

アズキ糖質加水分解酵素の構造と機能に関する研究

応用分子生物学講座 分子酵素学分野

田中 良幸

本研究では、アズキ発芽子葉の抽出液に見出される 2 つの糖質加水分解酵素 α -amylase および D-酵素 (DPE1) の構造機能相関に関する研究を行った。

1. アズキ α -amylase Met398 の過酸化水素による特異的酸化

(背景と目的) アズキ発芽子葉からは2つの α -amylase アイソフォーム (VAA1 および VAA2) が精製される。VAA1 は Met398 が特異的に酸化されており、酸化修飾のない VAA2 に比べデンプン粒および β -cyclodextrin (β -CD) への結合能が低い。この Met398 はアミノ酸配列上、立体構造既知のオオムギ α -amylase (AMY1) のデンプン粒結合部位 Tyr380 に相当する。本項では、Met398 の特異的酸化をもたらす構造因子の解明を目的とした。

(方法と結果) 酵母で生産した組換え VAA を用い、0-200 mM の過酸化水素処理を行った。その結果、組換え VAA は濃度依存的に β -CD 低結合能型に変換され、200 mM の条件ではほぼ全て低結合能型となった。また ESI-MS および MALDI-TOF MS による解析の結果、Met398 のみが唯一酸化されたことが明らかとなった。AMY1 の立体構造情報から、Met398 は Tyr380^{AMY1} と同様に溶媒に良く露出していると推測される。すなわち Met398 はタンパク質構造上、修飾作用を受けやすい特殊な環境に位置すると考えられ、そのため同残基は非特異的酸化剤により特異的に酸化修飾されると推察された。

2. アズキ D-酵素 (VaDPE1) の酵素化学的性質および一次構造の解析

(背景と目的) DPE1 はマルトオリゴ糖 (MO) を基質とし、糖転移反応を触媒する酵素である。3 糖以上の MO から受容体へ 2 糖転移反応を触媒するが、4 糖を供与体とする場合のみ 3 糖転移反応を触媒する。DPE1 は緑葉細胞において葉緑体に局在し、同化デンプンの分解に関与する。本項では、DPE1 をアズキ発芽子葉から新たに見出し、その反応特異性に重要な構造因子の探索を目的とした。

(方法と結果) アズキ発芽子葉から VaDPE1 の精製を行い、MO (2-5 糖) からの生成物を解析した。その結果本酵素は 2 糖には作用せず、3 糖以上の MO を基質とした場合、生成物として 2 糖転移産物のみ確認された。ただし 4 糖の場合 3 糖転移産物のみ確認された。本酵素は MO に対し、既報の DPE1 と同様の作用を示すことが明らかになった。続いて本酵素 cDNA のクローニングを行った。cDNA から推定されるアミノ酸配列は 562 残基からなり、VaDPE1 トリプシン消化断片の MALDI-TOF 解析の結果とよく一致した。N 末端から 31 残基がトランジットペプチドであると予想された。また立体構造既知の *Thermus* 由来 amyломaltase と 42% のアミノ酸配列一致性を示した。*Thermus* 由来 amyломaltase は VaDPE1 と同様に MO を基質として糖転移反応を触媒する酵素であるが、4 糖を供与体としても 3 糖転移反応を触媒しない。VaDPE1 は活性部位を構成するアミノ酸残基が *Thermus* 由来 amyломaltase とわずかに異なり、これが両酵素の機能の違いを導く構造因子であると推測された。