



Title	$\alpha$ -グルカン・ホスホリラーゼの反応機構に関する研究
Author(s)	有木, 政博
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/31609">https://hdl.handle.net/11094/31609</a>
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">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名 ・ (本籍)	あり 有	き 木	まさ 政	ひろ 博
学 位 の 種 類	理	学	博	士
学 位 記 番 号	第	3	8	5
		4		号
学位授与の日付	昭 和 52 年 3 月 25 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	$\alpha$ -グルカン・ホスホリラーゼの反応機構に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教 授	福井 俊郎		
	(副査) 教 授	松島 祥夫	教 授	浜口 浩三

## 論 文 内 容 の 要 旨

$\alpha$ -グルカン・ホスホリラーゼは、グリコーゲンやデンプンを可逆的に加リン酸分解する酵素で、その反応はrapid equilibrium Random Bi Bi 機構に従って進行する事がわかっている。また、グルコノラクトンを用いた阻害実験および2次同位体効果の結果は、酵素反応の途中でカルボニウムイオン中間体が形成される可能性を示唆している。しかしながら、酵素の反応機構について最も重要な、触媒に関与している官能基の種類、あるいはその役割等に関する知見は、従来ほとんど得られていない。本研究では、グルコース(Glc)の類似化合物を用いた阻害実験、および水溶性カルボジイミドによる化学修飾などの手法を用いて、より詳細な触媒機構を明らかにしようとした。

グルコシルフルオリド(GF)は、ホスホリラーゼの作用を強く阻害した。この化合物はGlcに比べ、ウサギ筋肉酵素(b型)に対して10倍、ジャガイモ酵素に対しては4倍程度強い親和性を示した。GFの酵素に対する強い親和性の原因を解明するため、一連のGlc類似化合物を合成し、阻害実験を行った。その結果、グルコシルアミン、1-チオ-Glc、および5-チオGlc等、イス型の構造をもつ化合物は、GlcやGF同様ウサギ酵素に対してnonlinear competitive、ジャガイモ酵素に対してはlinear competitiveな阻害を示した。一方、5-NH<sub>2</sub>-Glcは、グルコノラクトンと同じく、ウサギ酵素に対してlinear noncompetitiveという異常な阻害形式を示した。この現象は、両化合物に共通の、半イス型の構造に起因するものと解釈された。GlcのC-1位のOH基を置換した化合物について、その親和性はGF>Glc>グルコシルアミン>1-チオGlcの順であり、酵素に対する親和性の強さと、置換基の電気陰性度およびその水素結合受容能力に関する配列、F>OH>NH<sub>2</sub>>SHとの間に強い相関性がみられた。このことから、ホスホリラーゼの反応に関して、酵素に結合したGlc-1-Pのglucosidic酸素原子

と酵素側のある解離基との間に水素結合が形成され、つぎに酸素原子のプロトン化が起こるという反応機構を考えた。Madsenらは、水溶性カルボジイミドによる化学修飾でウサギ酵素が失活する事を示した。この知見から、プロトン化の機能をもつ解離基としてカルボキシル基の可能性を想定し、化学修飾の実験を行なった。

10mM 1-cyclo-3-(2-morpholinyl-4-ethyl) carbodiimide metho-*p*-toluenesulfonate (CMC), pH 5.1, 25°C の条件でウサギ酵素は1次式に従って失活した。この失活速度が pH 6.以下で急激に増大する事、あるいは0.2M NH<sub>2</sub>OH の処理によっても活性の回復が見られないなどの事実から、この失活はカルボキシル基の修飾によるものであると考えた。さらに、この条件下で50mMグリシンエチルエステルを加えると失活速度に顕著な増加が見られた。また、50mMグルコシルアミンは、グリシンエチルエステルと同程度の促進効果を示した。これに対して、2-NH<sub>2</sub>-, 3-NH<sub>2</sub>-, および6-NH<sub>2</sub>-Glcは、GlcやGFなどと同様この失活速度を減少させた。この事実は、活性に必須なカルボキシル基が、酵素結合時のGlc-1-PのC-1近傍に位置すると考えるとよく説明される。さらに、CMCで部分的に修飾した酵素のK<sub>m</sub>値に変化が見られない、あるいは酵素モノマーあたり1モルのカルボキシル基の修飾によって酵素活性が完全に消失する事などから、このカルボキシル基は、先に述べた基質へのプロトン化の役割を果しているものと結論した。

## 論文の審査結果の要旨

$\alpha$ -グルカン・ホスホリラーゼは生体内におけるグリコーゲン代謝において重要な酵素であるが、その反応機構についての知見は非常に限られている。有木君は先ずホスホリラーゼがグルコシルフルオリドで強く阻害されることを見出し、これを基にして種々のグルコース類似化合物について阻害実験を行った。その結果、グルコシルアミン、1-チオグルコース、5-チオグルコースなどのイス型化合物がグルコースやグルコシルフルオリドと同じくホスホリラーゼに対して競争的な阻害をすること、ホスホリラーゼに対するそれらの親和性と置換基の電気陰性度との間には強い相関性があることなどが明らかになった。これらの実験結果から有木君はホスホリラーゼの反応に関して、酵素に結合したグルコース-1-PのC-1につくO原子と酵素側の解離基との間に水素結合が形成され、次にO原子のプロトン化を経てC-O結合の開裂がおこるという反応機構を提出した。次に、化学修飾の実験を行ない、ホスホリラーゼが水溶性カルボジイミド試薬でそのカルボキシル基を修飾すると失活すること、この失活はグリシンエチルエステルやグルコシルアミンの添加によって促進されるが、2-アミノ、3-アミノ、および6-アミノグルコースでは逆に抑制されることなどを見出した。これらの結果から、有木君は活性に必須なカルボキシル基が、ホスホリラーゼに結合したグルコース-1-PのC-1の近くに位置し、それが基質へのプロトン化の役割を果しているものと結論した。

以上のように、有木君の業績はホスホリラーゼの反応機構の解明に対して独自の手法を展開したものであり、理学博士の学位に十分値するものと判断される。