

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15389

研究課題名(和文) 哺乳動物の血液・精液に存在する糖質分解酵素の機能解明

研究課題名(英文) Investigation of carbohydrate-active enzymes in mammal blood and semen

研究代表者

田上 貴祥 (Tagami, Takayoshi)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：70709849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：AGLはデンプンやグリコーゲンを分解してグルコースを生成する酵素であるが、これらの糖が存在しない血液や精液にもAGLが存在することが報告されていた。

本研究では、ブタでは性別・品種・年齢に関わらず血中に大量のAGLが含まれることを明らかにし、本酵素は生体恒常性維持に関わるタンパク質であることが示唆された。本酵素がデンプン分解物に対してのみ分解活性を示したことから、本酵素が血中でAGL活性以外の生理機能を果たしている可能性が示唆された。また、ブタの精漿には酸性pHで高い活性を示すAGLが含まれることを明らかにし、中性pHで高い活性を示す血清AGLとは異なる酵素であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、ブタでは血液と精液に至適pHの異なるAGLが含まれていることが明らかとなった。この性質の違いを利用することで、AGL活性を指標としたブタ生殖器の新たな診断技術の開発が期待される。今後、血液・精液のAGLと生体恒常性の維持機構や生殖との関連をより詳細に研究することで、産業動物のみならずヒトや絶滅危惧動物の健康維持や繁殖技術の向上にもつながることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：It has been known that blood and semen contain an AGL despite does not contain the substrates of AGL. We revealed that the pigs with different varieties, sex, and ages has high AGL activity in their serum. This result indicates that serum AGL may be responsible for a maintenance of homeostasis in pig. The recombinant enzyme of the porcine serum AGL exhibited hydrolytic activity only for maltooligosaccharides, implying that the AGL might play an important role in not its hydrolyzing activity but an unknown function. We also revealed that the AGL in porcine seminal plasma displayed higher activity at pH 4.5 than pH 7.0. This result proposed that the AGL in seminal plasma is different from the serum AGL, which displayed higher activity at pH 7.0 than pH 4.5.

研究分野：酵素学

キーワード：デンプン分解酵素 ブタ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

微生物から哺乳動物に至る全ての生物は、解糖系によってグルコースからエネルギーを生産する。ただし自然界ではグルコースが単糖の状態で存在することは稀であり、重合体の状態であるデンプンやグリコーゲンとして植物組織や動物組織に貯蔵されている。これらはエネルギー生産の際にアミラーゼ類によって大まかな分解を受けた後、 $\alpha$ -グルコシダーゼ (AGL) によってグルコースにまで分解される。よって、AGL はエネルギー生産の最終段階を担う重要な消化酵素であると位置づけられて来た。申請者はこれまで植物種子中の AGL に関する研究を行い、本酵素が発芽時のデンプン分解に有利な基質特異性を備えていることや、本酵素の分子構造および基質認識に重要なアミノ酸残基について明らかにした。また、ヒトに関しては 3 種の AGL (リソソーム型および 2 種の小腸型) が詳細に研究されていた。リソソーム型 AGL は筋組織のグリコーゲン分解に必須の酵素であり、これの遺伝子変異はグリコーゲン蓄積症 (ポンペ病) を引き起こすことが明らかとなっていた。また、2 種の小腸型 AGL は小腸に達したデンプン部分分解物をグルコースに分解する役割を果たしており、血糖値上昇抑制の為に標的酵素として知られていた。これら 3 種の AGL はマウス・ウサギ・ブタ等にも存在することがタンパク質レベルまたはゲノムレベルで明らかになっており、AGL が哺乳動物においてエネルギー生産に重要な消化酵素であることが知られていた。

一方で、ヒト・ラット・ウサギ・ニワトリ・ウマ・ウシ等において、デンプンやグリコーゲンが存在しない血液や精液にも AGL が存在することが報告されていた。ヒトの精漿 AGL については、リソソーム型・小腸型 AGL には分解されない人工基質 (pNPG) を良く分解できることが報告されていた。また、ブタの血清 AGL については、その分子量が一般的な AGL の分子量の 2 倍以上であることが報告されていた。これらの報告は、精漿 AGL や血清 AGL が既報の AGL とは異なるタンパク質分子構造・基質特異性を有することを示唆するものであった。しかしながら研究開始当初までに精漿 AGL および血清 AGL に関する研究は進展しておらず、詳細な酵素学的性質 (生体内における基質や最適反応条件など) はおろか遺伝子も同定されていなかった。

### 2. 研究の目的

これまでの研究背景から申請者は、精漿 AGL および血清 AGL は既報の AGL のような消化酵素ではなく、内分泌物質の活性調節等に働く代謝酵素であるという仮説を立てた。申請者らはこれまでに、ミツバチ由来 AGL が糖分解のみならず糖付加反応も触媒することを *in vitro* 実験で明らかにしている。この例を鑑みると、精漿 AGL・血清 AGL が糖除去と糖付加によってホルモン物質の活性や血糖値を調節している可能性が想定された。本研究では血清 AGL および精漿 AGL の生理機能を解明するために、家畜 (ブタ・ウシ・ウマ・ヒツジ) を主な材料として以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) 血清 AGL および精漿 AGL の酵素学的性質 (最適 pH, 安定条件, 補因子の探索, 基質特異性, グルコース耐性, 天然基質の探索, 分子構造)

(2) 精漿 AGL 遺伝子の同定と生物種間比較

(3) 精漿 AGL 活性および血清 AGL 活性の個体内変動および個体間変動

### 3. 研究の方法

(1) 血清 AGL の酵素学的性質: ブタ血清由来 AGL の遺伝子をクローニングし、全アミノ酸配列を決定した。ブタ血清由来 AGL は 2 つの触媒ユニットを持つことが推定されたため、*Pichia pastoris* を用いて各触媒ユニットの組換え酵素を生産し、両者の酵素学的性質を解析した。比較対照として、真菌由来の AGL について組換え酵素生産および酵素学的性質を解析した。また、ブタの血清から AGL を精製し、その結晶化および X 線結晶構造解析を行った。

(2) 精漿 AGL の酵素学的性質: 市販のクロマトグラフィー担体および独自に調製した AGL 阻害剤をリガンドとするクロマトグラフィー担体を用いて、ブタ精漿からの AGL の精製を試みた。

(3) 精漿 AGL 遺伝子の同定: ブタ精漿 AGL 部分精製酵素のペプチドマスフィンガープリンティングを行い、AGL 活性を示しうるタンパク質を予測した。

(4) 精漿 AGL 活性の個体間変動: 研究協力者からブタの精漿サンプルを提供頂き、これらの AGL 活性およびタンパク質量を測定した。

(5) 血清 AGL 活性の個体内変動および個体間変動: 性別・品種・年齢の異なるブタから血清を採取し、これらの AGL 活性を測定した。

### 4. 研究成果

(1) 血清 AGL の酵素学的性質 および (5) 血清 AGL 活性の個体内変動：ブタ血清由来 AGL の遺伝子はヒトの小腸型 AGL のアミノ酸配列一致性は 83.3% であり，両者はホモログの関係にあることが示唆された。ヒトの小腸型 AGL は 2 つの触媒ユニット (N サブユニットおよび C サブユニット) から成ることが明らかとなっており，本研究でクローニングされたブタ血清 AGL についても 2 つの触媒ユニットに相当する領域が存在した。これらの触媒ユニットの組換え酵素について酵素学的性質を解析した結果，N 末サブユニットの至適 pH は 7.2，pH 安定域は pH 3.2-9.5，温度安定域は 68 以下であり，C 末サブユニットの至適 pH は 7.0，pH 安定域は pH 3.2-10，温度安定域は 50 以下であった。両サブユニットともにデンプン部分分解物であるマルトオリゴ糖に対して高い基質特異性を示し，グリコーゲン・イソマルトース・ショ糖および人工基質である pNP グルコシドに対する活性を示さなかった (図 1)。重合度の異なるマルトオリゴ糖および可溶性デンプンに対する特異性定数を測定した結果 N 末サブユニットは重合度 2~4 の基質に対して同程度の特異性を示したのに対し，C 末サブユニットは重合度 3 以上の基質に対して高い特異性を示した (図 2)。両サブユニットは，正常な血糖値である 1 mg/mL のグルコース存在下において，グルコースによる反応の阻害および糖転移反応によるオリゴ糖の合成を触媒することはなかった。以上の結果から，ブタ血清 AGL が血糖値を調節している可能性は低いことが示唆された。同じく真核生物である真菌由来 AGL では高い糖転移活性によってオリゴ糖を生産できることを明らかにした (雑誌論文 1)。本酵素と比較し，ブタ血清 AGL は糖の分解に特化した酵素であることが明らかとなった。ただし，ブタ血清 AGL は基質となる糖 (マルトオリゴ糖) が存在しない環境に存在しており，本酵素が AGL 活性以外の生理機能を果たしている可能性が示唆された。性別・品種・年齢の異なるブタの血清 AGL 活性を測定した結果，これらの違いに関わらず共通して高い AGL 活性を有することが明らかとなった。この結果から，血清 AGL はブタにおける生体恒常性の維持に関わる重要なタンパク質であると考えられた。

また，ブタ血清 AGL の分子構造を明らかにすることを目的として，本酵素の結晶化および X 線結晶構造解析を行った。本酵素は触媒ユニットが 2 つ連結している点で珍しい酵素であり，触媒の効率化に対する両サブユニットの相互作用の寄与に興味を持たれた。市販のクロマトグラフィーを組み合わせることで血清 AGL を精製し，スクリーニングキットを用いた結晶化条件探索により AGL の結晶を得た (図 3)。これらの結晶の X 線回折データをフォトンファクトリー (つくば) で測定し，これまでに最高分解能 4 オングストロームの回折データを取得できている。ただし，分子置換法による構造決定には至らなかった。

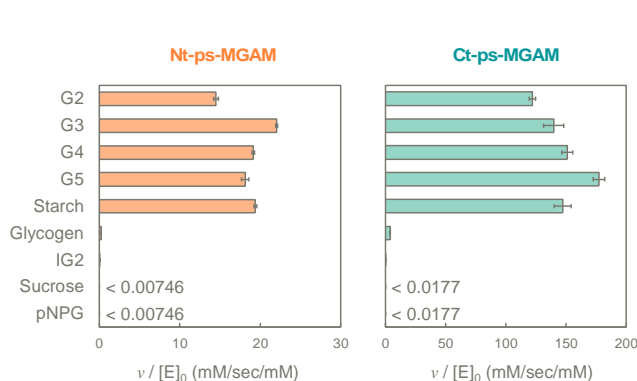


図 1

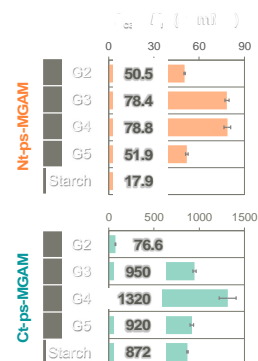


図 2

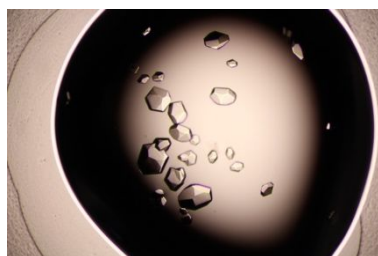


図 3

(2) 精漿 AGL の酵素学的性質，(3) 精漿 AGL 遺伝子の同定および (4) 精漿 AGL 活性の個体内変動：各種クロマトグラフィーを用いてブタ精漿 AGL の精製を試みたが，微量である為に酵素を精製することは困難であった。精漿 AGL の部分精製酵素のペプチドマスフィンガープリンティングを行った結果，血清 AGL 由来のペプチドマスが検出された。その他の既報の AGL は検出されず，精漿 AGL が未知遺伝子の翻訳産物である可能性が示唆された。

ブタ 27 頭の精漿について pH4.5 および pH 7.0 における AGL 活性を測定した結果, 26 サンプルでは pH4.5 において高い活性を示したのに対し, 1 サンプルでは pH 7.0 において高い活性を示した. 本研究によりブタ血液 (血清) には中性に至適 pH を持つ AGL が大量に含まれることが明らかとなっている. 以上の結果から, pH 7.0 で高い活性を示した個体については精液に血液が流入していた可能性がある. ペプチドマスフィンガープリンティング解析において精漿サンプルに血清 AGL 由来のペプチドが検出されたこともこの考えを支持する結果である. これら一連の解析結果から 精漿 AGL の至適 pH を調べることで精液への血液の流入の有無を簡便に調べることができることが示唆され, 種ブタの生殖器の新たな診断技術となることが期待された.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

1. Ma M, Okuyama M, Tagami T, Kikuchi A, Klahan P, and Kimura A. Novel -1,3/ -1,4-glucosidase from *Aspergillus niger* exhibits unique transglucosylation to generate high levels of nigerose and kojibiose. *J. Agric. Food. Chem.*, **67**, 3380-3388 (2019) 査読あり

〔学会発表〕 (計 2 件)

1. 「ブタ血清由来マルターゼ-グルコアミラーゼを形成する酵素ユニットの機能」 渡邊 憲, 田上貴祥, 奥山正幸, 木村淳夫. 日本農芸化学会 2019 年度大会 (2019 年 3 月, 東京)

2. 「ブタ血清由来 -グルコシダーゼの cDNA クローニングと組換え酵素の機能解析」 渡邊 憲, 田上貴祥, 奥山正幸, 木村淳夫. 日本農芸化学会 2018 年度東北・北海道合同支部大会 (2018 年 9 月, 仙台)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://lab.agr.hokudai.ac.jp/molenzlab/>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 奥山みなみ, 渡邊 憲

ローマ字氏名: Minami Okuyama, Ken Watanabe

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。