

第42回（平成26年度）研究奨励金受領者研究報告

澱粉の生合成に必要な枝切り酵素の構造機能研究

秋田県立大学生物資源科学部 鈴木龍一郎

研究の目的

澱粉やグリコーゲンは、多様な生物において貯蔵多糖として利用されている。澱粉の主成分であるアミロペクチン分子は規則正しい分岐から成る構造を取るが、グリコーゲンは規則的な構造を持たない。枝切り酵素 (DBE; EC 3.2.1.33) は、これら分岐 α -グルカンの α -1,6-結合の加水分解反応を触媒し、分岐鎖を根元から除去する。グリコーゲンを生産する生物種由来の DBE は、グリコーゲンの分解に関わることが知られている。一方、イネなどの澱粉を生産する生物種の DBE は、アイソザイムの種類によってアミロペクチン分子の分解だけでなく生合成にも関わり、アミロペクチン分子の分岐パターンに影響を与えることが知られている。

一般にシアノバクテリアはグリコーゲンを生産するが、ごく一部の単細胞種は澱粉を生産することが見出されている。バクテリア由来の DBE は、一部の例外を除いて GlgX と呼ばれている。シアノバクテリアは *glgX* 遺伝子を 0 から最大で 3 つまで有しているが、*glgX* 遺伝子数と生産される多糖特性との間に関連は見られない。澱粉生産性シアノバクテリア *Cyanobacterium* sp. CLg1(CLg1) 株は、*glgX* 遺伝子を 2 つ (*glgX1*, *glgX2*) 有しており、GlgX1 と GlgX2 は 41% のアミノ酸配列相同性を示す。CLg1 株における *glgX2* 変異株の解析から、本遺伝子が澱粉の生合成に関わり、アミロペクチン分子の分岐パターンに影響を与えることが見出されている。CLg1 株由来 GlgX1 および GlgX2 の特性と結晶構造を解明し、両者の差異を明確にすることは、学術的観点から大変興味深い。しかし、CLg1 株由来 GlgX1 および GlgX2 の *in vitro* での特性解析は報告例がない。そこで本研究では、CLg1 株由来 GlgX1 および GlgX2 に着目し、両者の特性と結晶構造を解明することを目的とした。

結果と考察

まず、CLg1 株由来 *glgX1* および *glgX2* 遺伝子の大腸菌内での大量発現系を構築した。*glgX1* および *glgX2* 遺伝子をそれぞれ別個にプラスミドベクター pCold I (TaKaRa Bio) に連結後、大腸菌に導入し、常法により培養した。

超音波破碎により菌体を破碎し不溶性画分と可溶性画分に分離したところ、*glgX1* および *glgX2* いずれにおいても可溶性画分に大量発現させることができた。両酵素を Ni アフィニティーおよびゲルろ過クロマトグラフィーによって、SDS-PAGE のゲル上で单一バンドになるまで精製した。

4種類の多糖（カキ由来グリコーゲン (GG), ポテト由来アミロペクチン (PAP), プルラン (PUL), ホスホリラーゼ限界デキストリン (Φ -LD)）を基質として、30°C, pH7.0 の条件で酵素反応を行い、ソモギーネルソン法によって比活性を測定した。その結果 GlgX1 は、すべての基質に対して活性を示したが、GlgX2 はいずれの基質に対しても活性を示さなかった（図1, 左）。これに対し、両酵素の活性を 20 mM Mg²⁺ 存在下で測定したところ、GlgX1 の PUL

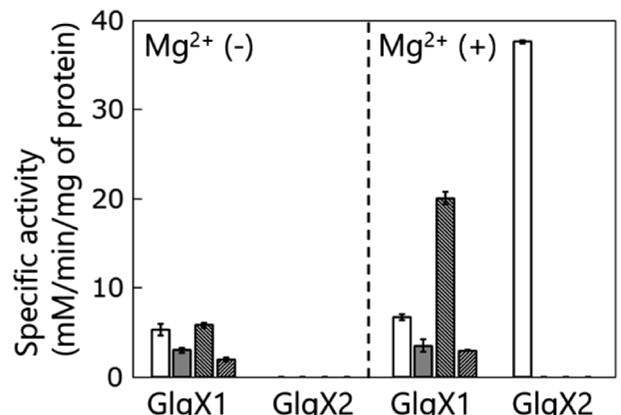


図1 CLg1 株由来 GlgX1 および GlgX2 の非活性測定結果。基質: PAP (□), GG (■), PUL (■), Φ -LD (■) Mg²⁺ (-): Mg²⁺ 非存在下, Mg²⁺ (+): 20 mM Mg²⁺ 存在下

表1 GlgX2 結晶の X 線回折データ収集結果。

Data collection statistics	
Wavelength (Å)	1.00000
Space group	C222 ₁
Unit-cell parameters (Å)	$a = 125.07, b = 219.20, c = 224.61$
Resolution range (Å)	50.00 – 2.30 (2.34 – 2.30)
R_{merge}	0.416 (0.081)
Completeness (%)	100.0 (100.0)
Multiplicity	7.5 (7.6)
Average I/σ (I)	21.4 (5.0)
Unique reflections	136,186 (6,759)
Total reflections	4,010,607

に対する活性は3.4倍に上昇したが、その他の基質に対する活性はMg²⁺による影響をほとんど受けなかった。一方GlgX2は、PAPに対してのみ極めて高い活性を示した(図1、右)。GlgX2の基質特異性やMg²⁺依存性は、CLg1株から部分精製した酵素標準品を用いた先行研究の報告を支持するものである。以上の結果から、GlgX1は短鎖の基質を好むが、GlgX2は長鎖の基質を好むことが明らかとなった。他の生物種が持つDBEのうち、短鎖の基質に作用する酵素群は、 α -グルカン分子の分解過程で働く傾向がある。それゆえGlgX1は、 α -グルカン分子の分解に関わると予想された。一方長鎖の基質に作用する酵素群は、アミロペクチン分子の生合成経路で働く傾向にあることから、GlgX2は α -グルカン分子の合成に関わる可能性が示唆された。

次にGlgX1およびGlgX2の特性の差異を立体構造から

解明することを目的として、GlgX1およびGlgX2の結晶化を試みたところ、GlgX2においてのみ結晶を得ることに成功した。糖鎖およびMg²⁺非存在下の条件で得られたGlgX2の結晶について、X線回折実験を行った結果、分解能2.3 Åのデータセットを収集し、空間群はC222₁と決定できた(表1)。現在、このデータセットを用いて分子置換法による構造解析を試みている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究奨励金を賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会ならびに関係者の方々に心より感謝申し上げます。また、本研究の共同研究者である秋田県立大学生物資源科学部の鈴木英治教授および木村友亮氏に感謝申し上げます。

植食性昆虫食害に対するイネの化学的防御応答の解明

山形大学農学部 網干貴子

研究背景

植物では植食性昆虫による食害を受けると、二次代謝物やプロテアーゼインヒビターの合成など食害に対する抵抗性が誘導される。また、トウモロコシやタバコでは、昆虫の食害によりテルペソやインドールなどの揮発成分を放出し、寄生蜂を誘引することが知られている。これらの抵抗性は、食害を受けた部位からジャスモン酸などのシグナル伝達物質の生合成を介して誘導され、防御物質の生産へとつながっている。

受領者等は植物の化学的防御応答に注目し、植食性昆虫の食害や植物ホルモン処理により誘導されるイネの代謝物の解析を行ったところ、ジャスモン酸処理により非タンパク性アミノ酸の β -tyrosine(β -Tyr)の蓄積が誘導されることを見出した。植物からの β -Tyrの同定はこれが初めてであった。植物には数多くの代謝物が存在するが、同定されている代謝物は一部に過ぎず、植物抽出液をHPLCで分析すると多くの未知ピークが観測される。植物の防御応答の新たな知見を得るために、未知代謝物の同定・解析が重要である。

そこで本研究では、イネにおける β -Tyrの役割の解明を進めるとともに、新たな誘導性代謝物の探索を行った。

結果と考察

1) イネ品種間における β -Tyrの分布

イネ品種間における β -Tyr含量の比較を、遺伝的多様性

を広くカバーしている農業生物資源研究所のコアコレクションを用いて行った。世界のイネのコアコレクションでは、全69品種中7品種から β -Tyrを検出した。一方、日本在来品種のコアコレクションでは、全50品種中33品種から β -Tyrを検出した。 β -Tyrが日本在来の品種に多く含まれるのは、日本で好まれる形質と関係しているためなのか、現時点では不明であるが、今後イネにおける β -Tyrの役割の解明が進むことで、日本在来品種への偏在の理由が明らかになると期待している。

2) 根の生長に対する β -Tyrの影響

β -Tyrがどのような生理活性を示すのか検討したところ、シロイスナズナ根の生長を抑制することが明らかとなった。図1は、 β -Tyrを含む寒天培地上で栽培したシロイスナズナの写真である。 β -Tyr濃度が高くなるにつれて、根の生長がより強く抑制された。そこで他の植物に対しても、 β -Tyrが根の生長を抑制するのか検討したところ、单子葉類よりも双子葉類に対して低濃度で根の生長を抑制し、イネ自体の成長はほとんど抑制しないことが分かった(表1)。 β -Tyrの役割の一つとして、他の植物の生育を抑制するアレロパシー活性が考えられた。

2) 傷害処理によるオキシリピン類の増加

新たな誘導性未知代謝物の探索にあたり、本研究ではvapor phase extraction(VPE)を用いた。VPEはトウモロコシから新規防御物質の10-oxo-11-phytodienoic acid(オキシリピン)やkaulexin, zealexin(テルペソ)を同定したSchmelz博士のグループが用いている分析系(Schmelz *et al.*, 2004)で、本方法を用いた研究例は未だ