ホスホリラーゼ——構造と機能

福井俊郎, 中野憲一*

酵素タンパク質のアミノ酸配列が次々と解明され、そして20年程前からはX線結晶解析による三次元構造の研究が始まったが、当然のごとくそれらは比較的分子量の小さい酵素タンパク質においてであった。それが最近ではサブユニット分子量10万の領域にまで至ったのである。そしてジャガイモ、ウサギ筋肉、大腸菌というまったく異なった材料起源の酵素について詳細な構造比較が行なわれ、分子進化の問題も提起されている。

酵素タンパク質における構造と機能の関連性は、生化学にとって基本的で重要な問題である。この問題が多くくの生化学者によって取り上げられるようになって久しい。その間に、タンパク質の一次および高次構造解析法の著しい進歩を基盤にして、この問題に対する理解は驚くほどに発展した。ヘモグロビン、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、種々のプロテアーゼなどの機能は、目で見えるように細部まで理解されるようになってきた。しかしながら、これらのよく研究された酵素タンパク質を眺めると、いずれも分子量の比較的小さいものであり、その機能も比較的単純なものである。生物界には、より複雑な機能をもつ大きな分子量のタンパク質が多いが、それら巨大なタンパク質の構造解析には計り知れぬ多くの困難がつきまとうため、研究は大幅に遅れていた。

サブユニット分子量10万というホスホリラーゼの構造研究にも多くの問題があったが、ここ数年の間にそれらの大部分が克服され、この酵素タンパク質の機能に対する構造的根拠の理解がまた一段と深められることになった。ここでは、ホスホリラーゼの化学的研究のあらましを、筆者らの最も新しい研究を中心にして解説する。なお、より専門的な知見については、他の総説⁽¹⁻¹⁰⁾およびそれらに引用されている原著論文を参照していただきたい。

起源の異なるホスホリラーゼ

ホスホリラーゼ (EC 2.4.1.1) は、 α -1,4-グルカン鎖を非還元性末端から順次加リン酸分解して α -グルコース-1-リン酸 (G1P) をつくる酵素であるが、反応が可逆的であるために、G1P から高分子量の α -1,4-グルカン鎖を合成することもできる。動物臓器の中でホスホリラーゼの含量が高い筋肉と肝臓の細胞内では、G1P の濃度に比べて無機オルトリン酸 (P_i) の濃度が高いので、この酵素は生理的にはもっぱらグリコーゲン分解の方向に働いている。一方、高等植物でも、種子、塊茎、塊根などに多量に含まれているが、その生理的役割については動物の場合ほど明らかではない。微生物にも、ホスホリラーゼの存在する例が多く知られている。大腸菌では、マルトースを炭素源にして培養した時に誘導的に生成される。

筋肉のホスホリラーゼが複雑な調節性をもつことは古くから知られていたが、筋肉中において、この酵素は活性な *a* 型と不活性な *b* 型として存在する。*b* 型酵素は、ホスホリラーゼキナーゼによって特定の Ser がリン酸化されると *a* 型酵素に転換し、ホスホリラーゼホスファターゼによって脱リン酸化されると、もとの *b* 型酵素にもどる。一方で、*b* 型酵素は AMP が結合すると、*a* 型酵素と同程度の活性を示す。筋肉ホスホリラーゼに見いだされたこのような二重の調節性は、タンパク質の機能調節に関する2つの基礎概念、すなわち、共有結合的な調節と非共有結合的 (=アロ

* Toshio FUKUI, Kenichi NAKANO, 大阪大学産業科学研究所

表 1 異なった起源のホスホリラーゼの調節性とグルカン特異性の比較

酵素起源	調節性		グルカン特異性			
	リン酸化	AMP	良	好	不	良
ウサギ筋肉	+	+	グリコーゲン アミロペクチン		アミロース マルトデキストリン	
ジャガイモ	-	(-)	アミロペクチン アミロース マルトデキストリン		グリコーゲン	
大腸菌	-	(±)	マルトデキストリン		グリコーゲン アミロペクチン	

() は結論が不明確であることを意味する。

ステリック) な調節を生み出すのに役立った。

しかしながら、このような二重の調節性は必ずしも、すべての起源のホスホリラーゼに当てはまるものではない(表 1)。ジャガイモやトウモロコシのような高等植物組織から精製されたホスホリラーゼは、常に活性型として存在し、AMP によって活性化されないし、リン酸化-脱リン酸化を受けることもない。また、大腸菌のホスホリラーゼも、リン酸化-脱リン酸化を受けることがない。大腸菌のホスホリラーゼに AMP を加えると、比活性が数倍上昇するといわれたことがあったが、最近では、むしろ AMP による活性化はないものとみられている。

一方、基質グルカンに対する特異性も、ホスホリラーゼの起源によって大きく異なっている(表 1)。ウサギ筋肉ホスホリラーゼは、グリコーゲンやアミロペクチンのような枝分かれをもつ α -グルカンの良い基質にするが、直鎖のアミロースやマルトデキストリンにはうまく働かない。それに対して、ジャガイモのホスホリラーゼは、アミロペクチン(グリコーゲンよりも末端の直鎖部分が長い)、アミロース、マルトデキストリンなどをほぼ同程度の良い基質とするが、グリコーゲンに対する親和性は非常に低い。大腸菌のホスホリラーゼはもっぱら、直鎖で枝の短いマルトデキストリンを良い基質にする。

しかしながら、ホスホリラーゼは、起源がちがっても、その分子的な性質はよく似ている。いずれのホスホリラーゼも、分子量約 10 万のサブユニットから成るダイマーまたはテトラマーとして

存在し、サブユニット当たり 1 個のピリドキサルリン酸 (PLP) を結合している。この PLP はホスホリラーゼの活性にとって必須であり、酵素タンパク質からこれを除くと、酵素の活性は失くってしまう(最近、タピオカとバナナの葉のホスホリラーゼは PLP を含まないという報告が出されているが、筆者らの最近の実験結果からすると、それらの報告は誤りである可能性が高い)。PLP は、アミノ酸代謝に関連する多くの酵素の補酵素として、その機能が明らかにされているが、ホスホリラーゼにおけるその機能はまったく異なっており、直接的な役割については最近まで未解決の謎とされていた。

一 次 構 造

ウサギ筋肉ホスホリラーゼの全一次構造は、長い年月の困難な研究の結果、1977 年に米国ワシントン大学の Titani ら⁽¹¹⁾によって見事に完成された。1 個のサブユニットは、アセチル基によってブロックされた Ser から始まる 841 残基のアミノ酸から成るポリペプチド鎖で形成されており、分子量は 97,412 と計算された。酵素的リン酸化を受ける部位は、アミノ末端に近い Ser-14 であり、PLP は Lys-679 の ϵ -アミノ基に結合している。この酵素はサブユニット当たり 9 個の Cys を含むが、いずれも SH 型であり、分子内および分子間に S-S 結合は存在しない。

一方、筆者ら⁽¹²⁾は 1984 年末までに、ジャガイモのホスホリラーゼの全一次構造決定を完了した。全アミノ酸残基数は 916 であり、分子量は 103,916 と計算された。これまでに、分子量 10 万を越すタンパク質で、タンパク質化学的手法によって全アミノ酸配列順序が決定されたものは数種に過ぎない。幸いにして、ジャガイモのホスホリラーゼはその仲間入りをしたわけである。最近、西ドイツの Palm ら⁽¹³⁾は、大腸菌のホスホリラーゼの遺伝子構造を解析し、その結果からアミノ末端側 658 残基のアミノ酸配列順序を推定した。この研究は未完成であって、カルボキシ末端側の構造は発表されていない。

図 1 にこれら 3 種の起源のホスホリラーゼにつ

```

      20              40              60              80              100
r  SRPLSDQEKRRQISVRGLAGVENVTELKKDFDRHLHFTLVKNNRVATPRDYFFAHALTVRDHLVGRWIRTQOHHYKDPKRIYYLSLQFYMGRTLQNTMV
p  TLSEKIHHPITEQGGSDSLSSFAPDAASITSSIKYHAEFTPVFSPERFELPKAFFATAQSVRDSLLINWATYDIYEKLNHKQAYYLSMEFLQGRALLNAIG
e  SQPIFNQKQFQEALSRQWQRYGLNSAAEMTPRQWWLA----VSEALAEMLRAPFAKPVANQRHVNYISMEFLIGRLTGNLL

      120              140              160              180              200
r  NLALENACDEADYQLGLDMEELEEIEDAGLNGGGLRLAACFLDSMATGLAAYGYGIRYEFGLFNQKICGGWQMEADDWLRGYNPWEKARPEFTLPV
p  NLELTGAFALKNLGHLENVASQEPDAALNGGGLRLASCFLDSLATLNYPAMGYGLRYKYGLFKQRITKDGQEEVAEDWLEIGSPMEVVRNDVSYPI
e  NLGHWYQVQSLSKAYDINLTDLLEETDPALNGGGLRLAACFLDSMATVGGSATGYGLNYQYGLFRQSFVDGKQVEAPDDWHRSNYPWFHRNEALDVQV

      220              240              260              280              300
r  HFYGRVEHTSOGAK--WVDTVQVLLAMPYDTPVPGYRNNVNTMLWSAKAPN--DFNLKDFNVGGYIQAVLDORNLAENISRVLYPNDNFFEGKELRLKQEYFVV
p  KFYGVSTGSDGKRYNIGGEDIKAVAYDVPYIPGYKTRTISLRLWSTQVPSADFSLAFNAGEHTKACEAQANAEEKICYILYPGDESEEGKTLRLKQQTLC
e  GIGGKVTK--DGR--WEPEFTITGQANTLPVVGVRNGVAQPLRLWQATHAH--PFDLTKFMDGDFLRAEQQGINAEKLTCLVLPNDNHTAGKLLRLIQYFQC

      320              340              360              380              400
r  AATLQDIRRFKSSKFGCRDPVRTNFDAFPDKVATQLNDTHPSLAPELMRVLVDLERLDWKAMEVTVTKTCAYTNTHTVLPPEALERWPHVHLETLPRHLQ
p  SASLQDIISRFFERRSGDR----IKWEEFPEKVAVQNDHTHTLCLPELMRLIDLKGKLNWHEAWNITQRTVAYTNTHTVLPPEALEKWSYELMOKLLPRHVE
e  ACSVADTIRRH--HLAGR-----ELNELADYEVIQLNDHTHTIAPELLRVLIDEHQHSWDDAWAITSKTFAYTNTHTVLPPEALERWDKLVKGLLPRHMQ

      410              420
r  IIYEINQRFNLRV-----
p  IIEAIDEELVHEIVLKYGMDLNKLEELTMTIRILENFDLPSSVAELFIKPEISVDDDTETVEVHDKVEASDKVVTNDEDDTGKTSVKIEAAAEKDI
e  IINEINTRFKTLV-----EKTWPGD

      440              460              480              500
r  VDRLRRMSLVEEGAVKRINMAHLICAGSHAVNGVARIHSEILKKTIFKDFYELEPHKFNKNTNGITPRRMLVLCNPGLAEL
p  DKKTVPSPPEAVIPPKVRMANLCVVGGAHVNGVAEIHSEIVKKEEVFNDFYELNPEKFNKNTNGVTPRRWIRFCNPPLSA
e  EKVWAKLAVHD---KQVHMANLCVVGGAHVNGVAALHSDLVKDLFPEYHQLWPKFHNVTNGITPRRWIKQCNPALAA

      520              540              560              580              600
r  IIAERIG--EYISDLQRLKLLSYVDDEAFIRDVAKVKQENKLFKAAYLEREYKVHINPNSLFDVQVKRIHEYKQRLNCLHVTLYNRICK----EPNKFVVR
p  IITKWTGTEOWVLKTEKLAELQKFAHEDLQNEWREAKRSNKIKVVSFLKEKTGYSVVPDAHFDIQVKRIHEYKQRLNIFGIVVRYKKMKHEATAERKTNFVPR
e  LLDKSLQ--KEWANDLQILNLVLADDKAFKRDLYRVIKHANKVRLAEFVKVRTGIDINPQAFIDIQIKRLHEYKQRLNLLRLILALYKEIRQ----NPQADRVP

      620              640              660              680              700
r  TVHIGGKAAPGYHMAKMIKILITAIGDVVNHDPVVGDRLRVIFLENYRVSLEAKVIPAADLSEQISTAGTEASGTGNMFMNLGALTIGTMDGANVEHAE
p  VCIFGGKAFATVYQAKRIVKFITDVGATINHDPETIGDLLKVVFPDYNVSAELLIPASDLSEHISTAGHEASGTSNMFKAHNGCIQIGTLDGANVEIRE
e  VFLFGAKAAPGYLAKNIIFAINKVADVINNDPLVGDKLVVFLPDYCVSAEKLIPAADISEQISTAGKEASGTGNMKLALDGALTIGTLD

      720              740              760              780              800
r  EAGEENFFIFGMVRVEDVDRDLQRGYNAQEYYDRIPELRQIEQLSSGFFSPKQPDLFKDQIVNMLMH--DRFKVFADYEEYVKCQERVSALYKNPREWTRMV
p  EVGEENFFLFGQAHEIAGLRKERADGKFPVDERFEVKEFVR--SGAFGSYNYDDLIGSLEGNEGFGRADYFLVGKDFPSYIECQEKVDEAYRDQKRNTTMS

      820              840
r  IRNIATSGKFSSDRTIAQYAREIWGVEPSRQRLPAPDEKIP
p  ILNTAGSYKFSSDRTIHEYAKDIWHIEAVEIA

```

図 1 異なった起源のホスホリラーゼの一次構造比較

r : ウサギ筋肉⁽¹¹⁾, p : ジャガイモ⁽¹²⁾, e : 大腸菌⁽¹³⁾. 番号はウサギ筋肉酵素の一次構造に基づく. アミノ酸は一字省略符号で示した. 太字は同じアミノ酸を示す.

A=Ala, C=Cys, D=Asp, E=Glu, F=Phe, G=Gly, H=His, I=Ile, K=Lys, L=Leu, M=Met, N=Asn, P=Pro, Q=Gln, R=Arg, S=Ser, T=Thr, V=Val, W=Trp, Y=Tyr

いて、一次構造を比較する。比較は構造類似性に従い、できる限り少ない数の欠失と挿入しか加えないようにした。その結果をみると、ウサギ筋肉酵素とジャガイモ酵素のポリペプチド鎖の間では、アミノ末端とカルボキシ末端がほぼ揃っており、大した長さの差異はみられなかった。しかしながら、ジャガイモ酵素のポリペプチド鎖の中央付近には多数の余分なアミノ酸の配列があり、78

残基から成る大きな挿入を加えることになった。ウサギ筋肉酵素とジャガイモ酵素との間には、サブユニット分子量において約 8,000 の差があることが知られていたが、この差は今回ポリペプチド鎖の中央部に見いだされた大きな挿入によって説明されるようになった。

ウサギ筋肉、ジャガイモおよび大腸菌のホスホリラーゼに関するこのような比較に基づく、3

図 2 異なった起源のホスホリラーゼの構造類似性
数字はそれぞれの酵素間の同じアミノ酸の割合を示す。中央の数字は3種の酵素間での割合、()内の数字は残基番号1~692の比較を示す。ジャガイモウサギ筋肉間の類似性は、アミノおよびカルボキシ末端部分と78残基の大きな挿入部分を除くと、43%になる。

種のホスホリラーゼの間では半数に近いアミノ酸残基が一致する(図2)。さらに、性質の類似するアミノ酸の間での置換も加えると、構造類似性はこれよりもずっと高くなる。このような構造類似性が存在するだろうことは、すでに、ジャガイモ酵素のアミノ酸組成⁽¹⁴⁾および Cys 含有ペプチドの構造解析⁽¹⁵⁾の結果から予想していたが、今回明確に実証できたわけである。

大きく起源と性質の異なった3種のホスホリラーゼの間で、このように高い一次構造的な類似性があるということは、これらのホスホリラーゼが1つの共通な祖先タンパク質から進化してきたことを示唆している。現在みられる調節タンパク質の中には、明らかに触媒サブユニットと調節サブユニットとの融合によってできたと思われるもの(例. cGMP 依存性タンパク質キナーゼ, Ca^{2+} 依存性プロテアーゼなど)もあるが、ホスホリラーゼの場合には、これらの例とは異なり、昔から1本の長い(分子量約10万の)ポリペプチド鎖から進化してきたものと想像される。

高次構造

ウサギ筋肉ホスホリラーゼのX線結晶解析による立体構造の解明も、ここ数年の間に急速に進められた。英国のオクスフォード大学ではb型酵素・IMP複合体の結晶が、カナダのアルバータ大学(最近では米国のカリフォルニア大学サンフランシスコ分校に受け継がれている)ではa型酵素・グルコース複合体の結晶が解析され、現在までに2Å分解能程度まで精密化されつつあ

る^(1,3,6)。その結果、ポリペプチド鎖の折れたたみは無論のこと、各アミノ酸残基の側鎖の位置まで、ほぼ決定されることになった(ただし、現在解析されているこれらの酵素・リガンド複合体は、いずれも不活性なT型酵素であって、活性なR型酵素の解析はまだ行われていないことを指摘しておかなければならない)。

一方、ジャガイモのホスホリラーゼのX線結晶解析は、残念ながら、これまでの種々の試みにかかわらず、あまり進んでいない。したがって、直接的にその立体構造について議論することはできない。しかしながら、幸いにも、ウサギ筋肉酵素との間に高い一次構造類似性があることがわかったので、その類似性の程度から判断して、これらのホスホリラーゼのポリペプチド鎖はいずれも同様な折れたたみをもつものと考えことにした。そこで、ジャガイモ酵素の一次構造をウサギ筋肉酵素の立体構造の対応する部分に当てはめた(図3)。

ウサギ筋肉ホスホリラーゼの1つのサブユニットは、2つのほぼ同じ大きさのドメインからできていて、それぞれのドメインには、中心にβシートから成る芯の部分があり、その周囲をαヘリックスの層が取り巻いている。ウサギ筋肉酵素とジャガイモ酵素との間の一次構造比較(図1)に際して、合計8つの挿入と欠失を加えたが、それらはすべてサブユニットの表面またはサブユニットとサブユニットとの接触面に存在しており、基本骨格を作っているβシートの中には見られなかった(図3)。また、中心部のアミノ酸残基は非常によく保存されていて、2/3以上のアミノ酸が同一である。特に、補酵素PLPを含む分子中央部にある活性部位は、ほとんど完全に保存されている。さらに、カルボキシ末端側560~710番が形成しているジスキレオチド結合折れたたみ("Rossmann fold")の部分も高い類似性を示し、58%のアミノ酸が同一である。それに反して、分子周辺に存在するαヘリックスやコイルの部分の保存性は低く、性質の異なる側鎖のアミノ酸に置換されている例も多くみられる。

2つのドメインのつなぎ目には、先に述べた

図 3 ウサギ筋肉ホスホリラーゼとジャガイモホスホリラーゼの立体構造上での比較

ウサギ筋肉酵素の立体構造概念図⁽⁹⁾にジャガイモ酵素の一次構造⁽¹²⁾を当てはめて、類似性の高い部分を黒く塗った。P: リン酸化部位, AMP: AMP 結合部位, PLP: ビリドキサルリン酸, Glc: グルコース結合部位 (基質 G1P も同じ場所に結合する), I: 阻害剤結合部位, (Glc)_n: グルカン貯蔵部位, N: アミノ末端, c: カルボキシ末端. 数字は挿入または欠失の場所と残基数を意味している。

78 残基から成る大きな挿入がみられる。この挿入部分はきわめて特徴的な一次構造をもち、その他の部分の構造とは大きく異なっている。すなわち、この挿入部分には Asp, Glu, Lys を主とする解離性アミノ酸残基が多く、この部分全体の半数近くを占めている。それに対して、別の解離性アミノ酸である Arg, および芳香族アミノ酸はきわめて少ない。また、同じアミノ酸が 2~3 個続いてクラスターを作っているのも目につく。二次構造の予測をすると、この部分はすべて α -ヘリックスを作っており、1つの独立した突出部分になっていると考えられる。

先に筆者らの研究室では、ジャガイモのホスホ

リラーゼにプロテアーゼを作用させると、ポリペプチド鎖の中央部付近で優先的に限定分解が起こるが、この限定分解を受けても、酵素活性にはほとんど変化がないことを報告していた⁽¹⁶⁾。今度の研究で、この限定分解を受ける部分がちょうどこの突出部分にあることがわかった。ウサギ筋肉ホスホリラーゼでは、この部分にグリコーゲン貯蔵部位が存在している。グリコーゲン貯蔵部位の機能とジャガイモ酵素にみられる突出部分との関係については、別の章で述べることにする。

調節部位/リン酸化とアロステリック調節

ホスホリラーゼキナーゼによってリン酸化を受

ける Ser 周辺のアミノ酸配列順序は、種々の動物の骨格筋およびウサギ肝臓のホスホリラーゼにおいて、非常によく似ている (図 4)。ホスホリラーゼキナーゼの基質特異性を決定するといわれている残基 (Ser-14 の前にある Lys と Arg のクラスターおよび後にある Arg) は、種々の動物ホスホリラーゼにおいてよく保存されており、これらのホスホリラーゼはいずれもウサギ筋肉から精製されたホスホリラーゼキナーゼによってよくリン酸化を受ける。それに対して、酵素的リン酸化を受けないジャガイモと大腸菌のホスホリラーゼでは、この付近の一次構造がまったく異なっている (図 4) ^(13,17)。ただ、ジャガイモのホスホリラーゼには、酵母ホスホリラーゼのリン酸化部位にある程度の類似性をもつ部分が存在する。この部分にある Ser が、酵母のホスホリラーゼキナーゼによってリン酸化を受けるかもしれない。

ウサギ筋肉ホスホリラーゼにおいて、AMP 結合部位はリン酸化部位の近くで、サブユニット-サブユニット間の接触領域 (図 3 では上部に相当する) に存在する。ウサギ筋肉、ジャガイモ、大腸菌のホスホリラーゼにおいて、AMP 結合部位を構成するアミノ酸はほとんど保存されていない ⁽¹⁷⁾。Shimomura と Fukui ⁽¹⁸⁾ は、ウサギ筋肉ホスホリラーゼが AMP と結合した時にみられる円二色性変化を解析して、AMP のアデニン環と芳香族アミノ酸残基の側鎖との間にスタッキング相互作用が起こることを示唆した。その後の化学修飾と X 線結晶解析の結果から、このスタッキン

グ相互作用を起こすのは Tyr-75 と決定された ^(1,3)。その Tyr-75 は、ジャガイモと大腸菌のホスホリラーゼでそれぞれ Glu と Pro に置換している。また、ウサギ筋肉酵素で AMP の 2'-OH と水素結合するといわれている Asn-44 と Gln-71 は、他のホスホリラーゼではいずれも他のアミノ酸に置換されている。AMP のリン酸基とイオン結合する Arg-242 と Arg-308 のうち、Arg-242 は保存されているが、Arg-308 のほうはジャガイモ酵素と大腸菌酵素でいずれも Ile に置換している。これらの結果からみて、ジャガイモと大腸菌のホスホリラーゼには、AMP 結合部位は存在しないものと思われる。この結論は、両ホスホリラーゼが AMP によって活性化を受けないという事実と一致する。

ウサギ筋肉ホスホリラーゼがリン酸化または AMP の結合によって活性化される時に、どのような構造変化が起こるかは、興味深い問題であるが、先にも述べたように、現在 X 線結晶解析の行なわれているホスホリラーゼはいずれも不活性型であるために、まだ十分な結論が得られていない。今後、活性型としてのみ存在するジャガイモまたは大腸菌のホスホリラーゼの立体構造との比較が進むと、この問題も解決されてくることだろう。

グリコーゲン貯蔵部位/グルカン基質特異性

ウサギ筋肉ホスホリラーゼの X 線結晶解析の結果から、基質グルカンは、PLP 部位から 25~30

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
rm	Ac-Ser-Arg-Pro-Leu-Ser-Asp-Gln-Glu-Lys-Arg-Lys-Gln-Ile-Ser-Val-Arg-Gly-Leu-Ala-Gly-Val-Glu-Asn-Val-																							
d	Ac-Ser-Lys-Pro-Lys-Ser-Asp-Met-Glu-Arg-Arg-Lys-Gln-Ile-Ser-Val-Arg-Gly-Leu-																							
r					Ser-Asp-Gln-Asp-Lys-Arg-Lys-Gln-Ile-Ser-Val-Arg-Gly-Leu-																			
h																								
rl																								
p	Thr-Leu-Ser-Glu-Lys-Ile-His-His-Pro-Ile-Thr-Glu-Gln-Gly-Gly-Glu-Ser-Asp-Leu-Ser-Ser-Phe-Ala-Pro-Asp-Ala-																							
y																								
e																								

図 4 異なった起源のホスホリラーゼのリン酸化部位とアミノ末端部分の一次構造比較

rm: ウサギ筋肉, d: ツノザメ筋肉, r: ネズミ筋肉, h: ヒト筋肉, rl: ウサギ肝臓, p: ジャガイモ, y: 酵母, e: 大腸菌。番号はウサギ筋肉酵素の一次構造に基づく。(P) はリン酸化部位を示す。

Å 離れた別の部位に結合する という奇妙な結果が得られた^(1,3)。このグルカンが結合する部位は、“グリコーゲン貯蔵部位”と名づけられた。グリコーゲンのような分枝の多いグルカンは一旦この部位で固定され、その後で、末端鎖の1つが PLP 部位へ入り、そこで触媒反応を受けるものと説明された。このように、活性部位とは別の部位にグリコーゲンが結合するという事は、先にグリコーゲン合成酵素についていわれたことがあったが、ウサギ筋肉ホスホリラーゼについて初めて実証されたわけである。ともあれ、この考えによって、ウサギ筋肉ホスホリラーゼが、分枝の多いグリコーゲンを良い基質にするが、直鎖のグルカンにはうまく働かないという事実をうまく説明できたわけである。

それでは、直鎖のグルカンも良い基質にすることのできるジャガイモのホスホリラーゼの場合には、どうなっているのだろうか。Shimomura と Fukui⁽¹⁹⁾ は先に、PLP 部位をブロックしたホスホリラーゼとブロックしないホスホリラーゼについて、種々のグルカンの親和性を比較した。その結果から、ジャガイモ酵素には、ウサギ筋肉酵素にみられるようなグルカン貯蔵部位は存在せず、基質グルカンは直接的に PLP 部位に結合することが示された。この結論は、ジャガイモのホスホリラーゼがアミロース、アミロペクチン、マルトデキストリンをすべて良い基質にするというジャガイモ酵素のグルカン基質特異性とよく一致した。

ジャガイモのホスホリラーゼにおいて、グリコーゲン貯蔵部位に相当する部分には、先に述べたように大きな突出部分が余分に結合している。この突出部分の大きさは、コンパクトな球状タンパク質と仮定すると、直径 20~25 Å となり、シトクロム c に匹敵するほどの大きさになる。これでは、とうてい、この部分にグルカンを結合させることはできない。

ジャガイモのホスホリラーゼには、PLP 部位から少し離れた分子表面にシクロデキストリンを結合する部位がある⁽¹⁹⁾。この部位にシクロデキストリンが結合すると、PLP 部位へのグルカンの

結合が邪魔されて、酵素活性が阻害される。ウサギ筋肉ホスホリラーゼには、このようなシクロデキストリンの阻害作用がみられない。その代わりに、この付近にアロステリックな阻害剤結合部位が存在する^(1,3)。この部位にはカフェインやアデノシンのようなスクレオシド型化合物が結合して、阻害作用をひき起こす。ジャガイモホスホリラーゼとウサギ筋肉ホスホリラーゼの構造比較(図3)をみると、PLP 部位に続くクレバスの入口付近に、類似性の非常に低い部位が存在する。このような構造上の相違が、両ホスホリラーゼの阻害剤に対する性質の差異につながるのかもしれない。

活性部位/触媒反応機構

すでに指摘したように、ウサギ筋肉、ジャガイモ、大腸菌のホスホリラーゼにおいて、助酵素 PLP の結合する部位およびその周辺の構造は非常によく保存されている。類似性をもう少し微細に検討してみよう。PLP の 4-アルデヒド基が Schiff 塩基結合する Lys-679 の周辺の一次構造はほぼ一致している⁽²⁰⁾。また、bis(5'-pyridoxal) diphosphate による親和標識から見つけられた Lys-573、およびその周辺の一次構造もよく保存されている^(21,22)。さらに、PLP の 5'-リン酸基に続く部位で、基質 G1P の結合に関与する Leu-139, Asn-282, His-376, Val-454, Asn-483 などよく保存されている。その他、触媒作用に関係するといわれている Asp-338, Glu-671, His-570, Asp-283 などすべて保存されている。このように、3種のホスホリラーゼにおいて、活性部位の構造がほぼ完全に保存されているということは、これらの酵素がすべて反応速度論的に共通な反応機構、すなわち、“rapid equilibrium random BiBi”に従うという事実とよく一致する。

それでは、ホスホリラーゼの触媒反応において、PLP はどのような役割をするのだろうか。この問題について、最近になり、筆者らの研究室では、PLP の 5'-リン酸基と基質 G1P のリン酸基とをピロリン酸結合させた化合物、すなわち pyridoxal (5') diphospho- α -D-glucose (PLDP-Glc)

図 5 ホスホリラーゼ反応機構におけるピリドキサルリン酸の役割⁽²⁴⁾

詳細な機構の説明は本文参照。

をアポホスホリラーゼに結合させて、それにグルカンを加えると、ホスホリラーゼの本来の触媒反応とまったく同じグルコシル基転移が起こることを見いだした⁽²³⁾。PLDP-Glc を用いた反応は、もとの反応に比べて速度は小さいが、反応様式のみならず、反応速度論およびエネルギー論的にも、きわめてよく類似している⁽²⁴⁾。これらの結果から、ホスホリラーゼの触媒反応において、PLP の 5'-リン酸基と基質のリン酸基との間の直接的な相互作用が重要であることは明らかである。

筆者らは、この反応系についてカナダの Madson のグループと ³¹P-NMR に関する共同研究を行ない、その結果から、ホスホリラーゼの活性状態では、PLP の 5'-リン酸基が周辺の正電荷と強く相互作用することにより歪みを受け、リン原子が分極により正に帯電して G1P のリン酸基から電子を引き寄せて、グリコシド結合を不安定化するという機構を提出した (図 5)^(23~25)。これに対して、西ドイツの Helmreich のグループでは、ホスホリラーゼの反応もグリコシダーゼの反応と同じように、一般酸塩基触媒機構に従うものと考え、PLP の 5'-リン酸基を一般酸にみている⁽²⁶⁾。この場合には、PLP の 5'-リン酸基から G1P の

リン酸基へプロトンが1つ移動するということになる。現在のところ、いずれの機構が正しいかについて決定的な証拠は得られていないが、いずれにせよ、ホスホリラーゼの反応で、PLP の 5'-リン酸基が直接的に基質リン酸基と相互作用して触媒作用していることは、筆者らの研究から明白である。このような PLP の触媒作用は、従来よく研究されてきたアミノ酸代謝関連のビタミン B₆ 依存性酵素の機構とはまったく異なっており、新しい型の酵素反応である⁽⁹⁾。

*

以上のようにして、筆者らが十数年前にホスホリラーゼの研究を開始した折に取り上げた2つの課題、すなわち、(1) 活性調節をもつ動物ホスホリラーゼは、活性調節をもたない植物ホスホリラーゼと、構造的にどのように違っているのか、(2) ホスホリラーゼの反応において、PLP はどのような直接的な役割をしているのか、については、かなりの成果を得ることができた。さらに、当初には考えていなかった問題、すなわち、(3) ホスホリラーゼの間にみられるグルカン特異性の差異にはどのような構造的根拠があるのか、という問題に対しても確実な証拠を得ることができた。

残る問題として、ホスホリラーゼの触媒反応機構の細部を明らかにする必要がある。この点について筆者らの研究室でも研究が進行中であるが、決定的な証拠を得るまでにはなお多くの困難が予想される。また、ジャガイモのホスホリラーゼの X線結晶解析については、西ドイツの Bühner が研究中であり、早い時期での成果を期待したい。また、初めにも述べたように、高等植物におけるホスホリラーゼの生理学的意義については不明な点が多い。この問題については、緑葉のホスホリラーゼに関する研究から、解明の糸口がつかめるかもしれない。緑葉中には、少なくとも2種のホスホリラーゼアイソザイムが存在しており、特にグルカンに高い親和性をもつ分子種は、通常デンプンが存在していない細胞質(または液胞)中に分布している⁽²⁷⁾。機能的にも多くの特徴をもつこの酵素の構造研究も今後望まれる課題である。

筆者らの研究室におけるホスホリラーゼの研究には、下村正二博士をはじめ多くの共同研究者の努力が加わった。また、研究費の一部は文部省科学研究費補助金から得た。記して感謝の意を表したい。

文 献

- 1) R. J. Fletterick & N. B. Madsen : *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 31 (1980).
- 2) 福井俊郎 : 蛋白質 核酸 酵素, **26**, 46 (1981).
- 3) J. A. Jenkins, L. N. Johnson, D. I. Stuart, E. A. Stura, K. S. Wilson & G. Zanotti : *Philos. Trans. Roy. Soc. London*, **B 293**, 23 (1981).
- 4) 福井俊郎, 中野憲一 : 蛋白質 核酸 酵素, **27**, 1779 (1982).
- 5) T. Fukui, S. Shimomura & K. Nakano : *Mol. Cell. Biochem.*, **42**, 129 (1982).
- 6) R. J. Fletterick & S. R. Sprang : *Acc. Chem. Res.*, **15**, 361 (1982).
- 7) T. Fukui, M. Tagaya, M. Takagi & S. Shimomura : "Chemical and Biological Aspects of Vitamin B₆ Catalysis", Part A, Alan R. Liss, Inc., 1984, p. 161.
- 8) K. Nakano, Y. Kikumoto & T. Fukui : "Chemical and Biological Aspects of Vitamin B₆ Catalysis", Part A, Alan R. Liss, Inc., 1984, p. 171.
- 9) 福井俊郎 : "酵素——バイオテクノロジーへの指針", II, 朝倉書店, 1985, p. 65.
- 10) S. Shimomura & T. Fukui : *Mem. Inst. Sci. Ind. Res., Osaka Univ.*, **42**, 13 (1985).
- 11) K. Titani, A. Koide, J. Hermann, L. H. Ericsson, S. Kumar, R. D. Wade, K. A. Walsh, H. Neurath & E. H. Fischer : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4762 (1977).
- 12) K. Nakano & T. Fukui : submitted for publication in *J. Biol. Chem.*
- 13) D. Palm, R. Goerl, K. J. Burger, M. Böhner, M. Schwartz : "Chemical and Biological Aspects of Vitamin B₆ Catalysis", Part A, Alan R. Liss, Inc., 1984, p. 209.
- 14) A. Kamogawa, T. Fukui & Z. Nikuni : *J. Biochem.*, **63**, 361 (1968).
- 15) K. Nakano, T. Fukui & H. Matsubara : *J. Biochem.*, **87**, 919 (1980).
- 16) S. Iwata & T. Fukui : *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 58 (1975).
- 17) K. Nakano, T. Fukui & H. Matsubara : *J. Biol. Chem.*, **255**, 9255 (1980).
- 18) S. Shimomura & T. Fukui : *Biochemistry*, **15**, 4438 (1976).
- 19) S. Shimomura & T. Fukui : *Biochemistry*, **19**, 2287 (1980).
- 20) K. Nakano, S. Wakabayashi, T. Hase, H. Matsubara & T. Fukui : *J. Biochem.*, **83**, 1085 (1978).
- 21) S. Shimomura, K. Nakano & T. Fukui : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 462 (1978).
- 22) M. Tagaya, K. Nakano, S. Shimomura & T. Fukui : *J. Biochem.*, **91**, 599 (1982).
- 23) M. Takagi, T. Fukui & S. Shimomura : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3716 (1982).
- 24) M. Tagaya & T. Fukui : *J. Biol. Chem.*, **259**, 4860 (1984).
- 25) S. G. Withers, N. B. Madsen, B. D. Sykes, M. Takagi, S. Shimomura & T. Fukui : *J. Biol. Chem.*, **256**, 10759 (1981).
- 26) H. W. Klein, M. J. Im, D. Palm & E. J. M. Helmreich : *Biochemistry*, **23**, 5853 (1984).
- 27) T. Fukui : "The New Frontiers in Plant Biochemistry", ed. by T. Akazawa, T. Asahi and H. Imaseki, Japan Scientific Societies Press, 1982, p. 71.

プロフィール

荒井 綜一 (Soichi Arai) 昭和10年10月29日生<略歴>昭和34年東京大学農学部農芸化学科卒業/同年森永製菓(株)入社/42年東京大学農学部助手/53年同助教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>食品タンパク質の酵素による改質。医療用食素材としてのペプチドの開発。コメ中の活性タンパク質, 特にシステイン・プロティナーゼ・インヒビター<趣味>スポーツ一般, 宝塚歌劇

安斎 寛 (Hiroshi Anzai) 昭和31年3月6日生<略歴>昭和53年日本大学農獣医学部水産学科卒業/55年同大学院農学研究科修士課程修了/同年東北大学大学院研究生/59年同大学院博士課程中退/同年日本大学農獣医学部水産学科助手, 現在にいたる<研究テーマと抱負>海産無脊椎動物のセロロース分解機構<趣味>SF 小説, アニメーション

ン

池上 司郎 (Shiro Ikegami) 昭和21年5月8日生<略歴>昭和45年東京大学文学部心理学科卒業/50年同大学大学院人文科学研究科博士課程修了/同年三菱化成生命科学研究所研究員/55年医学博士(東京大学医学部)/58年同研究所主任研究員, 現在にいたる<研究テーマと抱負>記憶・学習の神経機構とそれに関与する神経伝達物質<趣味>クラシック音楽, カメラ, 旅行

石川 榮治 (Eiji Ishikawa) Vol.14, No.11, p.702 参照

石川 統 (Hajime Ishikawa) 昭和15年12月8日生<略歴>昭和38年東京大学理学部生物学科卒業/43年同大学院修了(理博)/同年米国オレゴン州立

大学リサーチ・アソシエイト/46年東京大学教養学部基礎科学科助手/52年同生物学教室助教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>細胞内共生の分子生物学。何はともあれ, 他人とは違うことをやるのを身上と心得ています<趣味>和製ミステリーの乱読, ビールの鯨飲

岩井 譲 (Yuzuru Iwai) 昭和15年9月26日生<略歴>昭和39年東北大学農学部農芸化学科卒業/同年第一製菓(株)研究員/50年北里研究所技師/55年東京理科大学薬学部非常勤講師/58年北里研究所副部長/60年同部長, 現在にいたる。農博(東北大学)<研究テーマと抱負>微生物の生産する生物活性物質の探索, 放線菌の分類, 微生物の限らない能力を信じたい<趣味>スポーツ全般, 現在専らテニス