

Title	ジャガイモの α -グルカンホスホリラーゼに関する研究
Author(s)	鴨川, 敦美
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29722
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 6 】

氏名・(本籍)	鴨 川 敦 美 かも がわ あつ み
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 1508 号
学位授与の日付	昭 和 43 年 6 月 19 日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ジャガイモの α -グルカンホスホリラーゼに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 二国 二郎 (副査) 教授 奥貫 一男 教授 倉橋 潔

論 文 内 容 の 要 旨

α -グルカンホスホリラーゼは生物界に広く分布し、デンプンやグリコーゲンの代謝に重要な関係を持っている。特にウサギ筋肉から得られた酵素はいわゆるアロステリック酵素の一つとして近年詳細な研究が進められており、その生理学的な役割も明らかにされてきた。一方、植物起源であるジャガイモの酵素は組織中における含有量も高く筋肉酵素に次いでよく知られているものであるが、その化学的な研究ははるかにおこなわれている。われわれはこのジャガイモ酵素が筋肉酵素との比較において二、三の興味ある性質を持っているので、これを用い酵素の構造と機能、特に酵素反応の調節機構を解明する手がかりが得られるだろうと考え、ジャガイモ酵素の純化と、その性質の究明を行った。本研究に関する現在までの報告は3報に分かれており、第1報および第2報は共著であるが、一連の研究であるので、主論文である第3報と共に概説する。

先ず第1報では、ジャガイモよりデンプンへの吸着とクロマトグラフィにより、ホスホリラーゼを純化して、結晶状に分離する方法を確立した。本酵素の結晶化については既に報告されたことがあるが、結晶酵素の性質に関する記載がなく、その後もこの方法が用いられていない。われわれが得た結晶酵素は、電気泳動と超遠心分離において均一な性質を示し、沈降係数は6.5Sであった。またそのアミノ酸組成を調べると、既に報告されているウサギ筋肉の酵素のアミノ酸組成にかなりよく類似していることがわかった。ジャガイモの酵素は筋肉酵素と異なりアデノシンリン酸による活性化が認められないし、またサブユニットへの解離もみられていないのかかわらず、その分子量とアミノ酸組成が類似していることは興味深い。

また従来種々の論議が行われてきた、ホスホリラーゼがプライマーを全く含まない状態でグルコース-1-リン酸だけからいわゆる *de novo* の多糖類の合成を行うことができるかどうかという点について、今回得られたジャガイモの結晶酵素を用いて検討した。その結果、グルコアミラーゼで処理し

た結晶酵素と活性炭で精製したグルコース-1-リン酸を用いた系では、長時間に渡ってオルトリン酸の放出が全く見られないことを見出し、ホスホリラーゼは *de novo* の合成を行わないと結論した。この際にこのような系でも極く微量の α -アミラーゼを添加すると、急激なオルトリン酸の放出が起ることを見出し、その原因を考察した。

次いで第2報においては、前報で指摘したようにジャガイモの酵素と筋肉の酵素のアミノ酸組成に類似性が見出されたので、両酵素の高次構造をも比較するために、円偏光二色性を測定した。その結果、結合ピリドキサルリン酸のまわりの立体構造が非常によく似ていることがわかった。また $222\text{ m}\mu$ の分子楕円係数より計算したジャガイモ酵素の α -ヘリックス含量は29%であった。これらの結果からもやはり両酵素はその活性の調節機構に著しい差異があるにかかわらず、タンパク質としての構造がおそらくよく似たものであろうと考えられた。

主論文である第3報においては、これら2種の酵素の比較をすすめるために、特にピリドキサルリン酸の結合様式について調べた。ジャガイモのホスホリラーゼは既に知られている通り、筋肉のホスホリラーゼ *b* と同じく1分子中に2分子のピリドキサルリン酸を結合している。そのためこの酵素は中性水溶液において $333\text{ m}\mu$ に小さな吸収ピークを示すが、この溶液の pH を徐々に上げていくとこのピークは減少し、かわりに $390\text{ m}\mu$ 附近に新しい吸収ピークが現われる。アルカリ溶液におけるこの吸収変化の様子は、既に報告されている筋肉酵素の場合とよく一致する。Fischer らはこの変化をピリドキサルリン酸の結合が *aldamine* 型より *Schiff* 塩基型に変換することによるものと考えているが、われわれは 0.02M NaBH_4 で還元したジャガイモ酵素でもアルカリ溶液において全く同様の変化を示すところから、この変化はむしろ結合ピリドキサルリン酸中の解離基、おそらくフェノール性水酸基の解離によるものではないかと考えた。何れにしてもこのような変化を通して調べたピリドキサルリン酸の結合様式も、ジャガイモ酵素と、筋肉酵素とでよく一致していることが明らかになった。

一方、高濃度の尿素によるホスホリラーゼの失活を測定してみると、ジャガイモ酵素の方が筋肉酵素よりも失活に対してはるかに高濃度の尿素を要求することがわかった。次いで、この失活と結合ピリドキサルリン酸との関係を見るために、種々の濃度の NaBH_4 を共存させてジャガイモ酵素とを尿素で処理すると、 NaBH_4 による著しい失活の保護効果が見られた。この効果は 0.02M NaBH_4 で最高となり、それ以上の濃度では保護効果は減少した。 NaBH_4 を加えたものと加えないものとの、尿素処理後の酵素タンパク質を回収して、その吸収をみたところ、 NaBH_4 のないものでは結合ピリドキサルリン酸が完全に失われていたが、 NaBH_4 を加えたものではそれが残っていることを認めた。このことより NaBH_4 を加えたものでは、還元によりピリドキサルリン酸が固定され、その結果失活が抑制されたものと考えられる。これを確かめるために、 0.02M NaBH_4 のみで中性において処理したジャガイモ酵素を調製し、その性質を調べたところ、この還元酵素はもとの未処理の酵素と比べ活性の低下は全く認められず、また、 $333\text{ m}\mu$ の吸収ピークも変化していなかった。この還元酵素を改めて尿素で処理すると、やはりもとのジャガイモ酵素よりも尿素に対して抵抗性が高くなっていることがわかった。Fischer らの研究によると筋肉酵素の場合には、このような中性の条件では還元はすまず、酸性状態ではじめてピリドキサルリン酸は固定され、酵素活性は約60%にまで低下すると

いう。

一方、ジャガイモ酵素はさらに高濃度の NaBH_4 (0.06M) で処理すると、ほとんど完全に失活することがわかった。このように処理した酵素ではもはや $333 \text{ m}\mu$ 附近の吸収ピークは認められなくなっているが、ピリドキサルリン酸の呈色試験であるクロロイミド反応は、この処理によってはじめて濃い青色を呈するようになった。もとのジャガイモ酵素あるいは 0.02M NaBH_4 で処理した酵素は、黄緑色を示すだけであるので、このような状態ではピリドキサルリン酸の水酸基は結合状態にあるのではないかと考えられる。また 0.06M NaBH_4 の処理による $333 \text{ m}\mu$ の吸収ピークの消失と酵素活性の減少とは、平行してすまない。そしてこの処理によって紫外領域の吸収も大きく変化するところから、ピリドキサルリン酸の結合だけではなく、タンパク質部分にも変化が起っているものと考えられる。以上の結果より、ジャガイモのホスホリラーゼと筋肉のホスホリラーゼにおけるピリドキサルリン酸の結合様式にはかなりの類似性がみられるが、詳細な点にはかなりの差異が指摘される。またこれらの結果より、筋肉酵素ではみられていなかった結合ピリドキサルリン酸の状態と酵素活性の間の関係を明らかにすることができた。

論文の審査結果の要旨

α -グルカンホスホリラーゼは、1937年加リン酸分解という全く新しい化学反応を触媒する酵素として発見されたもので、動物体におけるグリコーゲン、植物体における澱粉の生成分解に関与する重要な酵素である。

動物筋肉から得られる α -グルカンホスホリラーゼ *a* および *b* は、早くから結晶状に得られ、その作用機作、化学構造もかなり詳細に研究されているが、1940年発見された植物 α -グルカンホスホリラーゼについては、結晶に得られた確実の証明がなく、従ってその機作、特に化学構造の研究は動物酵素に比べて著しくおくれしていた。

鴨川君は、まずジャガイモから α -グルカンホスホリラーゼを大量に結晶に得る方法を確立し、この結晶酵素が、電気泳動および超遠心的に単一蛋白質であることを証明した。この純粋の酵素を使用して、グルコース-1-リン酸からの多糖類の合成に、プライマーとして多糖類を必要とすることを確証し、従来植物酵素について出されていた機作の疑点を取り除いた。

さらに、ウサギ α -グルカンホスホリラーゼ *b* の結晶標品を作り、これと比較しながら、両酵素の機作および構造上の相似点と相違点を、アミノ酸分析、円偏光二色性、尿素処理および NaBH_4 (ナトリウムボロハイドライド) 処理による吸収曲線の変化、ビタミン B_6 リン酸の呈色反応などの諸方法によって精査し、その結果をとりまとめ、かつ、動物ホスホリラーゼ中のビタミン B_6 リン酸の結合様式についての従来の説の誤を指摘した。

以上、鴨川君のジャガイモグルカンホスホリラーゼに関する研究は、20年近くおくれいていた植物ホスホリラーゼの研究を動物ホスホリラーゼの研究水準までひきあげ、両酵素の異同点を論じ得るようにしたもので、理学博士の学位論文として十分価値があるものと認定した。