

イネ胚乳 ADP-グルコースピロホスホリラーゼ組換え酵素の機能解析と

アロステリック効果の改変

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生物化学 石塚 佐都子

1. 背景と目的

ADP-グルコースピロホスホリラーゼ (AGPase; EC 2.7.7.27) は α -グルコース 1-リン酸 (Glc1P) と ATP を基質とし、デンプン合成における唯一のグルコース供与体 ADP-グルコースを生成する。植物 AGPase は ApL と ApS の 2 種のサブユニット 2 つずつから成るヘテロ四量体であり、3-ホスホグリセリン酸 (3PGA) で活性化され、無機リン酸 (Pi) で阻害されるアロステリック酵素である。植物 AGPase は通常プラスチドに局在しているが、穀物胚乳 AGPase はサイトゾルにも局在している。サイトゾル型 AGPase はアロステリック因子に対する感受性が植物種によって様々である。本研究ではサイトゾルに局在するイネ胚乳 AGPase の諸性質を明らかにすること、また貯蔵デンプン合成量の向上を企図し、Pi への耐性を向上させた変異酵素を創出することを目的とした。

2. 方法・結果及び考察

イネ胚乳 AGPase (ApL2₂-ApS2b₂) を大腸菌 (AGPase 欠損株) で発現させた。なおここで、コドンの最適化により高い生産量を得た。2 段階のカラムクロマトグラフィーにより酵素を精製し、生化学的諸性質を解析した。本酵素は、①ATP への K_m が高い ②3PGA の添加により ATP への K_m が著しく低下する ③3PGA は Glc1P に対する K_m に影響しないという 3 点で特徴的だった。3PGA と Pi の影響を調べると、 $(V_{max}-v_0)/2$ (V_{max} は最大速度、 v_0 は 3PGA 非存在下での速度) を与える 3PGA 濃度 $A_{0.5}$ は 2.7 mM、Pi 非存在下での速度の 1/2 を与える Pi 濃度 $I_{0.5}$ は 0.092 mM だった。他の植物 AGPase と比較すると $A_{0.5}$ は高く、 $I_{0.5}$ は低いことから、本酵素の活性は 3PGA による活性化よりも Pi による阻害によって強く制御されていると考えられた。

続いて、3PGA および Pi によるアロステリック効果改変酵素を作出した。バレイショ塊茎 AGPase では 3PGA に対する親和性が向上し、Pi 耐性が高まる ApL 変異酵素 Up1, Up2 および 2 つを組み合わせた二重変異体 Up3 が報告されている。これらに相当するイネ ApL2 変異酵素 T95K, G158N および T95K/G158N の 3PGA に対する $A_{0.5}$ はそれぞれ 1.9, 1.7, 2.6 mM であった。野生型酵素の 7 割程度であり、バレイショ酵素と比較すると $A_{0.5}$ の低下は緩やかだった。T95K および T95K/G158N の Pi への $I_{0.5}$ はそれぞれ 0.19 および 0.34 mM と 2.1~3.7 倍であったのに対し、G158N の $I_{0.5}$ は 1.8 mM と、野生型酵素の 20 倍の値を示した。G158 は隣接する ApS と接触するループ構造に位置している。本ループ構造のアミノ酸配列は、プラスチド型 AGPase とサイトゾル型 AGPase とで大きく配列が異なっている。このことから、本ループ構造は AGPase とアロステリック因子との親和性を決定づける可能性がある。

3. まとめと展望

本研究により、ApL2 と ApS2b からなる組換えイネ胚乳 AGPase は Pi により強く活性調節を受けることが明らかになり、Pi 耐性の付与がデンプン合成量の増加に有効と考えられた。ApL2 の G158N 変異は Pi 耐性を大きく向上させた。当該変異酵素遺伝子を導入した組換えイネの種子では、デンプン生産量の向上が期待される。