

平成21年 5月18日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780072

研究課題名（和文）大腸菌グリコーゲンリン酸化酵素の同定と機能解析

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of glycogen phosphorylating enzyme from *Escherichia coli*

研究代表者 磯野 直人 (ISONO NAOTO)

三重大学・大学院生物資源学研究科・助教

研究者番号：70378321

研究成果の概要：グリコーゲンや穀物デンプンのリン酸化に関与する酵素を探索した。大腸菌抽出液から酵素精製を試みた。複数のクロマトグラフィーで分離する段階で、グリコーゲンリン酸化酵素の活性は急激に減少することが認められた。そのため、目的タンパク質の同定には至らなかった。一方、イネのデンプンリン酸化酵素は1457 残基からなる162 kDa のタンパク質であることを明らかにした。これは完全長 cDNA データベースに登録されている構造とは異なっていた。大腸菌で本酵素を発現させたところ、グリコーゲンのリン酸化率が上昇し、酵素活性を有することが確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	300,000	3,300,000

研究分野：糖質科学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：リン酸化, グリコーゲン, デンプン

1. 研究開始当初の背景

(1) アミロペクチンとグリコーゲンの構造
植物のアミロペクチン（デンプンの成分）と原核生物のグリコーゲンはいずれもグルコースのポリマーであり、 α -1,4 結合で連結した鎖が α -1,6 結合により分岐した構造である。また、アミロペクチンとグリコーゲン分子の一部のグルコース残基にはリン酸基が結合していることが知られている。研究代表者はデンプンの機能はアミロペクチンの含

有量および構造と相関が見られることを明らかにしてきた (*Carbohydr. Polym.*, **62**, 25-34, 2005). とくに、アミロペクチン中のリン酸基の存在によりデンプンの物性は大きく変化することを観察した。

アミロペクチンのリン酸化率は植物の種類によって大きく異なり、例えばジャガイモでは高く (1,500ppm)、イネやトウモロコシなどの穀類では低い (20 ppm)。また、リン酸化率によってデンプンの性質 (糊化開始温度、粘性、保水

性など)が異なることが知られており、これらの性質は食品加工や工業において有効に利用されている。同様に原核生物のグリコーゲンもリン酸化されている(200 ppm)。

(2) アミロペクチンとグリコーゲンの生合成

これまでアミロペクチン生合成についての研究は、 α -1,4 グルカン鎖の伸長と α -1,6 結合の生成に関与する酵素を中心に進められてきた。研究代表者も以前、デンプン合成酵素とデンプン枝付け酵素についての研究報告をしている (*J. Appl. Glycosci.*, **51**, 101-107, 2004)。これらの成果により、デンプンの主要骨格の合成メカニズムの大部分は解明されたと思われる。

また、アミロペクチンとグリコーゲンは極めて良く似たプロセスによって合成される。合成関連酵素の反応や構造も類似していることが知られている。

(3) アミロペクチンとグリコーゲンのリン酸化

これらの多糖の主要骨格以外に関する生合成メカニズムが着目されるようになってきた。とくに、アミロペクチンのリン酸化は前述のように、デンプンの機能に大きな影響を与えるため、多くの研究者の興味を集めていた。

Glucan water dikinase (GWD)と呼ばれる酵素がジャガイモデンプンのリン酸化に関与していることが最近、明らかになった (*Nat. Biotechnol.*, **16**, 473-477, 1998)。本酵素を欠損した植物のデンプンは糊化開始温度や粘性がともに低い特徴がある。また、本酵素によってリン酸化されたデンプンは分解されやすいことが報告されており、デンプンの代謝と密接な関係があると思われる。

前述のように、細菌が合成するグリコーゲンや、穀物種子デンプンもわずかにリン酸化されていることが知られている。しかし、この反応に関わる酵素については調べられていない。

2. 研究の目的

大腸菌のグリコーゲンリン酸化を同定し、酵素の機能解析を行うことを目的とした。また、大腸菌グリコーゲンよりもリン酸化率が低いとされている穀物デンプンのリン酸化酵素についても同定と機能解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌の培養とグリコーゲンリン酸化酵素の精製

各種大腸菌を Kornberg 培地中で培養し、グリコーゲンの蓄積能とリン酸化率を調べ、実験材料として適切な菌株を選択した。

超音波破碎して得られた大腸菌抽出液をイオン交換、疎水、ゲル濾過などの各種クロマトグラフィーなどに供し、タンパク質の精製を行った。酵素活性はグリコーゲンと ATP を基質として、多糖に取り込まれたリン酸量から測定した。

(2) イネデンプンリン酸化酵素の同定と大腸菌発現

イネゲノムの塩基配列から、GenemarkHMM により、GWD 様遺伝子のスプライシング部位を予測した。イネ葉から調製した RNA を逆転写し、cDNA を合成した。これを鋳型として、PCR を行い、イネデンプンリン酸化酵素をコードする断片を増幅し、塩基配列を決定した。また、pTrec-99A に cDNA を連結し、発現ベクターを作成した。これを用いて、大腸菌 BW25113 を形質転換した。Kornberg 培地中で大腸菌を培養し、SDS-PAGE でタンパク質の発現を確認した。また、グリコーゲンを精製し、結合リン酸量、ヨウ素複合体スペクトル、 β -アミラーゼ分解限度、単位鎖の鎖長分布などを解析した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌グリコーゲンリン酸化酵素の精製

グリコーゲンリン酸化酵素はグリコーゲン合成時に多く発現すると考え、はじめに各種大腸菌がどのような条件でグリコーゲンを蓄積するか調べた。遺伝子工学で良く用いられている JM109 株や BL21 株はグリコーゲンをほとんど蓄積しなかったため、酵素精製の材料としては不適であると判断した。一方、Kornberg 培地中で培養した BW25113 株は、十分な量のグリコーゲンを蓄積した。BW25113 株から超音波破碎および超遠心法により調製したグリコーゲンを酸加水分解し、グルコース 6 リン酸脱水素酵素を用いて結合リン酸量の測定に供したところ、2.0 nmol/mg とリン酸化されていることが明らかとなった。したがって、本大腸菌はグリコーゲンリン酸化酵素を生産していることが

予測された。

Kornberg 培地で培養した大腸菌 BW25113 株を各種クロマトグラフィーに供し、精製を行った。精製の初期段階では酵素活性を確認できたが、精製度を高めるために複数のカラムクロマトグラフィーに供する過程で活性が急激に減少することが認められた。これは、目的とする酵素が極めて不安定である、あるいは複数のタンパク質の協調作用によって酵素活性が維持されることなどが推定された。しかしながら、目的タンパク質の同定には至らなかった。

(2) イネデンプンリン酸化酵素の同定と大腸菌発現

イネ完全長 cDNA データベース (KOME, <http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>) にはジャガイモ GWD と相同性を示すクローン AK103463 cDNA が登録されている。しかし、本 cDNA がコードするタンパク質はジャガイモ GWD (1464 残基) と比べて N 末端領域を大きく欠損した構造 (1073 残基) であるため、酵素活性を示さない可能性が考えられた。このため、イネのデンプンリン酸化率が低くなる可能性が考えられたので、この仮説の検証を行った。

GenemarkHMM によるイネゲノムのスプライシング部位の予測からデータベースに登録されているクローン (AK103463) よりも長い mRNA が存在する可能性が考えられた。そこで、イネ葉全 RNA を鋳型とした RT-PCR を行なったところ、AK103463 cDNA の 5' 末端よりもさらに上流の領域を含む増幅産物が得られた。新たに得られた領域には開始コドンが含まれ、イネ GWD は 1457 残基からなる 162 kDa のタンパク質であると推測された。このアミノ酸配列はジャガイモ GWD と 66% の相同性を示した。

続いて、組換え大腸菌の SDS-PAGE を行い、イネ GWD が発現していることを確認した。イネ GWD を発現した大腸菌グリコーゲンの結合リン酸量を測定したところ、コントロールに比べて約 3 倍の値を示した。この結果、クローニングした cDNA は活性を有する GWD をコードしていることが明らかとなった。このことから、イネにもリン酸化活性を示す GWD が存在すると考えられた。

組換え大腸菌のグリコーゲンはヨウ素による呈色が薄く、また β -アミラーゼで分解されにく

いことが観察された。このため、イネ GWD を発現した大腸菌が蓄積するグリコーゲンはコントロールに比べて異なる構造であると考えられた。単位鎖長分布を解析したところ、組換え大腸菌のグリコーゲンはコントロールに比べ短鎖の割合が非常に多かった。この原因として GWD によってグリコーゲンに転移されたリン酸基がグリコーゲンの生合成酵素あるいは分解酵素に影響を与えていることが推測された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Noda, T., Isono, N., Krivandin, A. V., Shatalova, O. V., Błaszczak, W. and Yuryev V. P.: Origin of defects in assembled supramolecular structures of sweet potato starches with different amylopectin chain-length distribution. *Carbohydr. Polym.*, **76**, 400-409 (2009) [査読有]

2. Singh, N., Isono, N., Srichuwong, S., Noda, T. and Nishinari, K.: Structural, thermal and viscoelastic properties of potato starches. *Food Hydrocolloids*, **22**, 979-988 (2008) [査読有]

3. Senoura, T., Asao, A., Takashima, Y., Isono, N., Hamada, S., Ito, H. and Matsui, H.: Enzymatic characterization of starch synthase III from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *FEBS J.*, **274**, 4550-4560 (2007) [査読有]

[学会発表] (計 9 件)

1. 平井宏和, 市橋悠哉, 布目知広, 三島隆, 磯野直人, 久松眞: 米類似品種及び白未熟粒のデンプンの構造比較, 第 57 回日本応用糖質科学会中部支部講演会 (2009/1/30, 愛知県名古屋市)

2. 磯野直人: デンプンの特性解析と新しい利用の探求, NP0 バイオものづくり中部 平成 20 年度糖鎖分科会 (2008/10/10, 愛知県名古屋市)

3. 市橋悠哉, 布目知広, 橋本和樹, 三島隆, 磯野直人, 久松眞, 大坪研一: アミロース含量類似の澱粉間における物性差に關与する構造部位の研究, 日本応用糖質科学会 2008 年度大会 (2008/9/18, 沖縄県中頭郡西原町)

4. 三島隆, 内藤整, 江原宏, 豊田由貴夫, 磯野直人, 久松眞: パプアニューギニアのサゴヤシデンプンの特性, 第 17 回サゴヤシ学会講演会 (2008/6/21, 三重県津市)

5. 飯野良介, 三島隆, 江原宏, 磯野直人, 久松眞: 奄美大島のソテツデンプンの特性, 第 17 回サゴヤシ学会講演会 (2008/6/21, 三重県津市)

6. 三島隆, 江原宏, 内藤整, 溝田智俊, 磯野直人, 久松眞: サゴヤシデンプンの種間差, 日本農芸化学会 2008 年度大会 (2008/3/27, 愛知県名古屋市)

7. 磯野直人: デンプンの構造から特性を予測する, 第 5 回糖鎖科学名古屋拠点「若手の力」フォーラム (2007/9/15, 愛知県名古屋市)

8. 布目知広, 加藤拓也, 橋本和樹, Sathaporn Srichuwong, 三島隆, 磯野直人, 久松眞: 澱粉結晶領域の微細構造と物性に関する研究, 日本応用糖質科学会 2007 年度大会 (2007/8/29, 神奈川県藤沢市)

9. 三島隆, 江原宏, 内藤整, 溝田智俊, 磯野直人, 久松眞: 採取地の異なるサゴヤシデンプンの比較, 第 16 回サゴヤシ学会講演会 (2007/6/17, 東京都豊島区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯野 直人 (ISONO NAOTO)

三重大学・大学院生物資源学研究科・助教

研究者番号: 70378321

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者