Osaka University Knowledge Archive

Title	ポリガラクツロン酸合成酵素に関する研究
Author(s)	大橋, 貴生
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47636
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【49】

氏　　名	大　橋　貴　生（おお　はし　たか　お）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２０８５８　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 理学研究科化学専攻
学　位　論　文　名	**ポリガラクツロン酸合成酵素に関する研究**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　長谷　純宏 （副査） 教　授　深瀬　浩一　　教　授　関口　清俊

論　文　内　容　の　要　旨

１．序論

ペクチンは植物細胞壁の主要構成成分であり、複雑な構造を持った酸性多糖である。ペクチンの主骨格はガラクツロン酸がα1,4 結合で直鎖状に連なったポリガラクツロン酸である。ペクチンの生合成には、その構造の複雑さから、50 種類以上の糖転移酵素、糖修飾酵素が関与していると考えられているが、これらの酵素のカラムクロマトグラフィーを用いた分画例はなく、一つも精製されていない。したがって、これらの酵素の性質については不明な点が多い。そこで、本研究ではペクチン生合成の鍵酵素でありペクチン主骨格を合成するポリガラクツロン酸合成酵素に着目し、その性質を明らかにすることを目的とした。

２．ポリガラクツロン酸合成酵素のドナー基質である UDP-ガラクツロン酸の高効率調製法

ポリガラクツロン酸合成酵素のドナー基質は市販されておらず、基質の効率的な調製法が求められていた。まず、ドナー基質である UDP-ガラクツロン酸の高効率調製法の確立を試みた。UDP 糖ピロホスホリラーゼを UTP とガラグツロン酸 1-リン酸に作用させ、２段階の精製を経て、高収率（84%）で UDP-ガラクツロン酸を調製することができた。

３．ポリガラクツロン酸合成酵素の活性測定、可溶化条件の至適化と安定化条件の検討

調製した基質を用いて当研究室の Akita らにより本酵素の活性測定法と可溶化法が構築された。この方法を用いてゲルろ過による分画を試みたところ、活性回収率（約 3%）が非常に低く、多段階の精製が困難であった。そこで、本酵素の植物材料、活性測定、可溶化、安定化条件の検討を行った。植物材料としては大量調製が容易なアズキ上胚軸を用いることとした。条件検討前と比べて、活性測定感度は 1.8 倍、可溶化効率は 1.3 倍上がり、全体としては 2.3 倍の活性が検出されるようになった。安定化条件の検討の結果、可溶化酵素は 200 mM 以下の塩濃度条件下で安定であった。低塩濃度緩衝液を用いて、至適化された条件で調製した可溶化酵素のゲルろ過を行ったところ、約 70%で活性を回収することに成功した。

４．ポリガラクツロン酸合成酵素の分子量の見積もり

至適化された条件を用いて、本酵素の分子量を調べた。本酵素が安定に保たれる低塩濃度条件下で、ゲルろ過と密度勾配遠心を行った。本酵素は少なくとも大きさの異なる 3 つの形態で存在し、それぞれ界面活性剤付きで 2,100 万（画分 B）、500 万（画分 C）、59 万（画分 D）の分子量を持っていることが分かった。

５．高塩濃度処理によるポリガラグツロン酸合成酵素の低分子量化

本酵素は高塩濃度で不安定であることが分かったので、高塩濃度条件下で本酵素の分子サイズがどのように変化するかを調べた。ゲルろ過で検出された 3 つの画分を、それぞれ 0.5 M 塩化ナトリウムでプレインキュベートし、ゲルろ過を行ったところ、画分 B、C では画分 D の位置に相当する位置に活性ピークが移動し、低分子量化した。以上の結果より、本酵素はいくつかのサブユニットから構成され、画分 D を活性を有する最小の構成単位としていることが明らかとなった。

６．ポリガラクツロン酸合成酵素の部分精製

一番小さい画分である 59 万の分子量を持つ画分 D から、Superose 6 ゲルろ過、スクロース密度勾配遠心、Mono Q 陰イオン交換クロマトグラフィー、UDP-ヘキサノールアミンアフィニティークロマトグラフィーの順に精製を行った。部分精製酵素の SDS-PAGE 解析では、単一のタンパク質として検出された。部分精製酵素の基質特異性解析を行ったところ、14 糖のオリゴガラクツロン酸に対する転移活性が最も高かった。

７．まとめ

本酵素は非常に大きな分子量を持ち、いくつかのサブユニットから構成されていることが分かった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文はペクチン生合成に関与するポリガラクツロン酸合成酵素の性質を解析したものである。

本酵素の活性測定に必要なドナー基質は市販されていないため、まずその高効率な調製法を構築した。この基質を利用して鋭敏かつ簡便な活性測定法の構築を行い、多糖合成酵素の性質を反映した連続的糖転移活性を検出した。次に、確立された活性測定法を利用して非常に不安定な本酵素を精製するため、酵素源・可溶化・活性測定緩衝液成分の至適化を行った。その結果、アズキ上胚軸が比活性の高い酵素源であった。条件検討前と比べて、可溶化効率は 1.3 倍、活性測定勧効率は 1.8 倍上がり、全体としては 2.3 倍の活性が検出されるようになった。至適化された条件でゲルろ過を行ったところ、約 70%で活性を回収することに成功した。至適化された条件を用いて、本酵素の構造的性質を解析した。可溶化酵素の塩濃度安定性を調べたところ、高塩濃度で不安定なことが分かった。本酵素のゲルろ過と密度勾配遠心を行ったところ、少なくとも 3 つの形態で存在し、大きなものから 2,100 万、500 万、59 万の分子量を持ち、扁平な形（長軸：短軸＝1.7：1）をしていることが示された。これらのことから本酵素は複合体を形成していることが示された。本酵素は高塩濃度で不安定なことが分かったので、高塩濃度条件下で複合体の構造がどのように変化するかを解析した。3 つの複合体を高塩濃度でプレインキュベーションし、ゲルろ過で活性の溶出位置の解析を行った。高塩濃度処理によりすべての複合体が 59 万の複合体の位置に相当する位置に活性ピークが移動した。この事は高塩濃度処理により複合体構造の一部が解離し低分子化したと考えられる。この結果から 59 万の複合体が活性を有する最小単位であることが明らかとなった。これらの結果は今まで全く得られていなかった本酵素の構造情報を得たという点で重要である。本論文の成果は、ペクチン生合成分子メカニズムの解明に重要な寄与をする。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。