



Title	Higher Plant $\alpha$ -Glucan Phosphorylase Isozymes : Molecular Cloning and Engineering of Glucan- Binding Site
Author(s)	森, 博幸
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38537">https://hdl.handle.net/11094/38537</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">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 <sup>もり</sup>森 <sup>ひろ</sup>博 <sup>ゆき</sup>幸

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学)

学 位 記 番 号 第 1 0 9 5 2 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 10 月 4 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 Higher Plant  $\alpha$ -Glucan Phosphorylase Isozymes: Molecular Cloning and Engineering of Glucan-Binding Site  
(高等植物ホスホリラーゼ・アイソザイムの cDNA クローニングとグルカン結合部位のタンパク工学的研究)

論文審査委員 (主査)  
教 授 福 井 俊 郎

(副査)  
教 授 松 原 央 教 授 長 谷 俊 治

## 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などの $\alpha$ -1, 4-グルカン鎖をその非還元末端より順次加リン酸分解し、グルコース-1-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。植物組織中では、この酵素は、細胞内局在性（細胞質とプラスチド）、基質特異性（分岐鎖グルカンに対して高親和性と低親和性）、サブユニット分子量（9万と10万）を異にする2種のアイソザイム（H型とL型）として存在している。私は、これらの性質の違いを分子レベルで解明するために、ジャガイモ塊茎から、両アイソザイムをコードするcDNAをそれぞれ単離した。次に両者の構造上の相違点に注目して、植物アイソザイム間、ならびに動物・植物間キメラ酵素を構築し、それらの酵素化学的解析を行った。その結果、基質特異性に大きな影響を与える領域を同定できた。また、種々のグルカンに対して高い親和性を持つ酵素を構築することができた。

### 1) ジャガイモ塊茎ホスホリラーゼ・アイソザイムの cDNA クローニング

タンパク化学的に決定した両アイソザイムの部分アミノ酸配列を基にして、未熟ジャガイモ塊茎 cDNA ライブラリーから、両アイソザイムをコードするクローンを各々単離した。推定アミノ酸配列の比較より、両者の間には2つの大きな違いが見られた。第1にL型アイソザイムにのみ、アミノ末端に50残基から成る延長配列が存在していた。第2には、L型アイソザイムのポリペプチドの中央部位に、両者の分子量差を説明する78残基の挿入配列がみられた。これらの相違点を除いた場合、両者のアミノ酸残基は63%が一致しており、高い相同性がみられた。これらの相違点のうち、前者は両アイソザイムの細胞内局在性に、後者は基質特異性の差異に直接関与しているものと考えられた。

### 2) L型酵素の挿入配列を含む領域をH型で置き換えたキメラ酵素の解析

両アイソザイムの大腸菌における発現系を構築した。両酵素の発現は、培養温度に著しく依存していた。組み換え両酵素の酵素化学的性質は、ジャガイモから精製したものと同一であった。L型アイソザイムの挿入配列を含む領域をH型の対応する領域で置換させたキメラ酵素の、分岐鎖グルカンに対する親和性は、L型酵素よりもはるかに高く、H型に匹敵するものであった。これより、挿入配列の存在が、酵素の分岐鎖グルカンに対する基質特異性に、直接影響を与えていることが示された。さらに、置換したH型アイソザイムの領域の一部をL型に戻した変異キメラ酵

素は、分岐鎖グルカンに対する親和性が低下していた。したがって、導入した H 型の領域内、糖鎖に対して親和性を持つ部位が存在することが示唆された。

### 3) L 型酵素に動物酵素の高親和領域を組み込んだキメラ酵素の解析

L 型酵素の挿入配列を含む領域を動物酵素の対応する高親和領域（グリコーゲン貯蔵部位）で置き換えたキメラ酵素を作製した。得られた酵素は、L 型はもちろん、H 型、動物酵素よりも分岐鎖グルカンに対して高い親和性をもっていた。さらに、この酵素は直鎖グルカンを含む種々の  $\alpha$ -グルカンに対して高い親和性をもっていた。L 型アイソザイムがもつ高親和活性部位と導入された動物酵素の高親和領域が協同的に機能することで、種々のグルカン基質に対して高親和をもつようになったものと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

植物組織には、2 種のホスホリラーゼ・アイソザイムが存在する。森君の論文は、それらアイソザイムの cDNA をジャガイモ塊茎からクローニングし、それらの構造を決定するとともに、両アイソザイムの間および L 型アイソザイムと筋肉ホスホリラーゼとの間のキメラ酵素を作成し解析したものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。