

Title	Identification of Lysyl and Glycyl Residues Located at the Active Site in Glycogen Synthase and Their Roles in the Catalytic Reaction
Author(s)	Furukawa, Koji
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3070477
DOI	10.11501/3070477
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏 名	ふる かわ こうじ 治
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 9 4 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 5 年 9 月 27 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 生物化学専攻
学 位 論 文 名	Identification of Lysyl and Glycyl Residues Located at the Active Site in Glycogen Synthase and Their Roles in the Catalytic Reaction (グリコーゲン合成酵素の活性部位に位置するリジン及びグリシン残基の同定と触媒反応における役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福 井 俊 郎 (副査) 教 授 崎 山 文 夫 教 授 倉 光 成 紀

論 文 内 容 の 要 旨

グリコーゲンは11-14残基の α -1, 4-グルカン鎖が α -1, 6-グルコシド結合で枝別れした構造をもつ貯蔵多糖で、多くの生物でエネルギー源として用いられている。グリコーゲン合成酵素はこのグリコーゲンの合成反応を触媒する酵素である。本研究は、大腸菌のグリコーゲン合成酵素を対称とした、本酵素の活性部位に存在するアミノ酸残基の同定とそれらの触媒機能の解明を目的としている。

大腸菌グリコーゲン合成酵素は、ADP-グルコースをグルコシル供与体とするグルコース残基のグリコーゲンへの転移反応を行う。本酵素をアデノシンジホスホピリドキサル (AP_2 -PL) を用いて親和標識した結果、活性部位に Lys15が存在することが明らかになった。このリジン残基近傍のアミノ酸 (Lys-X-Gly-Gly) は、基質特異性が異なり、一次構造上の相同性が認められない哺乳類酵素にも保存されている。

この保存配列の役割を明らかにするために、Lys15を Gln, Glu, Arg に置換した変異型酵素を部位特異的変異導入法によって作製した。これらの変異型酵素は野生型酵素と比べると、 k_{cat} 値が6~17%に減少し、ADP-グルコースに対する K_m 値は7~45倍に増加していた。 K_m 値の増加は15位の残基の正電荷の消失と相関しており、ADP-グルコースの結合には15位の正電荷が重要であることがわかった。また、種々の反応速度論的な解析から、Lys15はADP-グルコースのグルコース側のリン酸基と相互作用していることが示唆された。一方、G17A 酵素や G17/18A 酵素では k_{cat} 値が野生型酵素の1/1000以下まで減少したが、G18A 酵素では k_{cat} 値は野生型の1/3程度であった。これらの変異型酵素のADP-グルコースに対する K_m 値は5倍程度しか増加していないことから、Gly17は酵素活性に重要な役割を果たす残基であると考えられる。さらに、野生型酵素ではその反応性が認められなかった、アデノシントリホスホピリドキサル (AP_3 -PL) がG17A 酵素やG18A 酵素のLys15に反応することが明らかになった。これは、共通配列中のグリシン残基がLys15の位置に影響を及ぼすことを示唆している。

Lys15をGlnに変えたK15Q酵素は野生型の17%の活性を保持していることから、この酵素に対して AP_2 -PL による親和標識を試みた。その結果、酵素は失活し、Lys277が特異的に修飾されること明らかになった。K15Q 酵素の AP_2 -PL による失活は基質で保護されることから、Lys277も活性部位に存在すると考えられる。Lys277をGln

に置換した酵素は野生側酵素と比べると、 k_{cat} 値が0.7%程度まで減少していたが、基質に対する K_m 値はほとんど変化していなかった。したがって、Lys277はADP-グルコースの結合よりもむしろ、触媒過程に重要な役割を果たすものと考えられる。

Lys277は野生型酵素ではAP₂-PLによって修飾されず、K15Q酵素においてのみ修飾された。このことは、反応性の高い残基を部位特異的変異導入によって置換することにより、別の活性部位残基を親和標識できる可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

大腸菌グリコーゲン合成酵素はADP-グルコースを基質とし、グリコーゲンの直鎖を合成する酵素である。古川君の論文は、親和標識と部位特異的変異導入を用いて、この酵素の活性部位に位置する2個のリジン残基と2個のグリシン残基を同定するとともに、それらの触媒反応における役割を明らかにしたものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。