

Title	Probing the active site in UDP-glucose pyrophosphorylase by affinity labeling
Author(s)	数田, 恭章
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38445">https://hdl.handle.net/11094/38445</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	かず 数 田 恭 章
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 4 3 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 4 年 10 月 6 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Probing the active site in UDP-glucose pyrophosphorylase by affinity labeling (親和標識による UDP-グルコース・ピロホスホリラーゼ活性部位の 構造解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福 井 俊 郎 (副査) 教 授 倉 光 成 紀 教 授 二 井 將 光

## 論 文 内 容 の 要 旨

UDP-グルコース・ピロホスホリラーゼは、MgUTP とグルコース-1-リン酸から UDP-グルコースと Mg ピロリン酸を生成する反応及びその逆反応を触媒する酵素である。これまでに本酵素に関する構造的な研究はほとんど行われておらず、活性部位に関する知見も全く得られていなかった。そこで、本酵素の活性部位の構造を解析するために、ジャガイモ塊茎由来の酵素を用いて、一連の親和標識実験を行った。その結果、活性部位に存在する5個のリジン残基を同定し、それらの相対的な位置及び触媒反応における役割を推定することができた。個々の実験結果は次の通りである。

### 1) UDP-ピリドキサル及びUTP-ピリドキサルによる親和標識

UDP-ピリドキサル及びUTP-ピリドキサルは、UTP の  $\gamma$  位リン酸あるいはUDP-グルコースのグルコース相当部分に反応基を持つ試薬である。これらの試薬は、いずれも低濃度で本酵素を失活させた。その失活は、基質であるUTPあるいはUDP-グルコースの添加により抑制され、その化学量論は酵素1モルに対して試薬1モルであった。それにもかかわらず、標識部位の同定からは、5個のリジン残基 (K-263, K-329, K-367, K-409, K-410) が標識されることが明らかになった。これらの残基は活性部位に存在し、これらの残基への試薬の取り込みは、排他的に起こるものと考えられた。

### 2) ピリドキサルリン酸を含む一連の試薬による比較親和標識

ピリドキサル二リン酸グルコースは、先の2つの試薬とは逆のUDP-グルコースのウリジン相当部分に反応基を持つ試薬である。この試薬もまた、先の2つの試薬と同様に本酵素の活性部位に結合し、同じ5個のリジン残基を標識した。しかし、それぞれのリジン残基を標識する割合は先の2つの試薬とは異なっていた。各リジン残基へ取り込まれた試薬の量の比較を基にして、5個のリジン残基の活性部位における相対的な位置関係を推定した。

### 3) ピリドキサル二リン酸によるピロリン酸結合部位の親和標識

ピリドキサル二リン酸は、 $Mg^{2+}$  の存在下で本酵素を失活させた。その失活は、これまでの試薬とは異なり、UDP-グルコースの添加により促進され、また、ピロリン酸素の競争阻害剤であるオルトリン酸の添加により阻止さ

れることが明らかになった。促進された状態での標識部位の同定を行ったところ、試薬は K-329 にほとんど完全に  
取り込まれていた。これらの結果より、K-329 が結合ピロリン酸の近傍に存在し、基質である UDP-グルコースが  
先に結合すると、活性部位にコンホメーション変化が生じて、試薬の結合を促進するものと考えられた。また、変  
異型酵素の標識実験の結果から、K-329 と K-263 はそれぞれピロリン酸結合およびこのコンホメーション変化に関  
与しているものと推定された。

### 論文審査の結果の要旨

数田恭章君は、ピリドキサル・リン酸を含む新しいタイプの親和標識剤を合成して植物 UDP-グルコース・ピロ  
ホスホリラーゼに適用することにより、この酵素の活性部位領域に5個のリジン残基が存在することを見出し、それ  
らの残基を同定すると共に、それらの配置と役割について推定することができた。この研究結果は親和標識法の新し  
い有用性を示し、この酵素の活性部位構造について重要な知見を得たものであり、博士（理学）の学位論文として十  
分価値あるものと認める。