

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660079

研究課題名(和文)植物の澱粉粒分解に対する新しい理論の構築と応用研究

研究課題名(英文)Novel mechanism of starch-granule degradation and its application

研究代表者

木村 淳夫(KIMURA, Atsuo)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90186312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、植物 α -グルコシダーゼが示すデンプン粒分解の分子機構を究明し「当該酵素が本分解系の鍵酵素である」の理論を確立することであり、以下の成果が得られた。(1)植物酵素がデンプン粒の吸着・分解現象を示し、分解系の鍵酵素になることが示唆された。(2)テンサイ酵素が長鎖基質に高い作用を示す機構を立体構造や阻害剤を用いた解析から明らかにした。(3)イネ酵素のデンプン粒吸着・分解に関わる構造因子を解明した。(4)植物 α -アミラーゼと α -グルコシダーゼが相乗的にデンプン粒を分解することを究明した。

研究成果の概要(英文)：This project aims at the formation of theory that plant α -glucosidase is the key-enzyme to degrade starch granules by elucidating its molecular mechanism. The following results were obtained. (1) Plant enzymes display the starch granule-binding and α -hydrolyzing abilities, implying that key-enzyme is an α -glucosidase. (2) We clarify the long substrate recognition mechanism of sugar beet α -glucosidase by the analysis using its three-dimensional structure and long substrate-mimic inhibitors. (3) We also reveal the structural factor of rice enzyme to bind and hydrolyze starch granules. (4) It is found that plant α -amylase and α -glucosidase synergistically degrade starch granules.

研究分野：応用生物化学

キーワード：植物 デンプン粒分解 長鎖基質認識酵素

1. 研究開始当初の背景

発芽種子のデンプン粒分解（生デンプン分解）は、教科書的には α -アミラーゼの分解で始まり、最後に α -グルコシダーゼがグルコースを生成する機構となっている（図1）。しかしながら、 α -アミラーゼは種子の吸水後にジベレリンで誘導され、発芽の初期には存在しない。 α -グルコシダーゼは未発芽の種子に大量に存在し、吸水と同時に反応が可能である。本酵素に特異的な阻害剤を種子に与えると、発芽の停止とともにデンプン分解が低下した（Konishi, 1994）。用いた阻害剤はアミラーゼ類の活性に影響しないため、デンプン粒に対する α -グルコシダーゼの反応が重要であると想像された。以上の知見を基に、イネ α -グルコシダーゼによるデンプン粒への直接作用を観察すると、吸着・分解が見出された（Nakai, 2007-a; 2007-b）。本結果は植物 α -グルコシダーゼがデンプン粒分解の鍵酵素であることを暗示し（図2）、分子機構を解明することで『発芽過程におけるデンプン分解代謝の再考、すなわち鍵酵素が α -グルコシダーゼであることを理論化』できる可能性を得た。一方、微生物 α -グルコシダーゼはデンプン粒に吸着・分解しないことが認められた。従って、本現象に関わる構造因子（構造因子は、1アミノ酸や配列などの小構造を指す科学用語）が植物 α -グルコシダーゼだけに存在すると想定された。さらに、当該機能がない微生物 α -グルコシダーゼに構造因子を移植することで吸着・分解能力の付与も可能になると想像できる。微生物 α -グルコシダーゼには産業に用いられているものもあり、応用性の高い酵素の作出も可能となる。

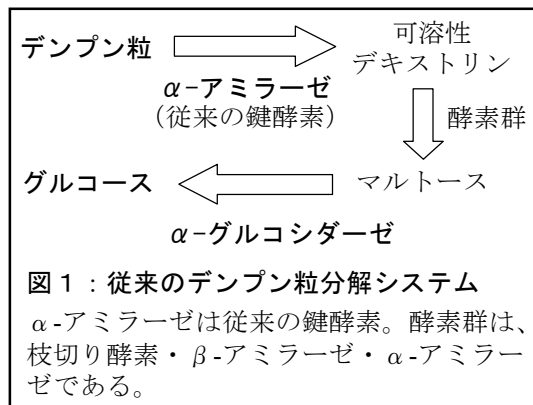


図1：従来のデンプン粒分解システム
 α -アミラーゼは従来の鍵酵素。酵素群は、枝切り酵素・ β -アミラーゼ・ α -アミラーゼである。

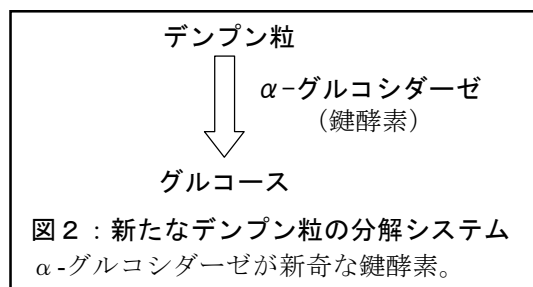


図2：新たなデンプン粒の分解システム
 α -グルコシダーゼが新奇な鍵酵素。

2. 研究の目的

α -グルコシダーゼは、オリゴ糖や配糖体の

α -グルコシド結合を加水分解し（オリゴ糖の場合は非還元末端側の結合に作用）、 α -グルコースを遊離させる酵素である（Kimura, 2000）。本研究の目的は、植物 α -グルコシダーゼが示すデンプン粒分解の機構究明を行い、鍵酵素であることの分子的基盤を確立することである。さらに応用研究への進展も試みる。以下に具体的な研究目標を示す。

(1) 植物 α -グルコシダーゼが示すデンプン粒分解能力の一般化：多くの植物 α -グルコシダーゼを用いてデンプン粒への吸着・分解現象を調べる。得られた結果を新たな鍵酵素の理論構築の一助とする。

(2) テンサイ α -グルコシダーゼの長鎖基質の認識：テンサイ α -グルコシダーゼの特徴は、短鎖基質よりデンプンなどを含む長鎖基質によく作用することである。最近、我々は同酵素の立体構造を解明した（Tagami, 2013-a）が、長鎖基質の認識に関与するアミノ酸が不明であるので解析する。本残基は、デンプン分解に寄与する重要な構造因子と推察できる。また、残基の分子機構を解明し、長鎖基質への作用機作も明らかにする。

(3) イネ α -グルコシダーゼの吸着部位の決定：イネ酵素と微生物 α -グルコシダーゼは、C末端領域において相同性が低い（図3）。従って、吸着に関わる構造因子が当該領域に存在する可能性があるので解析する。その際に、吸着・分解能力がない微生物 α -グルコシダーゼに植物酵素の構造因子を移植し、当該機能を付与する計画も併せて実施する。なお、図3に示すようにN末端領域の相同性も低い。我々は既にこの点に着目し、本領域に存在する構造因子を究明・報告した（Nakai, 2007-a）。

(4) 相乗効果： α -グルコシダーゼがデンプン粒に吸着することで、粒子表面における構造変化も予想される。当該変化により、デンプン粒分解システム他酵素（ β -アミラーゼ）の活性が増加する可能性が考えられるので解析する。

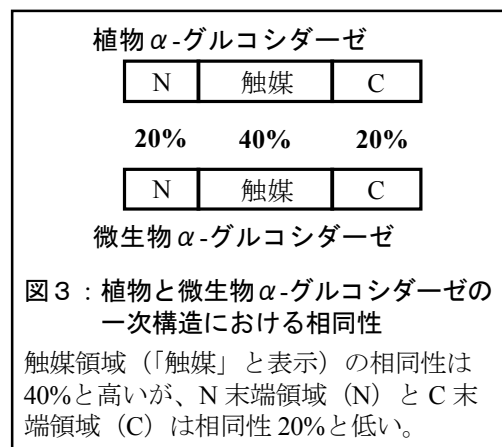


図3：植物と微生物 α -グルコシダーゼの一次構造における相同性
触媒領域（「触媒」と表示）の相同性は40%と高いが、N末端領域（N）とC末端領域（C）は相同性20%と低い。

3. 研究の方法

(1) 各種 α -グルコシダーゼの調製：植物（工芸作物や穀類由来の5酵素）および微生物（糸状菌・酵母）由来の α -グルコシダーゼを

各種クロマト操作で単離した。

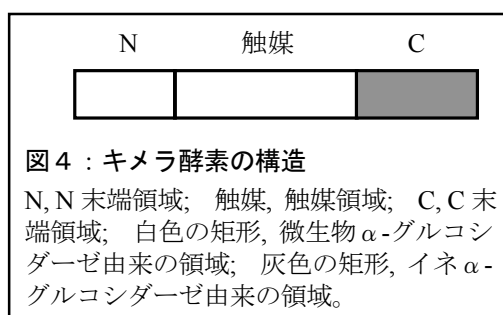
(2) アカルビオシン・マルトオリゴ糖の調製：長鎖長のアカルビオシン・マルトオリゴ糖

(5糖～10糖)の調製は我々の報告に従って行った (Tagami, 2013-b)。アカルビオシン残基は疑似2糖の構造であるので、マルトオリゴ糖部分はそれぞれ3糖～8糖となり、還元末端に位置する。テンサイ α -グルコシダーゼに対する阻害の形式と定数は常法に従い求めた。

(3) デンプン粒への吸着・分解：吸着実験は、 α -グルコシダーゼとデンプン粒を混合して行った。吸着があれば、酵素はデンプン粒とともに沈殿するので、遠心分離処理の上清に残存する α -グルコシダーゼ量が減少する。すなわち、酵素活性の減少から吸着を定量的に評価した。また、分解活性は上清におけるグルコース量の増加から測定した。

(4) 阻害剤複合体の X 線結晶構造解析：テンサイ α -グルコシダーゼの阻害剤複合体構造解析には、(2)項のアカルビオシン・マルトオリゴ糖 (5糖～8糖) と酵素から共結晶を作製し用いた (ハンギングドロップ蒸気拡散法で調製)。大型放射光施設 SPring-8 で X 線回折データを測定し、構造解析を行った。長鎖基質の認識に関与するアミノ酸は点置換法で確認した。

(5) キメラ酵素の作製：イネ α -グルコシダーゼの C 末端領域 (図3) を微生物酵素の C 末端領域に導入・交換したキメラ酵素の発現プラスミッドを設計し、異種宿主系で酵素を生産した。従って、構築したキメラ蛋白質の構造は「N 末端と触媒の両領域が微生物酵素由来で、C 末端領域のみがイネ酵素」となる (図4)。デンプン粒への吸着・分解に関与するアミノ酸残基は、本キメラ酵素に点突然変異を発生させて決定した。各酵素が示す吸着・分解活性を(3)項の手法で評価した。



4. 研究成果

(1) 植物 α -グルコシダーゼが示すデンプン粒吸着・分解能力の一般化：調べた全ての植物 α -グルコシダーゼにおいてデンプン粒への吸着・分解が認められた。しかし、当該現象は微生物酵素では観察されなかった。本結果は、植物 α -グルコシダーゼが吸着・分解能を有し、かつデンプン粒分解における鍵酵素の候補になることを示唆する。

(2) テンサイ α -グルコシダーゼの長鎖基質の認識：長鎖基質に対するテンサイ α -グルコ

シダーゼの認識機構を調べるため、本酵素とアカルビオシン・マルトオリゴ糖の複合体に関する立体構造解析および点突然変異実験を行い、以下の知見を得た (Tagami, 2015)。

① 阻害作用：アカルビオシン・マルトオリゴ糖 (5糖～10糖) はいずれも拮抗阻害の形式で酵素活性を減少させた。その阻害定数は、アカルボース (疑似4糖のアカルビオシン・マルトース; α -グルコシダーゼの強力な阻害剤として医薬品に使用) に比べて 1/10～1/100 低い値であることから、阻害能がより高いことが認められた。その阻害力は鎖長依存的に上昇し、本酵素が示す長鎖基質認識と一致した。速度論的解析から遷移状態を形成する基質アナログであることが判明した。

② 立体構造：アカルビオシン・マルトオリゴ糖の8糖が酵素分子に結合した複合体の構造解析から、サブサイト (酵素の活性中心において、基質分子中にある個々のグルコース残基を認識する部位; アカルビオシン残基はサブサイト-1 と+1 に結合) を形成するアミノ酸が観察できた。特に、本酵素の高分子基質への特異性に重要なサブサイト (触媒部位から遠位にあるサブサイト) に10アミノ酸残基程度の存在を認めた。

③ アミノ酸の機能：これらのアミノ酸の機能を知るために点置換を導入し、長鎖基質に対する特異性を調べた。但し、既に機能を報告した残基 (Tagami, 2013-a) や主鎖で相互作用を生じている残基を除外した。サブサイト+4～+6 に存在が考えられた残基の変異体は、サブサイト+4 への親和力を低下させた。この際に、サブサイト+5 と+6 の残基置換体における予想 (サブサイト+5 と+6 の親和力低下が予想) と異なった結果が得られたが、本現象を立体構造から解明できた。

④ 長鎖基質の認識機構：活性部位から遠位に存在するアミノ酸は、アミロースが形成するラセン構造に適応するように配置されていた。すなわち、本結合様式が長鎖基質との親和力を高め、これが酵素基質遷移状態の安定化を引き起こす要因と想定された。

(3) イネ α -グルコシダーゼの吸着部位の決定：

① キメラ酵素：図4に示したイネと微生物の両 α -グルコシダーゼから構築されたキメラ酵素は、デンプン粒に吸着し、かつ分解活性を示した。本結果は、イネ α -グルコシダーゼの C 末端領域に吸着・分解に関与する構造因子があることを示唆する。さらに、微生物酵素に対しデンプン粒吸着・分解能力の付与に成功したことも意味する。一方、キメラ酵素が示した吸着能はイネ α -グルコシダーゼのそれに匹敵しなかった。この差はイネ酵素の N 末端領域に存在する構造因子 (Nakai, 2007-a) に由来すると考えられた。

②構造因子： キメラ酵素を用いて、C末端領域に存在し吸着・分解に関与する構造因子を点突然変異法で解析した。当該領域には芳香族アミノ酸が存在した。本アミノ酸は、糖残基とスタッキング相互作用を形成することが知られており、点変異導入を行った。吸着・分解の消失が認められ、構造因子の候補と考えられた。

(4)相乗効果： 植物のβ-アミラーゼとα-グルコシダーゼによるデンプン粒分解の相乗効果を調べた。β-アミラーゼ単独では澱粉粒を分解しなかった。α-グルコシダーゼはデンプン粒を分解したが、両酵素を同時に作用させた場合の方が高い活性を示した。すなわち、α-グルコシダーゼによるデンプン粒の表面構造変化がβ-アミラーゼ活性を促し、生成物マルトースを与えたと考えられた（マルトースはα-グルコシダーゼの基質）。本相乗効果は植物組織でも生じている可能性がある。

(5)成果の国内外における位置づけとインパクト： 「研究開始当初の背景」で述べたが、デンプン粒分解の鍵酵素は、これまでα-アミラーゼのみと信じられ（図1）、現在でも一般的な知識として広く理解されている。これに対し、我々が唱えてきた『α-グルコシダーゼも本分解系の鍵酵素』の理論が本研究から初めて支持され、確立に至ったことは大きな成果と考えられる。当該システムは種子のみならず、他の植物組織でも生じている可能性があり、極めて重要な代謝経路と推察できる。また、デンプン粒吸着・分解や長鎖基質認識（デンプン認識も含む）に関わる構造因子も解明でき、前述の理論構築に対し分子的基盤の面からサポートした。本研究で得られた知見は糖質酵素学などの関連分野のみならず植物生理学を含む植物学に大きな影響力があると確信する。

(6)今後の展望： キメラ蛋白質を用いてイネ酵素のC末端領域にある吸着・分解に関わる構造因子を決定したが、イネ酵素自体の組換え体を使用する解析の方が明解であった。しかしながら、当該組換え酵素の発現系が完成しておらず、さらなる取り組みにより解決できると考えている。

(7)研究開始当初に予期していなかった事象： テンサイα-グルコシダーゼで解明した長鎖基質分解に関する構造因子を微生物α-グルコシダーゼに付与することを考えていた。しかし、当該因子を含む構造体が微生物酵素に存在しないことが判明し、因子付与が困難であった。これは逆に、植物α-グルコシダーゼのみが示す分解現象に対し、その触媒部位周辺に存在する構造因子が特徴的であることを強く支持する知見である。植物と微生物に由来するα-グルコシダーゼの分子進化を考える上で重要な事象となった。

<引用文献>

- ①Kimura A, Molecular anatomy of α-glucosidase. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, Vol 12, 373-380, 2000.
- ②Konishi Y, et al., Effect of Bay m 1099, an α-glucosidase inhibitor, on starch metabolism in germinating wheat seeds. Bioscience Biotechnology, and Biochemistry, Vol 58, 135-139, 1994.
- ③Nakai H, et al., Multiple forms of α-glucosidase in rice seeds (*Oryza sativa* L., var Nipponbare). Biochimie, Vol 89, 49-62, 2007-a.
- ④Nakai H, et al., Function-unknown glycoside hydrolase family 31 proteins, mRNAs of which were expressed in rice ripening and germinating stages, are α-glucosidase and α-xylosidase. The Journal of Biochemistry, Vol 142, 491-500, 2007-b.
- ⑤Tagami T, et al., Molecular basis for the recognition of long-chain substrates by plant α-glucosidase. The Journal of Biological Chemistry, Vol 288, 19296-19303, 2013-a.
- ⑥Tagami T, et al., Enzymatic synthesis of acarviosyl-maltoooligosaccharides using disproportionating enzyme 1. Bioscience Biotechnology, and Biochemistry, Vol 77, 312-319, 2013-b.
- ⑦Tagami T, et al., Structure advantage of sugar beet α-glucosidase to stabilize the Michaelis complex with long-chain substrate. The Journal of Biological Chemistry, Vol 290, 1796-1803, 2015.
5. 主な発表論文等
- [雑誌論文] (計3件)
- ①Masayuki Okuyama, Wataru Saburi, Haruhide Mori, Atsuo Kimura: α-Glucosidases and α-1,4-glucan lyases: structures, functions, and physiological actions. Cellular and Molecular Life Sciences, 査読有, 2016, 印刷中. DOI:10.1007/s00018-016-2247-5
- ②田上貴祥, 山下恵太郎, 奥山正幸, 森 春英, 姚 閔, 木村淳夫: 長鎖阻害剤の利用による植物α-グルコシダーゼの機能構造相関の解明. 応用糖質科学, 査読有, 2016, 印刷中.
- ③ Takayoshi Tagami, Keitaro Yamashita, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Min Yao, Atsuo Kimura: Structure advantage of sugar beet α-glucosidase to stabilize the Michaelis complex with long-chain substrate. The Journal of Biological Chemistry, 査読有, Vol. 290, No. 3, 2015, 1796-1803. DOI:10.1074/jbc.M114.606939
- [学会発表] (計3件)
- ①田上貴祥, 山下恵太郎, 奥山正幸, 森春英, 姚閔, 木村淳夫: 長鎖阻害剤の利用による植物α-グルコシダーゼの機能構造相関の解明. 応用糖質科学シンポジウム, 平成 27年 9月 18日, 東大寺総合文化センター (奈良県・奈良市).
- ② Takayoshi Tagami, Keitaro Yamashita,

Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Min Yao, Atsuo Kimura: Structural and biochemical studies of sugar beet α -glucosidase exhibiting high specificity for long-chain substrates. 11th Carbohydrate Bioengineering Meeting, May 10-13, 2015, Otaniemi (Finland).

- ③田上貴祥, 山下恵太郎, 奥山正幸, 森春英, 姚関, 木村淳夫: テンサイ α -グルコシダーゼの高重合度基質特異性はらせん構造の長鎖基質に適したサブサイト構造に起因する. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 平成27年3月28日~3月29日, 岡山大学 (岡山県・岡山市).

[図書] (計1件)

- ① Masayuki Okuyama, Atsuo Kimura: Shoukadoh Book Sellers, Frontiers of Agricultural Science, 2015, 277 (pp. 161-171). ISBN: 978-4-87974-685-6 C3061

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

[その他]

- (1) ホームページ等
<http://www.agr.hokudai.ac.jp/rfoa/abs/abs2-3.html>

(2) アウトリーチ活動情報

- ①奥山正幸、木村淳夫: 平成27年度スーパーサイエンスハイスクール事業 (北海道旭川西高等学校)
②奥山正幸、木村淳夫: 平成27年度環境教育講座 (北海道札幌藻岩高校)
③奥山正幸、木村淳夫: 平成26年度スーパーサイエンスハイスクール事業 (北海道旭川西高等学校)
④奥山正幸、木村淳夫: 平成26年度環境教育講座 (北海道札幌藻岩高校)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 淳夫 (KIMURA, Atsuo)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 90186312

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし