

氏名(国籍)	李 蘇 紅 (中 国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第4320号
学位授与年月日	平成19年3月23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	生命環境科学研究科
学位論文題目	Enzymes Involved in the Synthesis and Degradation of α-Galactooligosaccharides from Rice (<i>Oryza sativa</i> L. var. Nipponbare) (イネの α -ガラクトオリゴ糖の合成と分解に関与する酵素に関する研究)

主査	筑波大学教授 (連携大学院)	工学博士	中嶋光敏
副査	筑波大学教授	農学博士	土居修一
副査	筑波大学教授	工学博士	向高祐邦
副査	筑波大学助教授 (連携大学院)	農学博士	小林秀行

論文の内容の要旨

本研究は α -ガラクトシダーゼの機能の解明とその利用を目指し、イネ由来の α -ガラクトシダーゼであろうと推定される遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させてその性質を検討したものである。

植物、動物に広く分布しているオリゴ糖、ガラクトマンナン、糖タンパク質などにガラクトースは含まれている。 α -ガラクトシダーゼは主に α -1- \rightarrow 6結合のガラクトースの加水分解と糖転移を触媒する酵素であり、4つの糖加水分解酵素ファミリー(4, 27, 36, 57)に分類されるが、殆どの酵素はファミリー27と36に属している。

一方、イネゲノムの全配列が決定され、配列データベースに7つの推定 α -ガラクトシダーゼが登録されている。そのうちの5つはファミリー27に属し、残りの2つはファミリー36に属する。以前、我々は α -ガラクトシダーゼIを精製し、遺伝子をクローニングし、その精製酵素の性質を明らかにするとともにタンパク質を結晶化し、立体構造を明らかにした。

本研究ではファミリー27に属する2つの推定 α -ガラクトシダーゼIIとIIIを、また、ファミリー36に属する推定 α -ガラクトシダーゼIVと推定ラフィノース合成酵素を選択し、遺伝子をクローニングすると共に大腸菌で発現させ、ガラクトオリゴ糖の合成、分解に関するそれぞれの機能について検討した。

イネからファミリー27に属する2つの推定 α -ガラクトシダーゼの遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させた。これら2つの精製酵素(IIとIII)はSDS-PAGEで単一のタンパク質バンドを示し、酵素分子の大きさは共に42kDaであった。イネ α -ガラクトシダーゼI, II, IIIは分子の大きさにおいては非常に類似しており、酵素化学的性質(至適温度45℃, 指摘pH5)においては全く同様であった。しかし、安定性については、酵素IIIは25℃までとIやII(40℃)よりかなり劣っていた。これらの α -ガラクトシダーゼはガラクトオリゴ糖に対して作用の度合いが異なり、ラフィノース>メリビオース>スタキオースの順に分解した。また、これらの酵素はすべてガラクトマンノオリゴ糖やガラクトマンナンを分解した。これらの酵素のガラクトマンノオリゴ糖に対する特異性を基に考えると酵素IIとIIIも酵素Iと同様のカテゴリーに分類され、酵素IIはこの中で最もガラクトマンナンに対して高い活性を示した。この活性は、今までに報告さ

れている微生物、植物由来の酵素に比べても十分高いものであった。酵素Ⅱを用いてガラクトマンナンを処理した結果、脱ガラクトースによって付加価値の高い（ゲル化能を示す）ガラクトマンナンを作ることに成功した。

ファミリー 36 に属する推定 α -ガラクトシダーゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させた。本精製酵素Ⅳは SDS-PAGE 上で単一であり、81kDa の大きさであった。本酵素は至適 pH が 8.5 であるアルカリ α -ガラクトシダーゼであり、SH 試薬との反応性からシステインが活性に関与していることを示した。本酵素はスタキオース>ラフィノース>メリビオースの順にガラクトオリゴ糖を分解したが、ガラクトマンノオリゴ糖やガラクトマンナンには作用できなかった。ガラクトオリゴ糖のみに特異性を示すという特徴を持つ本酵素は、ガラクトオリゴ糖の中でもスタキオースを良く分解するという特異性を示す特殊な α -ガラクトシダーゼであった。通常の α -ガラクトシダーゼはスタキオースを殆ど分解できないことから、本酵素はスタキオース含量の高い大豆モラセスなどを培地として利用する際に前もって分解し、発酵処理に利用する可能性が考えられる。

イネからラフィノース合成酵素と推定される遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させた。精製酵素は SDS-PAGE で単一のバンドを示し、酵素分子の大きさは 85kDa であった。ラフィノース合成反応の至適温度、pH は 45°C、7.0 であり、SH 基が活性に関与していることが示された。本酵素のアミノ酸配列はアルカリ α -ガラクトシダーゼと相同性を示し、実際、pNP- α -ガラクトシド、ガラクチノール、ラフィノースに対して弱いながらも加水分解活性を示した。本酵素は、ping-pong Bi-Bi メカニズムによって反応を触媒し、ガラクチノールと pNP- α -ガラクトシドをドナーとして認識した。また、ショ糖、乳糖、ガラクトピオース等をアクセプターとして利用した。これらのショ糖以外のアクセプターに対する特異性については初めての報告であり、本酵素を用いた新規なオリゴ糖調製や酵素の構造機能相関の解明に役立てることが出来る。

審査の結果の要旨

本論文はイネデータベースに登録されている複数の推定 α -ガラクトシダーゼ遺伝子を大腸菌で発現させ、その発現タンパク質の性質を明らかにしたものである。クローニングのために、発芽後の苗から RNA を調製し、RT-PCR を行った。発現タンパク質は全て活性を示したが、一部推定アミノ酸配列に間違いが発見された。これはゲノムデータベースがコンピュータープログラムによりエクソンとイントロンを推定しているからであり、実際に発現させ、活性を検討する事の重要性が示された。

スタキオースに高い特異性を示すユニークな酵素は、大豆モラセスを有効利用する際の鍵酵素として役に立つ可能性があり、また、酵素ⅠとⅡは一次構造上よく似た酵素であるが、ガラクトマンナンに対しては高活性を示す酵素と低活性しか示さない酵素であるため、この差はどこにあるのかを検討する良いサンプルとなりうる。更にラフィノース合成酵素の新規なアクセプター特異性を示した事など、応用面を見据えた基礎研究として大いに評価できるものである。

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。