



| | |
|--------------|---|
| Title | グリコーゲン・ホスホリラーゼにおける機能部位の構造と性質 |
| Author(s) | 下村, 正二 |
| Citation | 大阪大学, 1979, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/32343 |
| 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。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【32】

| | |
|---------|------------------------------------|
| 氏名・(本籍) | 下村正二 |
| 学位の種類 | 理学博士 |
| 学位記番号 | 第 4516 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和54年3月19日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当 |
| 学位論文題目 | グリコーゲン・ホスホリラーゼにおける機能部位の構造と性質 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 福井 俊郎 教授 成田 耕造 教授 浜口 浩三 |

論文内容の要旨

ウサギ筋肉グリコーゲンホスホリラーゼはリン酸化・脱リン酸化系によって活性が制御される複雑な調節機構をもつ。このような制御に加えて、ヌクレオチドの濃度レベルによっても活性調節を受けるアロステリック酵素である。さらに大きな特徴はコファクターとしてビタミンB₆の一つ、ピリドキサール5'-リン酸(PLP)を結合していることである。ホスホリラーゼの機能を正しく理解するためには、これらの機能と密接な関係をもつ部位の構造上の性質について詳細に知る必要がある。本研究では吸収・円二色性(CD)スペクトル、および化学修飾法を用いてアロステリック部位ならびにコファクター結合部位についての諸性質を調べた。

(1) アロステリック部位におけるアロステリックエフェクターの結合状態

不活性型ホスホリラーゼ β はAMPによって活性型 α と同程度まで活性化される。AMPが本酵素に結合すると250–300nm波長領域にCDスペクトル変化を誘起した。AMPアナログの比較からヌクレオチドの結合によるCD変化は塩基の種類に依存しかつ塩基の吸収帯に対応した波長領域に生じた。アデニン環をもつヌクレオチドが結合すると266nmに正、289nmに負のcouplet状態を反映するような特徴的な差スペクトルが得られることから、ヌクレオチドの結合によって誘起したコットン効果はヌクレオチド塩基とその吸収帯の重なり合う蛋白側発色団(トリプトファン、チロジン)との間のstacking相互作用から生じたと解釈した。AMP・酵素複合体形成によって生じたこのコットン効果の旋光強度は他の因子によって大きく変動することが示され、この結果からアロステリック部位に結合しているAMPは最低2種類の結合状態をとりうると考えた。

(2) コファクターの結合様式

吸収スペクトルの性質上、ホスホリラーゼに結合しているPLPは330—340nmに吸収帯をもつB₆酵素群に入る。しかしながら、この吸収帯に対して2通りの結合様式（置換型aldimineとシップ塩基）が可能であり決定的な証拠は提出されていない。筆者は種々のPLP誘導体のスペクトルを比較することによって250nm近傍における吸収帯の大きさがこの2つの結合様式で大きく異なることを見出した。そこでホスホリラーゼに結合しているPLPの近紫外波長領域でのスペクトルを検討した結果、PLPはシップ塩基型で結合していることが証明された。

(3) コファクター結合部位の構造と性質

PLPは酵素活性に必須であるが一般のB₆酵素とは異なり4位アルデヒド基は触媒中心でなくむしろ5'位リン酸基が重要であると考えられている。そこでリン酸基結合部位周辺の性質を調べるために、ピリジン環の5位を修飾したPLPアナログ（一部は新化合物）を合成し、アポ酵素との再構成を行った。再構成酵素のCD・吸収スペクトル、そして再構成反応に対する速度の比較などからリン酸基結合部位は大きな空間またはしなやかな構造をもつ領域であり、リン酸基とイオン結合しうる陽イオン基の存在が示唆された。また化学修飾基と発色団をもつアナログからはLys-573がコファクター部位に存在し、リン酸基に隣接する両サイドにはかなりの疎水的な領域が存在することが示された。PLPのリン酸基近傍に疎水性が高くかつ広い空間が存在することは、リン酸基が活性に重要なことを考慮すると、この空間に基質が結合する可能性が考えられる。また疎水的環境にあるリン酸基は異常な解離を示す可能性があり、触媒作用に対し何らかの役割を担っているのではないかと推測される。

論文の審査結果の要旨

ウサギ筋肉のホスホリラーゼはグリコーゲン代謝の調節に関与する重要な酵素で、複数の特徴的な機能部位をもつ。

下村君はホスホリラーゼの作用とその機構を明らかにするために、吸収および円二色性（CD）スペクトル、化学修飾などの方法を用いてAMPとピリドキサール5'-リン酸（PLP）の結合する部位の構造上の性質を調べた。論文は主として次の4つの部分よりなる。

1) 不活性型ホスホリラーゼにAMPが結合すると近紫外領域に特徴あるCDスペクトル変化が誘起されることを見出し、その解析よりAMPのアデニン環とタンパク質の芳香族アミノ酸残基との間にstacking相互作用が起ることを示した。また、このコットン効果の旋光強度に対する他のリガンドの結合、温度などの影響の測定から、アロステリック部位に結合するAMPは少くとも2種類の異った結合状態をとり得るものと結論した。

2) ホスホリラーゼに結合するPLP由来の近紫外領域スペクトルを種々のPLP誘導体のスペクトルと比較して、従来明確でなかったPLPの結合様式がシップ塩基型であることを証明した。

3) 種々の5位修飾PLPアナログを合成し、アポホスホリラーゼとの再構成実験を行った結果、リ

ン酸基結合部位には大きな空間または柔軟な構造をもつ領域があり、PLPのリン酸基とイオン結合し得る陽イオンが存在することを示した。

4) 化学修飾基と発色団をもつPLPアナログとアポホスホリラーゼとの反応から、Lys-573がPLP部位に位置し、またリン酸基の両側にかなり疎水的な領域が存在することを見出した。そして、この結果から結合PLPが触媒作用に直接的な役割をもつことを推測した。

以上のように下村君の論文はホスホリラーゼの機能とその調節の解明に対して重要な知見を与えたものであり、理学博士の学位論文として十分の価値あるものと認める。