

氏名(本籍)	みずのこういち (愛知県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第1,481号		
学位授与年月日	平成8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 starch branching enzyme in developing rice seeds (イネ登熟種子中の澱粉枝つけ酵素に関する生化学的研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	村上和雄
副査	筑波大学教授	農学博士	日下部功
副査	筑波大学教授	理学博士	藤伊正
副査	筑波大学助教授	農学博士	馬場忠

## 論文の要旨

植物は、発芽の際のエネルギー源として種子や茎などのアミロプラストに澱粉を合成する。したがって、その生合成機構に関する研究はきわめて重要なものであるが、アウトラインは確立されているものの詳細となると不明な点が多い。D-グリコースのポリマーである澱粉は、 $\alpha$ -1,4結合より成る本質的に直鎖状のアミロースと $\alpha$ -1,6結合を介した分枝をもつアミロペクチンより構成されている。本研究では澱粉生合成の分子機構を解明することを最終的な目的として、このアミロペクチン中の分枝形成を触媒する枝つけ酵素について生化学的な検討を加えた。

イネ登熟種子中には、分枝鎖の形成を触媒する枝つけ酵素がみかけ上4種類(RBE1, RBE2, RBE3, およびRBE4)含まれていた。RBE1とRBE2は同一の遺伝子産物であり、RBE1はRBE2のカルボキシル末端から約3キログルトンに相当する部分が削除されたものであった。2種類の枝つけ酵素RBE1(RBE2)とRBE3について、イネ登熟種子cDNAライブラリーより目的のクローンを単離して、それらの全一次構造を明らかにした。いずれもアミロプラストへの移行シグナルとして機能するトランジットペプチドをアミノ末端にもつ前駆体として合成され、成熟型RBE1とRBE3は、それぞれ756, 760アミノ酸残基より構成されていた。RBE1のRBE3に対するアミノ酸配列の相同性は、ほぼ50%であった。RBE1は、RBE3よりもカルボキシル末端に約50アミノ酸残基分だけ長い配列を有していた。反対に、RBE3は、アミノ末端に約70残基の余分な配列を含んでいた。しかし、どちらの酵素もアミラーゼの活性ドメインを構成する4つの領域に対するコンセンサス配列を中央部に保存していた。転移酵素に属する枝つけ酵素がアミラーゼファミリーの一員であり、ひとつの酵素分子が伸長途中の、あるいは伸長したアミロース中の $\alpha$ -1,4結合の切断と生成したアミロース鎖の転移を行っていると考えられる。

RBE1とRBE3をコードするcDNA断片を大腸菌で発現させる系を確立させて、おのおのの機能について検討した。精製した組換え型RBE1は、フォスフォリラーゼとの共役反応による枝つけ反応、アミロースとアミロペクチンへの反応とも非常に高い比活性を示したが、RBE3の酵素反応性は相当に低かった。このように、枝つけ酵素アイソザイム間の酵素反応性には著しい差が見いだされたが、アミロースを基質としたときの分枝形成様式には本質的に相違がないと考えられた。

大腸菌での発現系を利用して、RBE1のアミノおよびカルボキシル末端から欠失変異体、分子中のシステイン

残基のセリン置換変異体、さらに RBE 1 と RBE 3 でのキメラ酵素を作製した。RBE 1 をカルボキシル末端から 55 残基まで削除したもののだけが活性を保持していた。RBE 1 と RBE 3 はモノヨード酢酸や PCMB により失活することから、いずれも分子中の SH 基が活性に必須であった。RBE 1 はその分子中に 9 個のシステインを含んでいるが、そのうちアミノ末端から 3, 6, 7 番目のシステインが活性に重要な役割をはたしていることが明確となった。また、RBE 1 と RBE 3 のキメラ酵素の解析から、それぞれの酵素のアミノおよびカルボキシル末端近傍の配列が酵素反応性に大きく関与していることが明らかとなった。

イネ枝つけ酵素 RBE 1 と RBE 3 遺伝子の各種組織での発現について調べてみると、いずれも登熟種子で強く発現していた。しかし、RBE 3 が種子特異的に発現しているのに対比して、RBE 1 は弱いながらも葉や茎などで発現していた。種子の成熟過程では、RBE 1 と RBE 3 遺伝子が開花後 7 ~ 15 日で発現が強く、この発現パターンはイネ種子中の澱粉合成が盛んな時期とほぼ一致していた。しかし、RBE 3 遺伝子は RBE 1 遺伝子よりも若干開花後早期の段階から発現が認められ、これらの枝つけ酵素の澱粉合成での役割分担があるものと考えられた。また、異常な胚乳澱粉を生成するイネ変異株登熟種子での枝つけ酵素遺伝子の発現を調べたところ、アミロースエクステンダー変異株の登熟種子では RBE 3 遺伝子がまったく発現していないことが判明した。ほかの澱粉合成関連酵素遺伝子の発現には異常が認められないことから、RBE 3 の欠損がアミロースエクステンダー変異株の特徴的な澱粉分枝成分の合成の原因であると結論した。

## 審 査 の 要 旨

澱粉をはじめとする植物多糖類の合成に関する研究は非常に遅れており、特に分子レベルでの研究は最近になりやっと着手されはじめたところである。このような状況のもとで、澱粉中のアミロペクチン合成で重要な役割を果たしている枝つけ酵素の 2 種類のアイソザイムについて、これらの全一次構造を初めて明らかにし、大腸菌での発現系を確立させることによって構造と機能について詳細な検討を行っている。また、イネアミロースエクステンダー変異株の解析の結果、アミロースエクステンダー遺伝子産物が枝つけ酵素アイソザイムのひとつであり、その酵素欠損によって胚乳澱粉中の分枝成分が異常な構造を持つようになることも明確にしている。われわれにとってイネ、トウモロコシなどの穀物は主要なカロリー供給源であり、とりわけ、穀物中の澱粉は食物・食品の食味、調理・加工特性、さらに保存性などに大きな影響を与える。今後、澱粉合成関連酵素遺伝子を操作することにより、主要穀物中の澱粉の微細構造やアミロース含量を人為的にコントロールしたり、有用タンパク質を澱粉とともに種子に蓄積させたりするような新しい品種の開発などが可能となることが予想されている。したがって、本研究がそのような応用研究の基礎を少なからず築いたことは、当該研究分野の研究の発展に大きく貢献するものと思われる。

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。