が高く触媒に関わる C 末側の領域 (相同領域) と, 相同性が認められず機能が明らかにされていない N 末側の領域 (付加領域) からなる. 相同領域の一次構造の比較から, SS は GBSS, SSI および SSII からなるグループ A と, SSIII および SSIV からなるグループ B に分類された. プラスチドの起源とされるラン藻類に存在する 2 つの SS ホモログは各グループとそれぞれ近縁にあった. SS は植物の誕生以前から 2 つのグループに分岐しており, それぞれが独立して進化し多様化してきたと考えられた. したがって, 両グループの SS アイソザイムは異なる酵素特性を示し, デンプン合成における役割も異なると予想された.

2. SS アイソザイムの発現特性

各 *ss* 遺伝子の発現特性を比較したところ、同一クラスに属する 2 種の *pvgbss* および *pvss2* 遺伝子はそれぞれ発現器官や時期が異なることが明らかとなった。*pvgbssb* 遺伝子の発現は種子と葉で観察されたのに対し、*pvgbssa* 遺伝子の発現は種子でのみ認められた。また、*pvss2a* 遺伝子は主に種子で、*pvss2b* 遺伝子は主に葉で発現していた。*pvss3* および *pvss4* 遺伝子は主に葉で発現していたが、*pvss3* 遺伝子は登熟後期の種子でも発現が認められた。*pvss1* 遺伝子は *pvss2b* 遺伝子と類似した発現パターンを示した。

SS はデンプン粒内部にも存在することが知られている。*PvGBSSa* は登熟種子、*PvGBSSb* は葉のデンプン粒に蓄積しており、それぞれ異なる器官のアミロース合成に関与すると考えられた。*PvSSI* および *PvSSIIb* は葉および登熟初期の種子のデンプン粒に顕著に蓄積しており、両酵素はデンプン粒の初期合成に関与することが示唆された。登熟種子のデンプン粒には付加領域の大きさが異なる少なくとも 3 種以上の *PvSSIIa* アイソフォームが存在した。アイソフォームの形成機構および生理的意義は不明であるが、*PvSSIIa* のデンプン粒への集積に付加領域は必須でないことが明らかとなった。

3. 大腸菌発現酵素の解析

精製した大腸菌発現酵素 (*rPvGBSSa*, *rPvGBSSb*, *rPvSSI*, *rPvSSIIb*, *rPvSSIII* および *rPvSSIV*) の酵素特性を解析した。*rPvSSIII* および *rPvSSIV* はいずれも高い分子活性を示した。特に *rPvSSIII* の分子活性は高く、10 mg/ml アミロペクチンおよび 1 mM ADP グルコース存在下において他のアイソザイムの 13~270 倍であった。

反応産物の解析によって各クラスのアイソザイムの反応特性の明確な違いが明らかとなった。*rPvSSI* は外部鎖長が 6 程度の鎖に選択的に作用し、また、*rPvSSIIb* は重合度 10 以上の比較的高重合度の鎖に選択的に作用すると考えられた。一方、*rPvSSIII* および *rPvSSIV* はグルカン鎖の選択性が低く、様々な鎖長の単位鎖に対して濃度依存的な反応性を示した。

アミロペクチンを基質とした場合、*rPvGBSSa* と *rPvGBSSb* は連続的な伸長反応によって重合度 50 以上の超長鎖を合成した。一方、両酵素ともマルトヘキサオースを基質とした場合は不連続な反応性を示し、マルトヘプタオースが合成された。これらのことから、GBSS は α -1,6 分岐を認識していることが予想され、GBSS の特徴であるアミロース合成および高度なデンプン粒蓄積との関連が示唆された。

4. N 末付加領域の構造と機能

GBSS には付加領域はほぼ存在せず、SSI および SSII の付加領域には植物間で有意な相同性は見出されなかった。これに対し、SSIII と SSIV の付加領域内部にはそれぞれ植物間で高度に保存された領域が存在し、何らかの機能を有していると予想された。

SSIII の付加領域には 3 度の反復配列が存在し、それぞれバクテリア由来の starch-binding domain (SBD) と相同性を示した。*PvSSIII* の付加領域を欠失させた変異酵素 *rPvSSIII-C* は全長酵素 *rPvSSIII* に比べ、プライマーに対する親和性が劇的に低下した。また、付加領域のみからなる変異タンパク質 *rPvSSIII-N* は単独でも α -1,4 グルカン鎖と親和性を示した。これらの結果、*PvSSIII* の付加領域は SBD として機能することが明らかとなった。また、SBD は直接接触媒には関与せず、触媒部位をプライマー近傍にとどめ、見かけ上の基質濃度を上げる役割を担っていると考えられた。

PvSSIV の付加領域はヘリックスが逆平行に折り畳まれた構造で、タンパク質結合ドメインとして機能すると予測された。Blue-native PAGE による解析の結果、rPvSSIV は付加領域を介して二量体を形成することが明らかとなった。付加領域を欠失させた変異酵素 rPvSSIV-C は単量体として存在し、全長酵素 rPvSSIV と異なる速度パラメーターを示したものの、グルカン鎖の選択性は変化しなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 井 博 和
副 査 教 授 木 村 淳 夫
副 査 助 教 授 伊 藤 浩 之
副 査 助 教 授 和 田 大

学 位 論 文 題 名

インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) starch synthase アイソザイムの網羅的機能解析

本論文は、図 29、表 4、引用文献 136 を含み、5 章からなる総ページ 117 の和文論文である。別に参考論文 5 編が添えられている。

Starch synthase (SS; EC 2.4.1.21 and EC 2.4.1.242) は ADP グルコースのグルコース残基を既存の α -1,4 グルカン鎖の非還元末端に転移する反応を触媒する酵素である。デンプン構成成分のアミロースとアミロペクチンのグルカン鎖伸長を担うことから、デンプンの微細構造を決定する極めて重要な酵素である。植物には複数の SS アイソザイムが存在し、一次構造から GBSS, SSI, SSII, SSIII および SSIV の 5 クラスに分類されている。特定の SS アイソザイムを欠損した変異体植物ではデンプンの微細構造が変化するが、その影響は欠損したアイソザイムによって異なることが知られており、各アイソザイムはデンプン生合成において異なる生理的機能を担うと考えられている。しかしながら、各アイソザイムの酵素特性についての理解は進んでいない。本研究では、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) を対象に、SS アイソザイムの構造と機能の相関を理解し、デンプン生合成に果たす各 SS アイソザイムの固有の役割を明らかにすることを目的として行われた。

これまでに、インゲンマメ由来の GBSS, SSI および SSII (PvGBSSa, PvSSI および PvSSIIb) をコードする cDNA が単離され、一次構造ならびに大腸菌組換え酵素の特性が解析されてきた。本研究では、PvGBSSb, PvSSIIIa, PvSSIII および PvSSIV をコードする 4 種の cDNA を新たに単離した。各 *ss* 遺伝子の発現特性を比較した。*pvgbssb* 遺伝子の発現は種子と葉で観察されたのに対し、*pvgbssa* 遺伝子の発現は種子でのみ認められた。また、*pvss2a* 遺伝子は主に種子で、*pvss2b* 遺伝子は主に葉で発現していた。*pvss3* および *pvss4* 遺伝子は主に葉で発現していたが、*pvss3* 遺伝子は登熟後期の種子でも発現が認められた。*pvss1* 遺伝子は *pvss2b* 遺伝子と類似した発現パターンを示した。

一次構造から、SS はアイソザイム間で保存性が高く触媒に関わる C 末側の領域 (相同領域) と相同性が認められず機能未知の N 末側の領域 (付加領域) からなることが明らか

となった。GBSS には付加領域はほとんど存在せず、SSI および SSII の付加領域には植物間で有意な相同性は見出されなかった。一方、SSIII と SSIV の付加領域内部にはそれぞれ植物間で高度に保存された領域が存在し、何らかの機能を有していると予想された。

精製した大腸菌発現酵素 (rPvGBSSa, rPvGBSSb, rPvSSI, rPvSSIIb, rPvSSIII および rPvSSIV) の酵素特性を解析した。rPvSSIII および rPvSSIV はいずれも高い分子活性を示した。特に rPvSSIII の分子活性は高く、他のアイソザイムの 13~270 倍であることが明らかとなった。また、反応産物の解析によって各クラスのアイソザイムが異なる反応特性を示すことを明らかにした。rPvSSI は外部鎖長が 6 程度の鎖に選択的に作用し、また、rPvSSIIb は重合度 10 以上の比較的高重合度の鎖に選択的に作用すると考えられた。一方、rPvSSIII および rPvSSIV はグルカン鎖の選択性が低く、様々な鎖長の単位鎖に対して濃度依存的な反応性を示した。アミロペクチンを基質とした場合、rPvGBSSa と rPvGBSSb は連続的な伸長反応によって重合度 50 以上の超長鎖を合成した。しかし、両酵素ともマルトヘキサオースを基質とした場合は不連続な反応性を示し、マルトヘプタオースが合成された。これらのことから、GBSS は α -1,6 分岐を認識していることが予想され、GBSS の特徴であるアミロース合成および高度なデンプン粒蓄積との関連が示唆された。

SSIII の付加領域にはバクテリア由来の starch-binding domain (SBD) と相同性を示す 3 回の反復配列が存在した。PvSSIII の付加領域を欠失させた変異酵素 rPvSSIII-C は rPvSSIII に比べ、プライマーに対する親和性が劇的に低下した。また、付加領域のみからなる変異タンパク質 rPvSSIII-N は単独でも α -1,4 グルカン鎖と親和性を示した。これらの結果、PvSSIII の付加領域は SBD として機能することが明らかとなった。また、SBD は直接接触媒には関与せず、見かけ上の基質濃度を上げる役割を担っていると考えられた。PvSSIV の付加領域はヘリックスが逆平行に折り畳まれた構造で、タンパク質結合ドメインとして機能すると予測された。Blue-native PAGE による解析の結果、rPvSSIV は付加領域を介して二量体を形成することが明らかとなった。付加領域を欠失させた変異酵素 rPvSSIV-C は単量体として存在し、全長酵素 rPvSSIV と異なる速度パラメーターを示したが、グルカン鎖の選択性は変化しなかった。

本研究では、SSIII および SSIV アイソザイムの酵素特性をはじめて明らかにするとともに、インゲンマメ由来 6 種の SS アイソザイムのグルカン鎖伸長特性が異なることを示した。また、変異酵素の解析から、SSIII アイソザイムの付加領域がデンプン結合ドメインとして機能すること、SSIV アイソザイムの付加領域がタンパク質結合ドメインとしての機能を有することを証明した。これらの成果は、学術的に高い価値をもつだけでなく、ドメイン構造を利用した新機能酵素創出やデンプンの質的改変などへの応用にも寄与するものと判断した。

よって、審査員一同は、瀬野浦武志が博士（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。