The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Molecular Cloning and Affinity Labeling of UDP-Glucose Pyrophosphorylase from Escherichia coli : Structural Comparison with the Eukaryotic Enzymes |
| Author(s) | Shaikh, Abu Hossainn |
| Citation | 大阪大学, 1994, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/38847 |
| 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 | Shaikh Abu Hossainn（シェイク アブ ホセイン） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（理　学） |
| 学 位 記 番 号 | 第　11227　号 |
| 学位授与年月日 | 平成 6 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>理学研究科生物化学専攻 |
| 学 位 論 文 名 | Molecular Cloning and Affinity Labeling of UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Escherichia coli* : Structural Comparison with the Eukaryotic Enzymes<br>**（大腸菌 UDPG ピロホスホリラーゼのクローニングと親和標識（真核生物の酵素との構造比較））** |
| 論 文 審 査 委 員 | （主査）<br>教　授　福井　俊郎<br>（副査）<br>教　授　二井　将光　　教　授　倉光　成紀 |


## 論 文 内 容 の 要 旨

UDPG ピロホスホリラーゼはグリコーゲンやデンプンなどの多糖類の生合成中間体として重要な UDPG の合成と分解を触媒する酵素で，動植物，微生物に広く分布する。大腸菌やサルモネラ菌などの細菌においては，本酵素はガラクトース代謝やリポ多糖などの細胞膜・細胞壁成分の生合成に必須の役割を果している。本研究では，大腸菌の UDPG ピロホスホリラーゼの構造と機能の解明を目的として，その遺伝子をクローニングして塩基配列を明らかにするとともに，高発現系の構築および酵素の精製と性質の解析，さらに親和標識による基質結合部位リジン残基の同定を行った。

大腸菌 K-12 株から本酵素を均一に精製し，その N-末端域，および酵素消化あるいは臭化シアン分解によって得られたペプチド断片のアミノ酸配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして，大腸菌のゲノミックライブラリーより本酵素遺伝子をクローニングした。得られたクローンは，約 1.2 kbp の挿入 DNA 断片をもっていた。本酵素の構造遺伝子は 906 塩基で構成され，302 個のアミノ酸残基をコードしていた。大腸菌酵素のアミノ酸配列は，酢酸菌やサルモネラ菌の同酵素の配列と高い相同性を示したが，貯蔵多糖の生合成に関与する真核生物の UDPG ピロホスホリラーゼや，同様な糖ヌクレオチドを基質とする他の酵素の配列とまったく相同性を示さなかった。すなわち，原核および真核生物の UDPG ピロホスホリラーゼは，構造的には 2 つのグループに分類されることが明らかとなった。次いで，本酵素の遺伝子断片を用いて物理的マッピングを行い，本酵素遺伝子が大腸菌染色体上の 27.3 分に位置することを明らかにした。また，ガラクトース発酵能を欠如する *galU* 変異株に本酵素遺伝子を導入した結果，ガラクトース発酵能を回復した。

本酵素遺伝子を含む pUC18 プラスミドを導入した大腸菌は，全可溶性タンパク質の 15% 以上に相当する本酵素を生産した。各種のクロマトグラフィー操作により均一に精製した酵素は，UDPG の可逆的な合成反応を Ordered Bi-Bi 機構で触媒した。活性には Mg イオンが必須で，遊離の UTP とピロリン酸は反応を阻害した。また，UDPG 以外に TDPG もわずかに基質とした。

ウリジンジホスホピリドキサール（UDP-PL）は，時間依存的かつ濃度依存的に大腸菌酵素を不活性化した。この不活性化反応は，UTP または UDPG によって顕著に抑制され，UDP-PL は本酵素の基質結合部位に対する親和標識試薬として作用すると考えられた。酵素の失活にともなって UDP-PL が酵素中に取り込まれ，完全失活と試薬の取り込み量との当量関係は，サブユニット当たり約 1.1 モルであった。UDP-PL による修飾酵素をトリプシンにより消

化し，修飾ペプチドの精製とアミノ酸配列の解析を行った結果，K87 および K84 が標識部位として同定された。これらの標識部位は，ウシ肝臓やジャガイモ酵素の UDP-PL による標識部位と一次構造上の位置はまったく異なっていたが，周辺のアミノ酸配列における部分的な相同性が認められた。以上の結果より，原核および真核生物の UDPG ピロホスホリラーゼは，全体的なタンパク質構造は異なるが，触媒的性質や活性部位の構造はある程度類似していて，同様な反応機構をもつものと推定された。

## 論文審査の結果の要旨

フセイン シェク アブ君は，大腸菌の UDPG ピロホスホリラーゼの構造を真核生物由来の同酵素の構造と比較することを目的として，大腸菌酵素の構造遺伝子をクローニングしその全塩基配列を決定するとともに，高発現系の構築および組換え酵素の精製と性質の解析，さらに親和標識による活性部位リジンの同定を行った。これらの研究結果は，博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。