総 説

澱粉系多糖生合成の初発機構

松 田 和 雄*

(昭和56年6月8日受理)

Initiation Process of the Biosynthesis of Amylaceous Polysaccharides

Kazuo MATSUDA

Department of Agricultural Chemistry, Tohoku University
(1-1, Amamiyamachi-Tsutsumidori, Sendai 980, Japan)

1. はじめに

in vitro の系で澱粉系多糖の生合成を行う酵素としては、ホスホリラーゼおよび糖ヌクレオチドを糖供与体とする α -1,4グルカン合成酵素が知られているが、これらの酵素は生合成に際して、通常グルコシル残基の受容体としてプライマー (primer) と呼ばれる同質の多糖もしくはオリゴ糖を必要とする。したがって、これらの酵素は受容体であるプライマーに糖残基を付加するいわゆる伸鎖反応(chain elongation)を行う酵素といえよう。それゆえ、これらの酵素に関する限り、澱粉系多糖が生成するためには微量ではあってもかならず“種”となるプライマーが必要であり、かつて二國先生がいみじくもいわれたように「澱粉ができるためには澱粉が要る」わけである。

それでは、このような“種”のないところでは澱粉系多糖の生合成はまったく起らないのであろうか。哺乳動物の胎児の肝臓には妊娠のある時期までグリコーゲンが存在しないといわれ¹⁾、菌糸体にかなりの量のグリコーゲンを蓄積する赤パンカビ(*Neurospora crassa*)も胞子の時期にはグリコーゲンを含有しないといわれている²⁾。これらの事実は澱粉系多糖の“*de novo*”の合成が生体内で起りうることを示唆している。また、多くの酵素がプライマー依存性であるとしても、生体内にはプライマーを作る酵素が存在しなければならぬはずである。澱粉系多糖の生合成に関して多くの事実が解明されるにつ

れ、その初発機構が残された大きな問題として研究者の関心を集め、いくつかの興味ある結果が報告されている。しかし、澱粉系多糖の初発機構を論ずるには常に大きな困難がつきまとうことは否定できない。すなわち、福井も指摘しているように³⁾、ある合成酵素がプライマーを必要としないと結論するためには基質および酵素の純度についての厳密な検討が必要であり、そのゆえに、今までに発表されたいくつかの報告が厳しい批判的となっているのも当然といえよう。それにもかかわらず、いくつかの実験結果は澱粉系多糖生合成の初発機構の解明にある種の手掛りを与えたことも事実である。

このように、澱粉系多糖生合成の初発機構については現在でもなお完全な解答は与えられていないが、以下1960年代の後半から現在に至る報告を中心にこの問題についてまとめてみたい。問題の性質上、歯切れの悪い書き方になる点も多いと思うが、ご容赦いただければ幸いである。

2. 植物組織におけるホスホリラーゼおよび α -1,4グルカン合成酵素の多様性とプライマー要求性の相違

植物組織のホスホリラーゼおよび α -1,4グルカン合成酵素の初期の研究ではある特定の植物組織から1つの酵素のみが得られていたが、のちになって同一材料から性質を異にする複数の酵素 (isozyme) が得られる例が報告されるようになった。新たに発見された isozyme が興味をそそったのは、それらのうちのいくつかはプライマ

* 東北大学農学部 (980 仙台市堤通雨宮町 1-1)

ー無添加系で合成活性を示したからである。

このような isozyme の最初の例は Tsai and Nelson⁴⁾ がトウモロコシ種実中に発見したホスホリラーゼの isozyme であろう。すなわち、彼らはトウモロコシ種実の登熟に際して、ふつうに存在しているホスホリラーゼ (彼らはホスホリラーゼ I と称した) のほかに DEAE-セルロースカラムからの溶出位置が明らかに異なる別のホスホリラーゼ (ホスホリラーゼ II) が胚乳中出现することを認めた。このホスホリラーゼ II (P-II) は受粉後 12 日以降から現われ、澱粉の集積に平行して活性が増加し、澱粉合成が最大に達する 22 日後に最大活性を示し、以後澱粉の集積が衰えるにつれて活性が減少するという興味ある挙動を示すことから、ホスホリラーゼが澱粉合成酵素として機能する可能性を示唆する例としてしばしば取り上げられている。しかし、ここで注目したいことは、P-II がホスホリラーゼ I (P-I) と著しく異なるプライマー要求性を示すことである。すなわち、P-II は P-I がプライマーとして利用できないマルトースを利用しうるのみならず、プライマーを添加しない反応系でもアミロース様多糖を合成する能力を有している。このほか、P-II は一般的性質においても P-I とは顕著な違いが認められ、とくに Mg^{2+} (10 mM) や EDTA (2 mM) により特異的に活性化されることは後述の合成酵素 isozyme の類似の性質と比べて興味深い。翌年、彼らは前記 2 種のホスホリラーゼのほかに 2 種の isozyme (P-III および P-IV) を見出した⁵⁾。P-III は胚乳および胚芽に、P-IV は胚芽にのみ認められたが、両者ともプライマー無添加系で合成活性を示した。また、両 isozyme もともにマルトースを加えることにより反応が著しく促進されるから、マルトースをプライマーとして利用しうる活性を有していると思われる。

アルゼンチングループの Slabnik and Frydman はジャガイモ塊茎中に既知のホスホリラーゼと性質の異なるホスホリラーゼの存在することを認めた⁶⁾。この酵素はプライマー無添加系でグルコース-1-リン酸 (G-1-P) からアミロペクチン様多糖を合成するが、このプライマー無添加系での合成活性はふつうのホスホリラーゼよりはるかに耐熱性に乏しく、55°C、5 分間の加熱で完全に失活する。また、トウモロコシの酵素 P-II とは反対に Mg^{2+} により阻害される。彼女らの実験は粗酵素標品を用いたもので、プライマー無添加系で示された合成反応が真の意味での *de novo* 合成を意味するか否かは断定できない。彼女らも用いた酵素が 1 種の糖蛋白質でその糖部分がプライマーの役割を果たした可能性について否

定していない。

一方、糖ヌクレオチドを糖供与体とするいわゆる α -1,4 グルカン合成酵素に関しても、ハウレンソウ葉^{7,8)}、モチトウモロコシ種実⁹⁾、ジャガイモ塊茎¹⁰⁾などに ADP-glucose を供与体とする合成酵素のいくつかの isozyme が存在することが明らかにされた。ハウレンソウ葉からは 4 種の isozyme が DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによって分離され、そのうちの 1 つ (fraction III) がプライマー無添加系で合成活性を示した⁸⁾。この酵素活性は耐熱性に乏しく、44°C、15 分の加熱で完全に失活した。また、この酵素はプライマーに対する親和性でも他の isozyme と異なっており、アミロース、アミロペクチンおよびラット肝臓グリコーゲンに対しては他の 3 つの isozyme より高い親和性を示すが、カキグリコーゲンやアミロペクチン β -リミットデキストリンに対しては著しく親和性が低い。さらに、この酵素の示すプライマー無添加系での反応は高い塩濃度 (0.1 M EDTA, 0.5 M クエン酸ナトリウム等) により著しく (約 1000 倍) 促進され、また、牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) の添加 (0.05%) により、高濃度の塩のみを添加したときのおよそ 2 倍に促進された⁷⁾。

モチトウモロコシの未熟粒からは 2 つの合成酵素が分離され、そのうちの 1 つ transferase I がプライマー無添加系で合成反応を示した⁹⁾。この反応もハウレンソウ葉の酵素と同様、高濃度の塩 (0.5 M クエン酸塩, 1 M 酢酸塩) の存在下でのみ起り、BSA により著しく促進され、多くの点でハウレンソウ葉の酵素と類似している。注目すべきことは、両酵素 (ハウレンソウ葉およびモチトウモロコシ) とともにプライマー無添加系での活性が、同じ酵素によるアミロペクチン型多糖をプライマーとしたときの活性よりかなり高いことである。この両活性の比はハウレンソウ葉の酵素では 2~3 であるが、モチトウモロコシ種実の酵素では 8 である。しかし、ウサギ肝臓グリコーゲンをプライマーとして用いた場合は両活性はほぼ同じであった。ジャガイモ塊茎からは 3 つの合成酵素 isozyme が DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより分別され、そのいずれもがプライマー無添加系で合成反応を示したが、それらのうちもっとも強いプライマー無添加系での活性を示したのは fraction II であった¹⁰⁾。ジャガイモの酵素もプライマー無添加系での活性はハウレンソウ葉およびモチトウモロコシ種実の酵素と同様、高濃度の塩 (0.5 M クエン酸塩) と BSA の存在下で発現するが、その活性はアミロペクチン添加系で示される活性の半分ないしそれ以下にすぎない。

以上、いくつかの起源の異なるプライマー無添加系で合成活性を示す酵素が報告されたが、これらの酵素は次のような共通した性質を示している。

(1) どの酵素もプライマー無添加系での活性発現には 0.5 M クエン酸塩のような高濃度の塩と BSA を必要とする。

(2) 一般に、以前から知られた酵素より耐熱性に乏しい (ジャガイモの酵素については検討されていない)。

(3) これらの酵素の示すプライマー依存性の活性はこれまでに知られた酵素とプライマー要求性において異なっている。

これまで、いくつかのプライマー無添加系での澱粉系多糖の合成反応が報告されたが、いずれも実験に用いられた基質や酵素の純度に問題があったことが指摘されて否定されている。それにもかかわらず、この問題が再び取り上げられたのは、同じ起源から性質を異にするいくつかの澱粉系多糖の合成を行う酵素の isozyme が分離され、その多様性が示されたからであろう。このような多様性は多くの研究者に生成過程における各 isozyme 間の機能の分化を想起させ、ある種の isozyme の示すプライマー無添加系での反応を生成の初発機構と積極的に結びつけることが可能ではないかとの期待を抱かせたのではないだろうか。しかし、現在までのところ、このような期待は幻想の域を脱してはいないようである。

これら isozyme がプライマー無添加系で示す反応を生成の初発機構として位置づけるうえでの大きな難点の 1 つは、やはり酵素自身の純度であろう。酵素の一般的精製法は Cori らの時代と比べれば格段に進歩したとはいえ、これらの実験に用いられた酵素標品は、それ自身の有する内在性プライマーの存在を完全に否定できる程度にまで精製されているとは考えられない。もう 1 つの難点は、プライマー無添加系での活性が特殊な非生理的条件、高濃度の塩類や BSA のような特殊な蛋白質の存在、のもとにおいてのみ発現することであり、このような条件が生体内において成立することは考えられない。ただ、これらの isozyme がこれまでに知られた酵素とプライマー要求性が異なること、とくにある種の酵素が短鎖のプライマーに強い親和性を示すことは興味深い。このように合成酵素の isozyme の間でプライマー要求性が異なる例はコメの未熟粒* においても見出されており¹¹⁾、澱粉系多糖生成系において何らかの機能の分化

が行われている可能性を示唆するとも考えられ、今後の研究課題の 1 つであろう。

3. 初発反応における蛋白質の関与

Gahan and Conrad は *Aerobacter aerogenes* の対数増殖後期の菌体から得たグリコーゲン合成酵素がプライマー無添加系で ADP-glucose からグリコーゲンを合成することを認めた¹²⁾。この酵素は Triton X-100 により可溶化することができ、DEAE-セルロースクロマトグラフィーで単一ピークを示すまでに精製することに成功した。精製酵素によるプライマー無添加系での反応はきわめて緩慢であったが、分画過程で除去した 176,000 $\times g$ の上澄液中の蛋白質 (supernatant active protein, SAP) により著しく (数百倍) 活性化された。精製酵素および SAP にはいずれもグリコーゲンのような多糖は含まれていない。この SAP は活性は劣るが BSA により代替することが可能で、SAP と BSA とは相乗効果を示した。しかし、これらの蛋白質は加熱により活性化能は完全に失われた。また、きわめて微弱ではあるが、*A. aerogenes* 菌体のある種のリポ多糖 (lipid A) やある種の界面活性剤 (Triton X-100) も活性化能を示した。SAP 自身には合成過程で ADP-glucose から放射活性の取り込みが認められなかったので、Gahan らは SAP は ADP-glucose からのグルコシル残基の受容体となるのではなく、合成反応の activator として機能すると推定した。

activator としての機能を有する蛋白質は Chambost らによっても報告されている¹³⁾。彼らはグリコーゲン合成の初発機構を研究する材料として特殊な菌株を用いている。この菌株は Fraenkel¹⁴⁾ によって分離された *Escherichia coli* の一変異株で phosphoglucose isomerase と glucose-6-phosphate (G-6-P) dehydrogenase を欠損しているため、グルコースに生育することができず、グルコン酸塩で生育する特殊な菌株である。この菌はグリコーゲン合成に必要なすべての酵素系を具えているので、グルコン酸+グルコースの培地に生育させればグリコーゲンを合成することができる。この菌の合成酵素はグリコーゲンをプライマーとして ADP-glucose からの合成活性を有するが、反応系に BSA と高濃度の塩 (0.1 M EDTA, 0.5 M クエン酸塩) を添加すると、プライマー無添加系で合成活性を示した。この場合、高濃度の塩の代りに 158,000 $\times g$ の上澄液を加えても同様にプライマー無添加系での活性が発現した。この上澄液中の活性物質は耐熱性に乏しく、30% 硫酸飽和で沈殿するので、

* コメの未熟粒の酵素についてはプライマー無添加系での合成活性は検討されていない。

一種の蛋白質と考えられ Chambost らはこの物質を蛋白質因子 (protein factor) とよんでいる。すなわち、このプライマー無添加系での合成反応においては BSA は不可欠であるが、高濃度の塩と蛋白質因子とはたがいに代替しうることが大きな特徴である。彼らは高濃度の塩や蛋白質因子の役割について Hawker らがかつて指摘したように、酵素蛋白質の conformation に何らかの変化を与えるのではないかと想定している。

このようなそれ自身は酵素としての活性をもたないが、酵素の機能に重大な変化を与える蛋白質の例としては乳糖合成における α -ラクトアルブミンの例があげられる¹⁵⁾。すなわち、乳糖合成酵素は完全に精製すると乳糖を合成する機能を失い、UDP-galactose から *N*-アセチルグルコサミンにガラクトース残基を転移して *N*-アセチルラクトサミンを合成する活性のみを発現する。しかし、この精製酵素は、精製過程において除去されたそれ自身何らの酵素活性を示さない α -ラクトアルブミンと組み合わせると UDP-galactose からガラクトース残基をグルコースに転移して乳糖を合成する活性が発現する。グリコーゲン合成酵素における酵素と蛋白質因子との関係が、乳糖合成酵素における酵素と α -ラクトアルブミンの関係と同じか否かはわからないが、Chambost らの結果は前記の Gahan らの結果と同様、グリコーゲン合成酵素は基本的には1つの酵素で、これがある種の修飾を受けることによってプライマー無添加系での反応を示すことを示唆しており、細菌におけるグリコーゲン合成

の調節機構解明の1つの手掛りになるかもしれない。

activator としての機能とは別に、Krisman はグリコーゲン合成系における蛋白質の機能について興味ある事実を報告した¹⁶⁾。すなわち、彼女は部分的に精製したラット肝臓グリコーゲン合成酵素が、トリクロル酢酸 (TCA) 不溶の蛋白質様画分へ UDP-glucose からグルコース残基を転移する活性を示すことを認めた。この酵素は $(100,000 \sim 150,000) \times g$ の画分に顆粒酵素として得られ、0.1 M EDTA のような高濃度の塩の存在下で TCA 不溶画分へ UDP- ^{14}C -glucose から放射活性の取り込み活性を示した。反応系に少量のグリコーゲンを添加すると EDTA の有無に関係なく、グリコーゲンに放射活性が取り込まれた (Fig. 1)。TCA 不溶の生成物は界面活性剤、尿素などと処理してもまったく放射活性が遊離しないことから、単に糖が蛋白質に吸着したものではないことが証明された。この物質はアルカリには安定であるが、酸には不安定で 0.1 M HCl と 100°C、10 分処理することにより放射活性のおよそ 75% が TCA 可溶画分へ溶出した。この TCA 不溶性の生成物がグリコーゲン合成のプライマーとなりうるか否かを確かめるため、Krisman らは上記合成酵素標品 $[(100,000 \sim 150,000) \times g \text{ の pellet}]$ と UDP- ^{14}C -glucose とを用いて EDTA の存在下で反応させた生成物を Sephadex G-50 カラムで分画を行い、void volume に溶出した画分を EDTA を加えない条件でラベルしない UDP-glucose とラット肝臓から調製した分枝形成酵素と反応させた結果 (上記

Fig. 1. Incorporation of radioactivity from UDP- ^{14}C -glucose into the TCA-insoluble fraction in the absence of primer (A) and into the ethanol precipitate of the TCA-soluble fraction in the presence of added glycogen (B).¹⁷⁾

Open symbols represent the incorporation in the absence of NaEDTA and closed symbols represent the incorporation in the presence of NaEDTA.

Fig. 2. Diagrammatic representation of the pathways for the initiation of glycogen biosynthesis.¹⁷⁾

Glucose: ●, labelled; ○, unlabelled.

The labelled and unlabelled glucose molecules enclosed by a solid line each represent one glycogen molecule.

画分にはグリコーゲン合成酵素が含まれている), ラベルされたグリコーゲン様物質が得られることを確認した¹⁷⁾. この結果から, Krisman らはこの TCA 不溶の生成物がグリコーゲン合成のプライマーとして機能するものと考えた. さらに, UDP-glucose から蛋白質へグルコースを転移する酵素活性がいくつかの点で既知のグリコーゲン合成酵素活性と性質を異にすることから* 蛋白質への糖転移に関与する酵素を glycogen initiator synthase または UDP-glucose protein glucosyltransferase とよぶことを提案している. 彼女らは前記の TCA 不溶性の蛋白質複合体をプライマーとした際の最終反応生成物も TCA 処理により大部分不溶画分に回収されたことから, 最終生成物であるグリコーゲンも蛋白質と結合した状態で存在すると考え, Fig. 2 に示すような生成機構を想定した. この考えは Whelan により支持されている¹⁸⁾.

Krisman らはさらに *E. coli* のグリコーゲン合成系にもラット肝臓における類似の初発反応に関与する酵素の存在することを認めた¹⁹⁾. この酵素は多くの点でラッ

ト肝臓の酵素と類似しているが, グリコーゲン合成反応における本来の糖供与体である ADP-glucose からのみならず, UDP-glucose からも TCA 不溶画分への糖転移を行う. この場合, ADP-glucose からの活性と UDP-glucose からの活性の比は一定ではなく, 時により著しく変動した. 彼女らはこの両活性が果たして同一酵素に由来するか否かを知る目的でさらに詳細な検討を行った²⁰⁾. その結果, ADP-glucose からの転移活性と UDP-glucose からの転移活性は, 低温下での安定性に著しい違いが認められた. すなわち, *E. coli* の膜標品を 4°C でトルエン蒸気下に保持すると UDP-glucose protein transferase 活性は新鮮な状態では比較的活性が低いが, 時間の経過とともに漸増し, 6 日後に最大に達し, 以後緩やかに低下する. これに反し, ADP-glucose からの活性は新鮮時には高いが, 時間の経過とともに急速に低下した. この両活性が同じ酵素蛋白に由来するものか, または, 別個の酵素であるかは興味のもたれるところであろう. ある種の界面活性剤 (Brij-58) により UDP-glucose からの転移活性のみが阻害をうける事実はこの両活性が別個の酵素蛋白に基づくことを示唆しているようにも思えるが, この点は, 澱粉合成における顆粒酵素と同様現在なお不明というべきであろう.

* たとえば, 前記 EDTA の要求性のほかに蛋白質への転移反応の至適 pH はふつうのグリコーゲン合成酵素より高い pH (pH 9.0) を示した.

Fig. 3. Incorporation of radioactivity from UDP- $[^{14}\text{C}]$ -glucose into the TCA-insoluble fraction and the ethanol precipitate of the TCA-soluble fraction.²¹⁾

○, TCA-insoluble fraction; ●, TCA-soluble, ethanol-insoluble fraction.

Fig. 4. Pulse-labelling chase experiment.²¹⁾

Open symbols represent the radioactivity of the TCA-insoluble fraction and closed symbols indicate the radioactivity of the TCA-soluble, ethanol-insoluble fraction. ----, after chase; —, without chase.

Fig. 5. Schematic representation of the initiation process of glycogen biosynthesis in *Neurospora crassa*.

Takahara らは *N. crassa* の対数増殖後期の菌糸体から得た可溶性酵素標品が UDP-glucose から TCA-不溶画分へグルコース残基を転移する活性を示すことを認めた²¹⁾. この菌の protein glucosyltransferase はラット肝臓, *E. coli* などの酵素と異なり, 高濃度の塩も蛋白質因子もまったく必要としない. むしろ, ラット肝臓の酵素では不可欠であった 0.1 M EDTA の存在下では反応はまったく起らず, 10 mM の EDTA でもわずかながら (28%) 阻害された. また, Mn^{2+} , Mg^{2+} などの 2 価のイオンもまったく必要としない. この反応で得られた糖蛋白質複合体の性質はラット肝臓酵素による生成物とよく似ているが, グルカン部分は直鎖状でなく枝分れを有している. そして, この糖蛋白質を 0.1 M HCl と 10 分間, 100°C で処理して遊離されたグルカンは最終生成物であるグリコーゲンより低分子である. TCA-不溶画分への

転移は反応開始 15 分後には最大に達するが, その後減少する (Fig. 3). この結果は, TCA 不溶の糖-蛋白質複合体がグリコーゲン合成の中間体として機能していることを示唆している. pulse-chase 実験の結果でも TCA-不溶画分から TCA-可溶画分への放射活性の移行が明らかに認められた (Fig. 4). これは, TCA-不溶画分からグルカン部分がある大きさに達すると遊離してプライマーとして機能することを示している. Takahara らは *N. crassa* におけるグリコーゲン合成の機構を Fig. 5 に示すように推定している. *N. crassa* における蛋白質への転移反応は高濃度の塩などの非生理的条件を必要としない点で他の類似の反応と異なり, このような反応が生理的条件でも起りうることを示唆する貴重な例である.

さて, グリコーゲンの生合成において蛋白質の関与す

Fig. 6. Activity of UDP-glucose protein transglucosylase.²²⁾

Pr, proteic acceptor molecule; E, UDP-glucose protein transglucosylase I activity; E', G-1-P dependent UDP-glucose protein transglucosylase activity; O-O, glucosyl chains scarcely hydrolyzed β -amylase; $\bullet-\bullet$, glucosyl chains totally hydrolyzed by β -amylase.

る初発機構を示唆する報告があいまいで現われたが、当然植物における澱粉合成系にもこのような機構の存在が予想された。植物における蛋白質関与の初発機構について最初に報告したのはアルゼンチングループの Lavintman らである。彼女らはジャガイモ塊茎から得た顆粒性の酵素標品 [(25,000~140,000) $\times g$] がプライマー無添加系で UDP-glucose から特異的に TCA-不溶画分へグルコースを転移することを認めた²²⁾。この反応で特徴的なことはこの UDP-glucose protein glucosyltransferase の活性は基質である UDP-glucose の濃度により異なった様相を呈することである。すなわち、UDP-glucose が低濃度 (μM のオーダー) のときは蛋白質への糖残基の転移はきわめて短時間に行われ、生成した糖-蛋白質複合体の糖部分は比較的短鎖長のグルカンで β -アミラーゼによりわずかししか分解されない。一方、UDP-glucose 濃度が高いとき (mM のオーダー) は生成物の糖部分はより長鎖長で β -アミラーゼによりほぼ完全に分解される。しかし、UDP-glucose 濃度が低いときでも反応系に G-1-P を加えると生成物の糖部分は長鎖長で β -アミラーゼにより分解される。また、G-1-P 依存の転移酵素活性は Mn^{2+} (または Mg^{2+}) を要求し、かつ耐熱性に乏しく 45°C 、2 分間の加熱で失活する。このように G-1-P 非依存性の活性と依存性の活性は性質が異なるので、彼女らは両酵素活性は異なる酵素と考え、前者を UDP-glucose protein glucosyltransferase I とよんで区別している。この G-1-P 依存性酵素による反応において G-1-P が単に activator として機能しているのか、あるいは直接蛋白質への転移に関与しているのかは明らかでないが、後述のジャガイモ塊茎からの可溶性酵素が G-1-P から蛋白質へ糖を転移し、かつ Mn^{2+} を要求することを考えると、この場合も最初の蛋白質への糖転移が G-1-P から行われる可能性が当然考えられる。Lavintman らの推定したジャガイモ澱粉における澱粉合成機構は Fig. 6 に示すとおりであるが、彼女らは澱粉合成における UDP-glucose の役割を初発機構に

において積極的に位置づけることができると考えている。

Lavintman らはさらにジャガイモ塊茎の $140,000 \times g$ 上澄液から pH 7.0 で 50% 硫酸飽和で沈澱する画分に G-1-P から特異的に TCA-不溶画分へグルコシル残基を転移する活性を見出した²³⁾。この反応で生成した糖-蛋白質複合体の性質は Krisman がラット肝臓酵素により得た生成物の性質とよく似ている。すなわち、アルカリには安定であるが、酸には不安定で 2.5M H_2SO_4 と 30 分、 100°C で加熱することにより糖部分は完全に蛋白部分から解離した。アミラーゼ処理により糖部分の 75% 以上が解離するが、その際 β -アミラーゼやグルコアミラーゼなどのエキソ型アミラーゼと α -アミラーゼの間で糖部分の分解能に著しい差が認められないことから、この糖部分は枝分れの少ない直鎖に近いグルカンであると思われる。この反応系で特徴的なことは、 $[\text{U}^{14}\text{C}]$ -G-1-P を用いて反応させると TCA-不溶画分への取り込みは 60 分後に最大に達するが、以後は減少し、逆に TCA 可溶部への取り込みが増加する。このことは蛋白質上に形成された糖部分がある一定の大きさに達すると蛋白質から遊離し、この遊離した糖部分がプライマーとなってより高分子のグルカンが合成されることを示唆している。この結果はさきに述べた *N. crassa*²¹⁾ および *E. coli*²⁰⁾ の合成系において認められた結果と類似している。この G-1-P から蛋白質への転移反応のもう 1 つの特徴は前述の顆粒性の G-1-P 依存性酵素と同様 Mn^{2+} により強い影響を受けることである。この Mn^{2+} の効果は G-1-P の濃度により異なっている。G-1-P 濃度が 2mM 以下では Mn^{2+} はそれ自身の濃度と無関係に反応を阻害する。しかし、G-1-P 濃度が 2mM 以上では Mn^{2+} の効果は濃度により異なり、 Mn^{2+} 4mM では阻害的に作用し、 10mM では影響を現わず、 20mM の濃度では促進効果を示した。ジャガイモ塊茎においてはすでに Slabnik and Frydman によりプライマー無添加系で G-1-P から多糖を合成するホスホリラーゼの存在することが報告されている⁶⁾。今回の Krisman 一派の報告した可溶

性合成酵素が Slabnik らのホスホリラーゼと同一酵素であるか否かは明らかでないが、G-1-P から直接糖が転移されることは ADP-glucose や UDP-glucose からの糖転移が G-1-P 共存下においてのみ認められたことで明らかであろう。

澱粉系多糖生成の初発機構として蛋白質が糖の受容体となってプライマーが生成するという仮説は今まで説明されていなかった初発機構を説明するのにきわめて説得力があるように思われる。しかし、前記の反応において用いられた酵素はいずれも部分的に精製された標品であり、澱粉系多糖の *de novo* の合成の機構を完全に説明できるとはいえない。さらに、より大きな難点は前記の酵素の大部分が高濃度の塩のような非生理的条件を要求することであって、このことがこれらの反応が *in vivo* における *de novo* 合成を反映すると考えるうえでの大きな障害であろう。

なお、受容体となる蛋白質の本体については何の説明もされていないが、酵素自身である可能性も当然考えられる。たとえば、Krisman がプライマーとして用いた糖-蛋白質複合体には明らかに合成酵素活性が共存しており¹⁷⁾、また、Gahan ら¹²⁾ も酵素自身が受容体となる可能性を示唆している。もし、酵素自身が受容体として機能するのであれば、当然次節で述べる酵素の有する内在性プライマーとの関係が問題となろう。

4. 内在性プライマー

最初に述べたように、澱粉系多糖の合成に関与する酵素がプライマーの存在しない状態で合成を行うと結論するには、基質および酵素の純度についての厳密な検討が要求される。したがって、かなり高度に精製したと思われる酵素でプライマー不要の合成活性を示したと報告されたのが、あとになって非常にわずかではあるが基質または酵素中にプライマーとなる物質が混在していることが明らかにされた例も報告されている。たとえば、Illingworth らは精製したウサギ筋肉ホスホリラーゼを用いた合成系で、酵素および基質の濃度が高いときに、プライマーを添加しなくてもある時間の遅れ (lag time) ののちに合成反応が開始されることを見出し、この反応が *de novo* の合成であると考えたが²⁴⁾、その後、彼らの使用した基質のなかに微量ではあるが、プライマーとなりうる物質が混在していることが判明し、高度に精製した G-1-P を基質として用いると *de novo* 合成はまったく消失した²⁵⁾。Kamogawa らは結晶ジャガイモホスホリラーゼを用いた場合、高度に精製した G-1-P を

基質として用いても、ウサギ筋肉ホスホリラーゼで認められたプライマー無添加系での合成反応が依然として認められたが、結晶ホスホリラーゼをグルコアミラーゼで処理すると24時間にわたってプライマー無添加系での合成反応はまったく起らないことを確認した²⁶⁾。しかし、この場合も反応系にごく少量の α -アミラーゼを添加すると、みかけの *de novo* 合成が始まった。Kamogawa らは、ごく微量に残存していたプライマーの有効末端基濃度が増加したためと推定している。これらの結果は、明らかにかなり高度に精製されたホスホリラーゼにも内在性のプライマーが混在していることを示している。Kamogawa らによれば、結晶ホスホリラーゼ中の内在性プライマーの量はグルコース換算で $0.2 \sim 0.5 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白である。このような微量な内在性プライマーの存在でみかけの *de novo* 合成が起るという事実を考慮すると、さきに述べたプライマー無添加系での反応は再検討する必要がある。ホスホリラーゼや α -1,4 グルカン合成酵素の isozyme でプライマー無添加系で合成活性を示すとされたもののなかには、明らかに内在性プライマーの存在を否定できないものがある。たとえば、ハウレンソウ葉の合成酵素 isozyme⁸⁾ ではグルコース換算の糖含量が $1 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白以下であると報告されているが、Kamogawa らの結果からも明らかなようにこの程度の内在性プライマーの混在でもみかけの *de novo* 合成は当然起りうる。また、モチトウモロコシ種実の合成酵素 isozyme⁹⁾ についても単にヨード呈色を示す多糖は含まれていないと記載されているのみで、プライマー活性を示す糖の混在を否定する根拠にはならない。一方、ジャガイモ塊茎の合成酵素 isozyme については Kamogawa らがジャガイモホスホリラーゼについて行ったと同様の条件でグルコアミラーゼ処理を行ったのちもプライマー無添加系での合成活性が残存したと報告されている¹⁰⁾。また、前記ハウレンソウ葉の酵素についても同様の結果が報告された²⁷⁾。このように、グルコアミラーゼ処理を行ってもなおプライマー無添加系での合成活性が残存することは、これらの酵素が真の *de novo* 合成を行う活性を有すると考える以外に、グルコアミラーゼに抵抗性のプライマーが酵素に内在している可能性も考えられる。

ところで、プライマー無添加系での生成物はしばしばアミロペクチンのように枝分れを有することが認められており、このことは用いた酵素に分枝形成酵素が混在していることを示している。また、*Streptococcus mitis* のグリコーゲン合成酵素の示す内在性プライマーへの糖

転移反応が分枝形成酵素により著しく促進されることが報告されている²⁸⁾。Preiss グループの Hawker らは合成酵素がグルコアミラーゼ処理後、なお、プライマー無添加系での合成活性を示すのは合成酵素標品に枝分れ酵素活性が含まれているためであろうと考えた。彼らはホウレンソウ葉の分枝形成酵素活性が DEAE-セルロースクロマトグラフィーにより2つの画分に分かれ、その一方 (branching enzyme I) がプライマー無添加系で合成活性を示すとされた合成酵素 isozyme (α -glucan synthase III) と強固に結合して溶出されることを見出した²⁷⁾。この両活性はふつうのクロマトグラフィーでは分離せず、ADP-hexanolamine Sepharose 4B カラムによるアフィニティークロマトグラフィーでのみ分割できた。2つの分枝形成酵素の性質はたがいに類似しており、ともにプライマー無添加系での合成反応を著しく促進した。これらの結果から、Hawker らはこれまでに報告された合成酵素ないしはホスホリラーゼのプライマー無添加系の合成反応は合成酵素(またはホスホリラーゼ)、分枝形成酵素および内在性プライマーが強固に会合して complex を形成しているために起るみかけの *de novo* 合成であると推定した。Schiefer ら²⁹⁾ も sweet corn の合成酵素が高いイオン濃度で示すプライマー無添加系の合成が内在性のプライマーに基づくものと結論している。

Kawaguchi らはさらに Krisman グループが主張している澱粉系多糖合成の初発反応として糖ヌクレオチド(または G-1-P) から TCA-不溶の蛋白質へグルコース残基が転移されて蛋白質上にプライマーが形成されるという説にも批判を加えている。すなわち、彼らは *E. coli* の正常株およびグリコーゲン合成酵素活性の著しく低い(9%以下)変異株についてグリコーゲン合成反応を再検討して次のような結果を得た³⁰⁾。

(1) 変異株においてはプライマー依存性の合成酵素活性のみならず、プライマー無添加系での活性および TCA-不溶画分への転移活性も著しく低下している。

(2) 正常株、変異株ともプライマー無添加系での活性は 0.25 M クエン酸塩により、前者では6倍、後者では3倍に活性化されたが、TCA-不溶画分への転移活性はまったく活性化されない。

(3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動で均一な状態にまで精製された正常株のグリコーゲン合成酵素(分枝形成酵素活性を含まない)がプライマー無添加系での合成反応および TCA-不溶画分への転移活性を示し、しかも酵素濃度の高い状態(15 μ g/ml 以上)ではこの活性はク

エン酸塩の影響を受けない。

(4) プライマー無添加系での合成反応 および TCA-不溶画分への転移活性は分枝形成酵素により著しく促進された。

(5) 合成酵素を α -アミラーゼとグルコアミラーゼで処理するとプライマー無添加系での反応および TCA-不溶画分への転移活性は著しく低下した。また、熱失活させた合成酵素はグリコーゲン合成の有効なプライマーとして機能する。

(6) 精製した合成酵素によるプライマー無添加系での反応生成物と、生成物から TCA により沈澱させた画分とは分子量、ヨード複合体の吸光度において有意の差を示さない。また、TCA-不溶画分をプロテアーゼで処理しても可溶化しない。

これらの結果を基に、彼らはこれまでに報告された TCA-不溶画分へのグルコシル残基の転移はプライマー無添加系での合成反応と同様、酵素自身の含有する内在性プライマーによるものと主張している。したがって、Krisman グループが想定したようなグルコシル基の受容体となる特別の蛋白質および蛋白質への糖転移反応を特異的に行う酵素の存在も否定している。さらに、彼らは TCA-不溶画分についても前記(6)の結果からこの物質は糖蛋白質ではなく、単なる直鎖のグルカンで TCA による不溶化はアミロース様グルカン独特の老化現象によるものと考えている。また、彼らは Gahan らの主張したプライマー無添加系での反応を活性化する蛋白質性活性化因子の本体は分枝形成酵素ではないかと推察している。なお、クエン酸塩による活性化の機構については不明であるとしながらも、酵素の基質に対する K_m 値を大幅に低下させることを認めている。このクエン酸塩の機能については Schiefer らも同じ見解を述べている²⁹⁾。

内在性プライマーについては、かなり以前からその存在が指摘されているにもかかわらず、その本体についてはなお不明の点が多い。さきにも述べたように、ホウレンソウ葉やモチトウモロコシ種実の合成酵素のある種の isozyme ではアミロペクチンをプライマーとしたときの合成活性よりプライマー無添加系での合成活性のほうがかなり高いことが知られている^{8,9)}。このプライマー無添加系での反応が内在性プライマーによるものとすれば、内在性のプライマーのほうが最終生成物であるアミロペクチンよりも酵素に対し高い親和力を示すといえよう。これらの酵素のプライマー依存活性においても、プライマーとしての活性はグリコーゲンのほうがアミロペクチ

ンより優れているから、この場合内在性プライマーの構造はアミロペクチンよりむしろグリコーゲンに近いのかもしれない。このように、合成酵素のプライマーとして好適な構造がその酵素による合成の最終生成物の構造と必ずしも一致しないことは興味深い。

内在性のプライマーの存在形態については2つの考え方が可能であろう。1つは酵素と内在性プライマーとはたがいに独立した分子として存在し、両者が何らかの分子間力で強固に会合しているという考えであり、もう1つは、両者は共有結合によって化学的に結合しているという考え方である。後者の見地に立てば、内在性プライマーは酵素分子の構造の一部であると考えられる。この2つの可能性のどちらが正しいのかについては、現在のところ明確な証明はなされていない。Kamogawa らはみかけの *de novo* 合成を行うジャガイモホスホリラーゼ標品を加熱変性させたのち、エタノールで沈澱回収した画分には糖成分は検出されなかったと報告しており²⁶⁾、この結果は第1の可能性を示唆している。しかし、グルコアミラーゼで酵素を処理したあとも、微量の α -アミラーゼ処理によりみかけの *de novo* 合成が発現するという結果は第2の可能性を示唆するといえる。もし、内在性プライマーが酵素蛋白と化学的に結合していると仮定すれば、プライマーとして機能する糖部分は天然のグリコーゲンや澱粉のような高分子であるとは考えにくい*。事実、プライマー無添加系で合成活性を示したホウレンソウ葉⁸⁾ やモチトウモロコシ種実⁹⁾ の酵素はショ糖密度勾配により求めた分子量は 60,000~80,000 であり、ジャガイモ塊茎の同様な酵素¹⁰⁾ でも 90,000 程度で、アミロペクチンのような高分子の多糖が結合しているとは考えられない。合成酵素の *isozyme* のなかに比較的短鎖長のプライマーに強い親和力を示すものがあることを考えれば、糖部分は必ずしも長鎖長である必要はないのかもしれない。いずれにせよ、プライマー無添加系で起る合成反応が内在性プライマーによるものとすれば、この内在性プライマーの本体を明らかにすることが今後の大きな研究課題であろう。

5. おわりに一残された問題

1972年 Krisman が澱粉系多糖の *de novo* 合成の機構として提出した、糖ヌクレオチドからある種の蛋白質上にグルコース残基が転移されて1種の糖蛋白質が生成し、

その糖部分がプライマーとなって高分子の多糖が合成されるという仮説は、蛋白質への転移反応が多くの場合非生理的条件下でのみ行われるという難点をかかえているとはいえ、これまでまったくわかっていなかった澱粉系多糖生成の初発機構の解明に一筋の光明を投げかけたように思われた。しかし、Preiss らは彼らの最近の研究結果に基づいて、以前はなばなく報告された一連のプライマー不要の合成反応とともに蛋白質を仲介とする澱粉系多糖生成の初発反応も酵素自身の有する内在性プライマーによるものと結論している。彼らの研究はもっぱら *E. coli* の合成系について行われたものであり、他の類似の反応をすべて内在性プライマーに起因すると断定するのは早計かもしれないが、もし Preiss らの主張に普遍性が認められるなら、Krisman らが長年にわたって主張してきた説も“まぼろしの初発機構”に終わってしまうであろうし、澱粉系多糖生成の初発機構に関する研究も再び振り出しに戻らざるをえないであろう。たしかに、これまでに報告された初発機構に関する研究の大部分が顆粒性もしくは部分的に精製された酵素を用いたものであり、その限りにおいては Preiss らの批判は率直に受け入れざるをえないであろう。しかし、これらの初発反応がすべて“みかけの *de novo* 合成”で内在性のプライマーに起因するとしても、“内在性のプライマーはどのようにしてできるのか”という問題は依然として解決されない。内在性のプライマーが酵素分子の構造の一部であると考えれば、問題はいくらか簡単であるかもしれない。しかし、これまでに報告された澱粉系多糖の合成に関与する酵素（合成酵素もしくはホスホリラーゼ）のすべてが Preiss の報告した *E. coli* の合成酵素と同程度の糖を常に含有しているとは考えられない。たとえば、*N. crassa* の高度に精製したグリコーゲン合成酵素は検出しうる量の糖は含有しておらず、もちろんプライマー無添加系での合成活性はまったく示さない²¹⁾。

このような問いに答えるためには、Krisman らの仮説は、問題はあるにせよ、きわめて魅力的である。この仮説に対する Preiss らの批判は前節に述べたが、彼らの批判はまったく反論の余地のないものであろうか。蛋白質への転移を行う酵素が既知のプライマー依存の合成酵素と異なる酵素であることの根拠としては、蛋白質への転移反応がプライマー依存の合成反応と異なった条件下で行われることが挙げられる。すなわち、至適 pH などの一般条件のほか、多くの場合前者の反応は高濃度の塩などの特殊な条件を要求する。このことは、一面この反応が生理的条件下で起ると主張するうえで大きな

* 澱粉粒と固く結合している澱粉の顆粒性合成酵素のような場合はどう考えるか、難しい問題であるが、この場合澱粉は生成物と考えるべきであろう。

障害となっているが、他面この反応に関与する酵素が既知の酵素と異なることの証拠とも考えられる。Preiss らは彼らの得たプライマー無添加系での生成物と、この生成物から TCA で沈澱する画分とが分子量において大きな差を示さないこと、およびこの TCA-不溶画分をプロテアーゼと処理しても可溶化されないことから、この TCA-不溶生成物は単なるグルカンであって糖蛋白質ではないと述べているが、*N. crassa* のプライマー無添加系での反応生成物では TCA-不溶画分の糖部分は明らかに TCA-可溶の生成物より低い分子量を有することが認められている。また、*E. coli* 以外の合成系ではこの TCA-不溶の生成物はプロテアーゼ処理により可溶化することが認められている。さらに、*N. crassa* のプライマー無添加系での合成反応では pulse-chase 実験の結果、TCA-不溶画分から TCA-可溶画分への放射活性の移行が認められ、糖-蛋白質複合体がグリコーゲン合成の初発機構において中間体として機能していることが必ずしも空想ではないことを示している。もう 1 つの見逃せない重要な事実、この TCA-不溶の糖-蛋白質複合体における糖と蛋白質の間の結合がふつうのグリコシド結合と比べてはるかに酸に敏感なことである。このような結合の性質は G-1-P におけるようなリン酸基を介する結合を想起させるが、もし蛋白質への糖転移反応が酵素の内在性プライマーによるものなら、酵素分子の構造の一部として糖がこのような特異な結合で酵素蛋白質と結合していることになる。しかし、このような事実は現在までまったく報告されていない。

澱粉系多糖生合成の初発反応生成物においてグルコース残基がリン酸基を介して蛋白質に結合しているなら、当然このような転移反応はふつうの糖転移酵素による反応と異なるはずで、たとえば、糖-リピド複合体の関与も想像される。このような糖-リピド中間体の存在はセルロース生合成系においてその存在が示唆されているが³¹⁾、澱粉系多糖の生合成系においてはこのようなリピド中間体の存在はいまだ証明されていない。いずれにせよ、Krisman らの仮説を実証するためには、中間体と目される糖-蛋白質複合体の本体およびその生成機構を明らかにすることが急務であろう。

文 献

- 1) R. KORNFELD and D. H. BROWN: *J. Biol. Chem.*, **238**, 1064 (1962).
- 2) H. DRUCKER: *J. Bacteriol.*, **110**, 1041 (1972).
- 3) 福井俊郎:「澱粉科学ハンドブック」, 朝倉書店, p. 82 (1977).
- 4) C. Y. TSAI and O. E. NELSON: *Plant Physiol.*, **43**, 103 (1968).
- 5) C. Y. TSAI and O. E. NELSON: *Plant Physiol.*, **44**, 159 (1969).
- 6) E. SLABNIK and R. B. FRYDMAN: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 709 (1970).
- 7) J. L. OZBUN, J. S. HAWKER and J. PREISS: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 631 (1970).
- 8) J. L. OZBUN, J. S. HAWKER and J. PREISS: *Biochem. J.*, **126**, 953 (1972).
- 9) J. L. OZBUN, J. S. HAWKER and J. PREISS: *Plant Physiol.*, **48**, 765 (1971).
- 10) J. S. HAWKER, J. L. OZBUN and J. PREISS: *Phytochemistry*, **11**, 1287 (1972).
- 11) Y. TANAKA and T. AKAZAWA: *Plant Cell Physiol.*, **12**, 493 (1971).
- 12) L. C. GAHAN and H. E. CONRAD: *Biochemistry*, **11**, 3979 (1968).
- 13) J. P. CHAMBOST, A. FLAVARD and J. CATTANÉO: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 132 (1973).
- 14) D. G. FRAENKEL: *J. Bacteriol.*, **95**, 1267 (1968).
- 15) K. BREW, T. C. VANAMAN and R. L. HILL: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **59**, 491 (1968).
- 16) C. R. KRISMAN: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1206 (1972).
- 17) C. R. KRISMAN and R. BARENGO: *Eur. J. Biochem.*, **52**, 117 (1975).
- 18) W. J. WHELAN: *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 13 (1976).
- 19) R. BARENGO, M. FLAVIA and C. R. KRISMAN: *FEBS Letters*, **53**, 274 (1975).
- 20) R. BARENGO and C. R. KRISMAN: *Biochim. Biophys. Acta*, **540**, 190 (1978).
- 21) H. TAKAHARA and K. MATSUDA: *J. Biochem.*, **81**, 1587 (1976).
- 22) N. LAVINTMAN, J. TANDECARZ, M. CARCELLER, S. MEIDIARA and C. E. CARDINI: *Eur. J. Biochem.*, **50**, 145 (1974).
- 23) J. TANDECARZ, N. LAVINTMAN and C. E. CARDINI: *Biochim. Biophys. Acta*, **399**, 345 (1975).
- 24) B. ILLINGWORTH, D. H. BROWN and C. F. CORI: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 469 (1961).
- 25) M. ABDULLAH, E. H. FISCHER, M. Y. QURESHI, K. N. SLESSOR and W. J. WHELAN: *Biochem. J.*, **97**, 9P (1965).
- 26) A. KAMOGAWA, T. FUKUI and Z. NIKUNI: *J. Biochem.*, **63**, 361 (1968).
- 27) J. S. HAWKER, J. L. OZBUN, H. OZAKI, E. GREENBERG and J. PREISS: *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 530 (1974).
- 28) G. J. WALKER and J. E. BUILDER: *Eur. J. Biochem.*, **20**, 14 (1971).

-
- 29) S. SCHIEFER, E. Y. C. LEE and W. J. WHELAN: 385(1978).
Carbohydr. Res., **61**, 239(1978).
- 30) K. KAWAGUCHI, J. FOX, E. HOLMES, C. BOYER and J. PREISS: *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 31) H. E. HOPP, P. A. ROMERO, G. R. DALEO and R. D. LEZICA: *Eur. J. Biochem.*, **84**, 561(1978).