

Title	ホスホリラーゼとグリコーゲン合成酵素の反応機構・ ビリドキサル誘導体の利用
Author(s)	多賀谷, 光男
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/34609">https://hdl.handle.net/11094/34609</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"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名・（本籍）	た が や みつ お 多 賀 谷 光 男
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 6 7 8 2 号
学位授与の日付	昭 和 6 0 年 3 月 2 5 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	ホスホリラーゼとグリコーゲン合成酵素の反応機構・ピリドキサル 誘導体の利用
論文審査委員	(主査) 教 授 福 井 俊 郎 (副査) 教 授 佐 藤 了 教 授 松 原 央

### 論 文 内 容 の 要 旨

本研究はホスホリラーゼとグリコーゲン合成酵素の反応機構をピリドキサルリン酸（PLP）誘導体を用いて説明することを目的として進められた。

1. ジャガイモ・ホスホリラーゼのビスピリドキサルリン酸 [bis (PLP)] による親和標識。ホスホリラーゼは活性に必須な補酵素 PLP をサブユニットあたり 1 個含んでいる。下村と福井は bis (PLP) を合成し、この試薬がウサギ筋肉酵素に再構成されると Lys-679 (PLP 結合部位) と Lys-573 にシッフ塩基で架橋結合することを見出した。bis (PLP) をジャガイモホスホリラーゼに再構成させると、ウサギ筋肉酵素と同様に bis (PLP) は 2 つのリシンにシッフ塩基で架橋結合した。一次構造の解析より標識部位の構造を左記のように決定した。上側の構造はジャガイモ酵素の PLP 結合部位と一致し、下側はウサギ筋肉酵素の Lys-573 から Leu-577 の構造と同じであった。他の知見と考え合わせるとジャガイモ酵素とウサギ筋肉酵素の活性部位はよく類似していると言える。

2. ピリドキサル(5')ニリン酸(1)- $\alpha$ -D-グルコース (PLDP-Glc) で再構成されたグリコーゲンホスホリラーゼの反応。ウサギ筋肉ホスホリラーゼに再構成された PLDP-Glc のグルコシル基はグリコーゲンへ転移し、新たに  $\alpha$ -1,4 結合を生成しうることが見い出されていた。この反応の特徴づけをするために反応を詳しく解析し、酵素本来の反応と比較した。両反応はグリコーゲンに対する  $K_m$ 、種々のリガンドによる活性化および活性化エネルギーにおいてよく類似していた。Log  $k/pH$  プロットはベル型となり  $pK_a = 6.90$ 、 $pK_b = 8.84$  であった。これらの結果は PLP のリン酸基が一般酸としてではなく、求電子基として働くことを示唆している。

3. グリコーゲン合成酵素のUDP-ピリドキサル (UDP-PL) による親和標識。グリコーゲン合成酵素の活性部位の構造を調べるためにUDP-PLを用いて親和標識を行った。UDP-PLは酵素を一次反応式に従って失活させ、その速度は試薬に対し飽和曲線を与えた ( $K_i = 25 \mu\text{M}$ ,  $k_o = 0.22 \text{ min}^{-1}$ )。失活反応は基質のUDP-Glc や阻害剤のUDPによって著しく抑えられた。酵素失活に伴い425 nmにピークを持つ吸収帯が生じ、その増加量と失活はほぼ並行していた。失活酵素にアミノチオール化合物を添加すると活性はほぼ完全に回復したが、 $\text{NaBH}_4$ で前処理しておくとも再活性化は全く認められなかった。一次構造の解析により標識されたペプチドの構造を次のように決定した。Glu-Val-Ala-Asn-Labeled Lys-Val-Gly-Gly-Ile-(Tyr)。UDP-PLとbis(PLP)の構造類似性から考えると、グリコーゲン合成酵素において標識されたリシンはホスホリラーゼのLys-573に相当し、基質のピロリン酸との結合に関与しているものと思われる。

### 論文の審査結果の要旨

ホスホリラーゼとグリコーゲン合成酵素は生体内において、それぞれグリコーゲンの分解と合成及びその調節に与る重要な酵素である。

多賀谷君はこれら2つの酵素の触媒反応機構を明らかにすることを目的として、3種のピリドキサル誘導体を合成し研究を行なった。

1) ジャガイモホスホリラーゼをビス(ピリドキサルリン酸)を用いて親和標識することにより、ウサギ筋肉ホスホリラーゼと同じく、活性部位領域にリシン残基の存在することを明らかにした。2) ピリドキサル三リン酸- $\alpha$ -グルコースで再構成させたウサギ筋肉ホスホリラーゼの反応を詳細に調べ、ピリドキサルリン酸のリン酸基が求電子基として働くことを示した。3) グリコーゲン合成酵素のUDP-ピリドキサルによる親和標識を行ない、活性部位領域に特定のリシン残基の存在することを見出した。これらの結果に基づいて、ホスホリラーゼとグリコーゲン合成酵素の活性部位の構造類似性を指摘し、両酵素の反応機構を考察した。

以上のように、多賀谷君の論文は生化学的に顕著なものであり、理学博士の学位論文として十分に価値あるものと認める。