

氏名(国籍)	きむ 金	うく 昱	どん 東	(韓国)
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	博甲第3090号			
学位授与年月日	平成15年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	農学研究科			
学位論文題目	Biochemical Studies on α -Galactosidase Belonging to the Glycoside Hydrolase Family 27 (グリコシド ヒドロラーゼ ファミリー27に属する α -ガラクトシダーゼの生化学的研究)			
主査	筑波大学教授	工学博士	田中秀夫	
副査	筑波大学教授	農学博士	小澤哲夫	
副査	筑波大学教授	理学博士	山根國男	
副査	筑波大学併任助教授	農学博士	小林秀行 (食品総合研究所)	

論文の内容の要旨

本研究はイネ培養細胞及びヒマワリ種子中の α -ガラクトシダーゼを精製し、酵素化学的性質、特に基質特異性について詳細に検討し、更に酵素遺伝子をクローニングし、発現タンパク質の性質について検討を加えたものである。

α -ガラクトシダーゼは自然界に幅広く分布している糖加水分解酵素の一種である。 α -ガラクトシダーゼの基質特異性に関する研究は、ガラクトマンナンとガラクトマンノオリゴ糖をより効率よく利用するために重要である。また、酵素の性質と立体構造との関わりを解析することは酵素の反応機構を理解し、酵素の機能向上をはかるために重要である。このような観点からイネ培養細胞とヒマワリ種子から α -ガラクトシダーゼを精製し、その性質を調べた。単子葉植物からの α -ガラクトシダーゼに対する報告は殆どなく、双子葉植物の酵素と比較するため単子葉植物であり、日本人にとって最も重要なイネを選択した。双子葉植物としては、ヒマワリ搾油残渣に大量に含まれている α -ガラクトシダーゼの有効利用を考え、今回の実験材料としてヒマワリ種子を選択した。

イネに関しては細胞培養液を粗酵素液とし、ヒマワリの場合は種子のアセントパウダーから粗酵素を調製した。この二つの酵素はイオン交換カラム、アフィニティーカラム、ゲル濾過により50%以上の回収率で精製された。その分子量はSDS-PAGEやゲル濾過により両酵素とも41,000であり、酵素化学的性質については両酵素ともほぼ同じであった。また、ガラクトースを含むオリゴ糖については、両酵素ともにラフィノース、メリビオース、スタキオースの順で分解した。しかし、これらに対する基質特異性が類似していたにもかかわらず、ガラクトマンナンに対する分解能はヒマワリの α -ガラクトシダーゼの方がイネの α -ガラクトシダーゼより2倍以上高いこと、そして、ヒマワリ α -ガラクトシダーゼで処理したグアガムはキサントガムと混ぜる事で高品質なゲルを形成できる事を明らかにした。これらの結果は、ヒマワリの α -ガラクトシダーゼ処理したグアガムが高価なローカストビーンガムの代替品として利用できることを示している。

α -ガラクトシダーゼの構造と機能の関係を明らかにするために、イネ及びヒマワリ由来 α -ガラクトシダーゼのcDNAクローニングを行い、塩基配列を決定した。推定された一次構造から、イネの成熟型酵素は362個のアミノ酸、ヒマワリの成熟型酵素は363個のアミノ酸残基からなり、いずれも7残基のシステインを含んでいたが、

N-型糖鎖結合部位 (N-X-T/S) を持っていなかった。イネとヒマワリの α -ガラクトシダーゼの相同性は75%であり、両酵素ともコーヒ豆の α -ガラクトシダーゼと高い相同性 (イネ75%, ヒマワリ80%) を示した。一次構造及びフォールディングの類似性により α -ガラクトシダーゼはグリコシドヒドロラーゼファミリー27及び36に分類されるが、これらの二つの酵素はファミリー27に属していた。ファミリー27の酵素とのアライメントの結果から、イネ α -ガラクトシダーゼの Asp130は求核残基として、Asp185はプロトドナーとして作用していることが示唆された。アミノ酸配列をもとにプライマーをデザインし、PCRを行い、得られたDNAを発現ベクターに組み込んで大腸菌により発現させた。アフィニティークラムによる精製を行い、酵素の性質を調べた結果、組換え酵素はpH、温度、金属イオンなどの影響、基質特異性などいずれについても天然の酵素とほぼ同じ性質を示した。

最近、X線結晶解析によりイネ α -ガラクトシダーゼの立体構造を明らかにすることができ、Asp130Asp185が活性部位の両側に存在することが確認されたが、基質特異性を含む酵素の性質と構造の関連についての研究はまだ不十分である。そこで変異体酵素を作ることで α -ガラクトシダーゼの構造と機能との関係について検討を加えた。まず、C-末端側から2、6及び10残基のアミノ酸を欠損した変異体を作り活性を調べた結果、6アミノ酸残基10アミノ酸残基を欠損した変異体は活性がないことを明らかにした。 α -ガラクトシダーゼのC-末端側は α -ガラクトシダーゼ間で相同性が低く活性発現に直接的な関与は無いと思われるが、C-末端部分はドメインと多くの水素結合を形成しているため、酵素の立体構造の安定化に重要な機能を持っていると考えられた。

審査の結果の要旨

現在まで殆ど報告がなかった単子葉植物イネの α -ガラクトシダーゼの詳細な基質特異性および構造解明を行い、双子葉植物ヒマワリの α -ガラクトシダーゼの特異性や構造と比較した結果、双子葉植物の酵素はガラクトマンナンに比較的効率よく作用し、単子葉植物の酵素はガラクトオリゴ糖によく作用することを明らかにした。また、ガラクトマンノオリゴ糖については両酵素とも効率的に2種類のガラクトマンノオリゴ糖に作用することを明らかにした。この研究は、 α -ガラクトシダーゼの工業的な利用を目指す為に必要なポリマー、オリゴマーに対する基質特異性について詳細に明らかにした点、そして一次構造上の類似点、相違点を明らかにした点において高く評価できる。

次に、 α -ガラクトシダーゼは相同性に高いN-末端領域と相同性の低いC-末端領域からなり、C-末端からの欠損変異体を構築することによりアミノ酸2残基までは欠損しても影響はないが、6残基以上のアミノ酸がC-末端から欠損すると非常に不安定になることを明らかにし、立体構造からC-末端10残基が水素結合により酵素を安定化していることを示した。これらのことは、この領域の相互作用を更に強固にすることにより安定性の向上の可能性が示唆され、ヒマワリ搾油残渣中に多量に存在する α -ガラクトシダーゼ利用の実用化のための今後の研究の発展が期待される。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。