

氏 名 (本籍) まつ もと あき よ
 松 本 明 世

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 博 第 3 2 3 号

学位授与年月日 昭和 59 年 6 月 14 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院農学研究科
 (博士課程)農芸化学専攻

学 位 論 文 題 目 Neurospora crassa におけるグリコー
 ゲンの生合成機構
 —グリコーゲンの生合成における分枝形
 成酵素の役割—

論 文 審 査 委 員 (主 査)

教授 松 田 和 雄 教授 高 橋 甫

教授 水 野 重 樹

緒論

グリコーゲンおよび澱粉は、動物、カビ、酵母、細菌、あるいは植物、藻類などの細胞中に存在する貯蔵多糖であり、グリコーゲンおよび澱粉中のアミロペクチンは、 α -1,4結合したグルコース鎖が α -1,6結合で多数枝分かれしたグルカンである。

これらグルカンの α -1,6分岐結合は、UDP-グルコースあるいはADP-グルコースからグリコーゲン合成酵素(EC 2.4.1.11)あるいは澱粉合成酵素(EC 2.4.1.21)により合成された α -1,4-グルカン鎖に分枝形成酵素(EC 2.4.1.18, branching enzyme)が作用し生成されると考えられている。

この分枝形成酵素は、1943年 Cori 夫妻¹⁾によって、動物組織抽出液中にその存在が初めて報告された。さらに、1945年 Bourne と Peat²⁾は、馬鈴薯から分離、部分精製した分枝形成酵素を用いた研究により、分枝形成酵素がアミロペクチンの α -1,6分岐結合を生成する酵素であることを示した。以後、動物、酵母、細菌、および植物などの分枝形成酵素が分離、精製され、これらの性質、作用機構について数多くの研究が行なわれてきた。しかし、糸状菌については、*Neurospora crassa* から分離、部分精製した酵素を用いて行なわれた Abramsky と Tatum (1976)³⁾の報告があるだけで、その性質や作用機構はほとんど明らかになっていない。

一方、当研究室の高原と松田は、1970年代前半まで、糸状菌におけるグリコーゲンの代謝に関する研究がほとんど行なわれていなかったため、糸状菌のグリコーゲンの生合成機構を明らかにすることを目的として、*N. crassa* を材料として、菌のグリコーゲンの構造、グリコーゲンの生合成の初発反応

に關与すると思われる糖蛋白質中間体の性質、さらにグリコーゲン合成酵素の精製法、性質および反応機構について研究を行なってきた。

本研究では、グリコーゲンの生合成機構を解明する上で、一つの重要な位置を占める、分枝生成機構およびグリコーゲンの生合成における分枝形成酵素の働きを明らかにすることを目的とした。

第1章 分枝形成酵素の精製と性質

菌株は、*Neurospora crassa* wild type (IFO 6068) を用い、2% グルコースを炭素源とした合成培地、28°C で振とう培養を行なった。

分枝形成酵素は、酵素活性が最大となる2日間の培養で得た菌糸体(110g)から、1mM フェニルメチルсульフォニルフルオリドを含む50mM ケリシルグリシン緩衝液(pH8.0)とともに磨碎し、遠心分離により、その上清として得た。これを粗酵素液として、以下 DEAE-Sephacel カラム、続いて 6-aminohexyl-Sepharose カラムによるクロマトグラフィーを行ない、最後に Toyopearl HW-55S によるゲル濾過を行なうことにより精製酵素標品を得た。以上の精製過程を Table

Table 1. Purification of the branching enzyme from *N. crassa* mycelia.

Purification step	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification (-fold)	Yield (%)
1. 20,000×g supernatant	2950	3.10	1	100
2. DEAE-Sephacel	558	11.4	3.68	62.9
3. 6-Aminohexyl-Sepharose 4 B	12.4	229	73.9	28.0
4. Toyopearl HW-55 S	2.18	702	226	15.1

1. に示す。DEAE-

Sephacel によるクロマト

グラフィーでは 20,000×g

上清粗酵素液中に含まれるアミラーゼ活性を分枝形成酵素から分離することからなされた。6-aminohexyl-Sepharose による疎水アフィニティークロマトグラフィーにより、夾雑蛋白質を効率よく分離することができ、このステップで酵素は約20倍精製され、最終的に精製酵素標品は、粗酵素から約230倍に精製された。

精製酵素標品の純度も、pH 4.4、5%ゲルを用いたDISC-電気泳動およびSDS-電気泳動により検討した結果、Coomassie blueによる蛋白染色で、ともに単一バンドを示し蛋白質的に均一であることを確認した。また、DISC-電気泳動において、PAS染色により蛋白染色バンドと同位置に糖の染色バンドが認められ、精製酵素中に糖の含有が示唆された。一方、精製酵素中には、グリコーゲン合成酵素活性、アミラーゼ活性および枝切り酵素活性は認められなかった。以後の実験にはこの精製酵素を用いた。

精製酵素の一般的性質をTable 2.に示す。

本酵素の作用至適pHは8前後、至適温度

は27°Cであり、これらの値は、*E. coli* (pH 7.5-

8, 32°C)や *A. globiformis* (pH 7.5-8, 23-25°C)

および *B. megaterium* (pH 7.6, 25°C) など細菌の分枝形成酵素と類似したものであった。

また、*N. crassa*のグリコーゲン合成酵素の至適pH、至適温度はそれぞれ、pH 8.2-9, 30°Cであり、分枝形成酵素の値とよく一致している。

この結果は、生体内でこれら2酵素が協同反応をする上で有利なことであると考えられる。ラット肝、*E. coli*あるいはmaizeなどの分枝形成酵素では多型の存在が報告されているが、*N. crassa*の酵素には、多型の存在は認められなかった。

本酵素のアミノ酸組成を酸加水分解により検討した結果、*E. coli* Bの酵素で報告されている組成とほぼ同様の組成であった。また、精製酵素中の糖含量をグルコースを標準としてフェーラー-硫酸法で測定した結果、酵素蛋白質1mg当り30μgの糖を含有することが示された。しかし、この糖組成、構造については決定できていない。

Table 2. General properties of *N. crassa* branching enzyme.

Molecular weight	80,000 ^{a)}
Isoelectric point	5.6
pH optimum	around 8
pH stability	7.3-8.1
Temp. optimum	27°C
Temp. stability	below 35°C

^{a)} Obtained by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

第2章 各種基質に対する作用

分枝形成酵素の作用機構、基質特異性を調べるために、アミロペクチン化、各種基質に対する作用を検討した。酵素処理は、各基質1mg当り3単位の精製酵素を加え、50mMグリニルグリニン緩衝液(pH8.0)、25℃で24時間反応後、100℃5分間の加熱で酵素活性を失活し、生成物について分析した。

Table 3. に各種基質に対する作用を示した。
本酵素は、アミロペクチン、DP 130, 22

Table 3. The action of *N. crassa* branching enzyme on various α -D-glucan.

Substrate	λ_{max} of iodine stain (nm)		β -Amylolysis limit (%)	
	before treatment	after treatment	before treatment	after treatment
Amylopectin	505	480	62	50
DP 130 amylose	600	570	77	48
DP 22 amylose	493	470	100	84
DP 15 amylose	437	435	100	86
Amylopectin β -limit dextrin	530	505	0	6.8
<i>N. crassa</i> glycogen	470	465	45	43

および15のアミロースに対し、ヨウ素呈色の極大吸収波長(λ_{max})を短波長側へシフトさせ、 β -アミラーゼ分解限度を減少させることから、これら基質に対し作用し分枝を生成することが示された。また、アミロペクチン β -リミットデキストリンに対し、ヨウ素呈色の λ_{max} を短波長側へシフトさせ、 β -アミラーゼ分解限度を上昇させることから、本酵素は外部鎖だけでなく内部鎖にも作用して、マルトースあるいはマルトトリオース単位の分枝をもった鎖も転移することが示された。しかし、*N. crassa* のグリコーゲンにはほとんど作用しなかった。本酵素がDP 22および15のような短鎖長アミロースに対し、作用できることは、植物起源の分枝形成酵素の作用しうる最小の重合度が30~40以上であるのに対し、グリコーゲンの分枝形成酵素のみが示す基質特異性であると考えられる。

Toyopearl HW-40F カラム(1.75x80cm)を用いたゲル濾過により、各基質からの生成物の溶出パターンおよび生成物をイソアミラーゼ処理することによって得られる単位鎖の溶出パターンを検討した。Fig. 1に示すように、アミロペクチンからの生成

物は V_0 に溶出され低重合度のものが生成されていないことから、精製酵素中にはアミラーゼなど加水分解活性は含まれないことが確認される。生成物の単位鎖の分布は、未処理のものに比べ低重合度側へのシフトが見られ、とくに DP6~7 付近に溶出された新たに生成された分枝に由来すると考えられる単位鎖が多いことが注目される。DP130 のアミロースからの生成物の単位鎖の分布は、アミロペクチンからの生成物のものとは大きく異なったが、同様に DP6 付近の単位鎖の割合が多く存在した。Fig. 2. に示すように、DP15 のアミロースからの生成物の溶出パターンは、未処理のものに比べ高重合度側、低重合度側への不均一化が認められた。生成物の単位鎖の分布では、生成物の溶出パターンでみられた高重合度側のものが消失し、DP6~7 にピークが認められた。この結果から、生成物の溶出パターンで、高重合度側に溶出されたものは、分枝形成酵素の分子間転移により生成され、低重合度側のものは分子間転移で生ずる供与鎖の還元末端側の断片であると考えられることから、本酵素が分子間転移をすることが示された。DP22 のアミロースからの生成物も同様の結果を示した。一方、アミロペクチンおよび DP15 のアミロースからの生成物をイソアミラーゼ処理後、ペーパークロマトグラフ

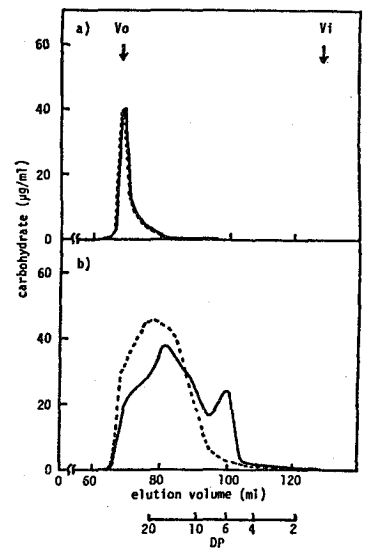


Fig. 1. Elution patterns of the product (a) and the debranched product (b) formed by the action of the branching enzyme on amylopectin on Toyopearl HW-40F. —, Product; ·····, control.

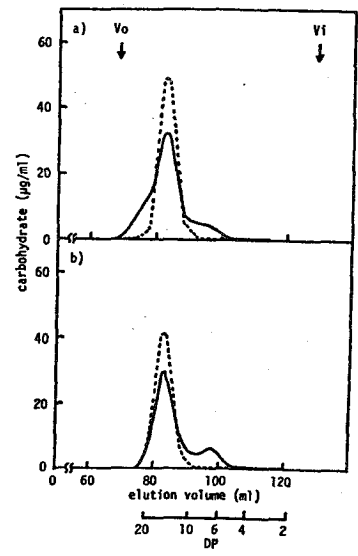


Fig. 2. Elution patterns of the product (a) and the debranched product (b) formed by the action of the branching enzyme on DP 15 amylose on Toyopearl HW-40F. —, Product; ·····, control.

により検討した結果、本酵素により生成される単位鎖の最小は、6糖であることを確認した。

以上の結果から、*N. crassa*の分枝形成酵素は、その生成物の単位鎖に5糖以下の鎖を含まないので、12残基以上のグルコース鎖に作用して、6糖を最小の単位鎖として転移反応を行なうと考えられる。

第3章 分枝形成酵素とグリコーゲン合成酵素の協同作用

アミノペフテンなど各種基質に対する作用の検討では、酵素の基質特異性や他の性質を知ることはできるが、生体内での作用に関する情報は充分に得られなため、分枝形成酵素とグリコーゲン合成酵素の協同反応について検討した。

グリコーゲン合成酵素は、*N. crassa*の菌糸体から調製した蛋白質的、活性的に均一な標品を用いた。協同反応は UDP- ^{14}C -グルコースを基質として、プライマー添加系、および無添加系における糖の生成を測定することによって検討した。

協同反応の経時変化を Fig. 3 に示す。グリコーゲン 500 μg を反応系に加えたプライマー添加系では対照としたグリコーゲン合成酵素のみの反応に比べ、協同反応でグルコース転移速度の増加がみられた。一方、プライマー無添加系では、グリコーゲン合成酵素のみの反応では糖の生成が認められないのに対し、協同反応では遅延のち糖の生成が認められた。このプライマー無添加系における糖の生成には分枝形成酵素の作用が大きく関

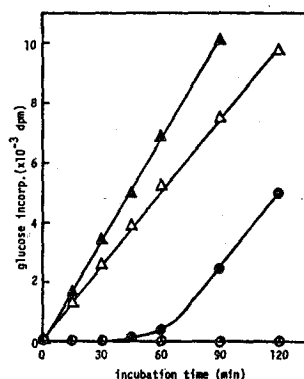


Fig. 3. Formation of ^{14}C -glucan catalyzed by the combined action of *N. crassa* branching enzyme and glycogen synthase from UDP- ^{14}C -glucose.

▲, Combined action in the presence of added primer (500 $\mu\text{g}/55 \mu\text{l}$); △, action with glycogen synthase alone in the presence of added primer (500 $\mu\text{g}/55 \mu\text{l}$); ●, combined action in the absence of added primer; ○, action with glycogen synthase alone in the absence of added primer.

与するものと考えられる。協同反応における分枝形成酵素によるグルコース転移速度の増加に対するプライマー濃度の影響を調べた結果、分枝形成酵素はプライマー濃度が低いときほどグルコースの転移速度により大きな増加を与えることが示された。以上の結果から、生体内でのグリコーゲンの生合成における分枝形成酵素の役割は、分枝の生成とともに、細胞内のグリコーゲン濃度が低い合成の初期段階でのグリコーゲン合成速度の増加にあると考えられる。

プライマー添加系および無添加系の協同反応の生成物をβ-アミラーゼ、イソアミラーゼで処理した後、それら分解物についてペーパークロマトグラフィーで検討した結果、プライマー添加、無添加、両系からの生成物のβ-アミラーゼ分解物にβ-リミットデキストリンの存在が示され、協同反応において分枝形成酵素がグリコーゲン合成酵素により伸長されたα-1,4-グルカン鎖に作用し、α-1,6分枝結合を生成することが確認された。

プライマー無添加系、協同反応による生成物は、Sephacrose CL-2Bカラムによるゲル濾過で V_0 に溶出され、その分子量は24万以上であることが示された。また、イソアミラーゼ処理で得た生成物の単位鎖の分布は、Fig. 4に示すように、DP 22付近にピークをもち分布を示し、*N. crassa*のグリコーゲンの単位鎖の分布とは異なるが、この生成物は分子量24万以上のグリコーゲン型多糖であることを確認した。また、プライマー添加系、協同反応による生成物の単位鎖も、プライマー無添加系の生成物の単位鎖と同様の分布を示し、その単位鎖にはDP 5以下のものは認められなかった。

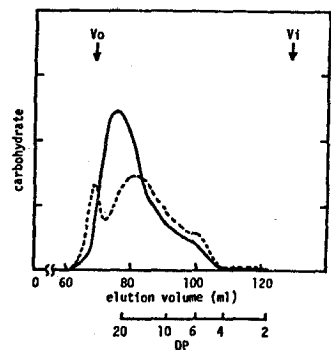


Fig. 4. Elution patterns of the debranched products formed by the combined action in the absence of added primer and debranched *N. crassa* glycogen on Toyopearl HW-40F. —, Synthetic product; ----, *N. crassa* glycogen.

Table 4. Activities of *N. crassa* glycogen synthase for various acceptors.

Acceptor	Conc.	Activity(%)
<i>N. crassa</i> glycogen	10 mg/ml	100
Glucose	25 mM	0
Maltose	25 mM	0
Maltotriose	25 mM	1.9
Maltotetraose	25 mM	15.4
Maltopentaose	25 mM	—
Maltohexaose	25 mM	18.4
Maltoheptaose	25 mM	20.3
<i>N. crassa</i> glycogen	5 mg/ml	100
Phosphorylase limit dextrin	5 mg/ml	56.2
β -Amylase limit dextrin	5 mg/ml	0

Table 4. に示すように、*N. crassa* のグリコーゲン合成酵素は、外部鎖長が2~3の β -リミットデキストリンをプライマーとして利用できないのに対し、外部鎖長が4のフォスフォリラーゼリミットデキストリンをプライマーとすることから、協同反応において分枝形成酵素がグリコーゲン合成酵素によるグルコース転移

反応の速度を増加させるためには、分枝は受容鎖の非還元末端から5残基以上還元末端側のグルコースに転移されなければならないと考えられる。

第4章 分枝形成酵素と基質の相互作用の検討

現在まで分枝形成酵素の活性測定に用いられてきた方法では、酵素とアミロペクテンやグリコーゲンなどの基質との相互作用を検討することができなかった。本研究では1972年竹尾らによって開発されたアフィニティー電気泳動法を分枝形成酵素の基質との解離定数(K_m)の解析に導入した。

アフィニティー電気泳動により、分枝形成酵素のアミロペクテンおよびカキグリコーゲンに対する K_m 値を測定した結果、アミロペクテン($K_m=1.15\text{mg/ml}$)、カキグリコーゲン($K_m=27.3\text{mg/ml}$)となり、値に大きな違いが認められた。この違いは、アミロペクテンとグリコーゲンの構造、特に外部鎖長の違いによるものと考え、酵素の解離定数と基質の構造との関係を調べるために、カキグリコーゲンを原料として、馬鈴薯から精製したフォスフォリラーゼとグルコース-1リン酸とを用いて外部鎖長の異なる基質を調製し、これら基質に対する分枝形成酵素の K_m 値をアフィニティー電気泳動により求め、Table 5. に示す

Table 5.
Km VALUES OF BRANCHING ENZYME FOR VARIOUS
SUBSTRATES

Substrate	$\bar{C}L^a$	ECL ^b	Km (mM) ^c
Oyster glycogen	12.2	6.3	13.8
Glycogen (ECL 4.5)	10.0	4.5	49.4
Glycogen (ECL 9.0)	14.9	9.0	1.62
Glycogen (ECL 11.6)	17.5	11.6	0.590
Glycogen (ECL 15.1)	21.0	15.1	0.601
Amylopectin	20	12.8	0.355

a, average chain length; b, exterior chain length; c, concentration equivalent to non-reducing end;

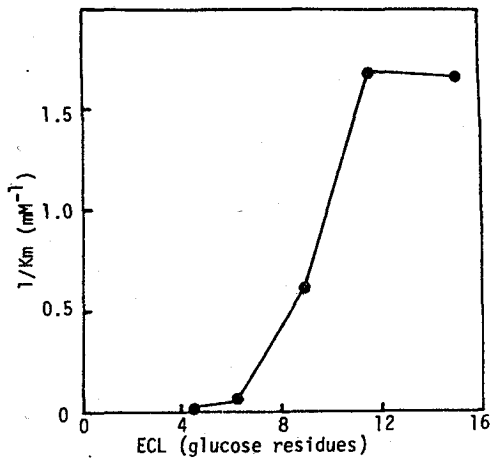


Fig. 5. Effect of exterior chain length (ECL) for affinity (1/Km) of branching enzyme.

結果を得た。この結果より、外部鎖

長の異なる基質に対する分枝形成酵

素の親和力(1/Km)を外部鎖長に対しプロットすると、Fig. 5に示すように、

酵素の親和力は外部鎖長の増加とともに対数的に増加し、12付近で一定となることが示された。この結果より、分枝形成酵素は外部鎖長が12残基以上の鎖に対して作用し易いと考えられる。

考察

以上の結果を総合し、*N. crassa*のグリコーゲンの生合成における分枝生成機構を推定する。

- 1) 分枝形成酵素は各種基質に対し、6糖を最小の単位鎖として転移反応を行ない、生成物の単位鎖には5糖以下のものを生成しない。
- 2) 協同反応において、分枝形成酵素は、グリコーゲン合成酵素により伸長された α -1,4-グルカン鎖に作用し分枝を生成する。また、その生成物の単位鎖には5糖以下のものは認められない。
- 3) 協同反応において、分枝形成酵素はグリコーゲン合成酵素によるグルコース転移反応の速度を増加させる。
- 4) *N. crassa*のグリコーゲン合成酵素は外部鎖長が4残基以上ないと

プライマーとして利用できない。

5) 分枝形成酵素は、基質の外部鎖長の増加に伴い親和力を増大し、外部鎖長が12残基以上で一定の親和力をもち、

以上より、N. crassa のグリコーゲンの生合成における分枝生成機構は、Fig. 6に示すように、

グリコーゲン合成酵素によりUDP-グルコースから非還元末端にグルコース残基が α -1,4結合で転移、伸長され、外部鎖長が12残基以上になると、この α -1,4-グルカン鎖に分枝形成酵素が作用し、6糖を最小の単位鎖として、

近接した鎖の非還元末端から5残基以上還元末端側のグルコース残基に α -1,6結合で転移することによって分枝が生成されると考えられる。

参考文献

- 1) G. T. Cori and C. F. Cori (1943) J. Biol. Chem., 151, 57
- 2) E. J. Bourne and S. Peat (1945) J. Chem. Soc., 1945, 882
- 3) T. Abramsky and E. L. Tatum (1976) Biochim. Biophys. Acta, 421, 106

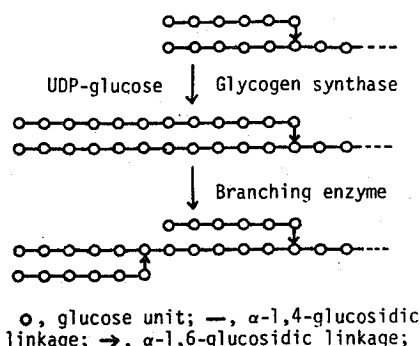
Biosynthesis of Glycogen in Neurospora crassa. Purification and Properties of the Branching Enzyme.

A. Matsumoto, T. Kamata and K. Matsuda (1983) J. Biochem. 94, 451.

Neurospora crassa の Branching Enzyme - グリコーゲンの生合成における役割.

松本明世, 松田和雄. (1983) 澱粉科学, 30, 212

Fig. 6.
PROPOSED MECHANISM FOR THE BRANCHING OF THE OUTER CHAINS OF GLYCOGEN IN NEUROSPORA CRASSA



審査結果の要旨

グリコーゲンあるいはアミロペクチンの α -1, 6分岐結合を生成する分枝形成酵素については、これまで動物、酵母、細菌および高等植物などで研究が行われてきた。しかし、糸状菌の分枝形成酵素については、ほとんど研究が行われていなかった。本研究は糸状菌 *Neurospora crassa* を材料に用いて、本菌の分枝形成酵素の性質を明らかにすると共に、グリコーゲンの生合成における分枝生成機構および分枝形成酵素の役割を明らかにすることを目的として行われた。

著者はまず、*N. crassa* の菌糸体から分枝形成酵素の単離精製を試み、各種のクロマトグラフィーにより本酵素を蛋白質的に均一な標品として得ることに成功し、精製酵素の分子量、化学組成の他、一般的性質を明らかにした。これらの結果から、本酵素は細菌の酵素に類似した性質をもつことが示唆された。また、精製酵素の各種 α -グルカンに対する作用様式を明らかにすることができた。

著者はさらに、同菌から精製したグリコーゲン合成酵素と精製分枝形成酵素との協同反応について検討し、その生成物について調べた。これらの結果から、分枝形成酵素はグリコーゲンの生合成過程において、UDP-グルコースからグリコーゲン合成酵素によって伸長されるグリコーゲンの外部鎖が12グルコース残基以上になった鎖に作用し、6グルコース残基を最小の単位鎖として転移反応することにより、新しい分枝を生成することが明らかとなった。また、分枝形成酵素はグリコーゲンの生合成速度の調節にも関与することが判明した。

最後に著者は、親和電気泳動法の導入により、グリコーゲンの外部鎖長と分枝形成酵素の親和力との関係を調べ、本酵素は、基質であるグリコーゲンの外部鎖長の増加に伴い親和力を増大し、12グルコース残基以上の外部鎖長に対して、最大、一定の親和力を示すことを明らかにし、前述の分枝生成機構に関する結論をより明確にした。

以上、本論文は糸状菌におけるグリコーゲン合成機構に新しい知見を与えるものであり、審査員一同、著者は農学博士の学位を授与されるに十分な資格があるものと判定した。