

我々がたどった道：ホスホリラーゼから始めて

福井俊郎（ふくい としお）

1953年に私は大阪大学理学部化学科を卒業した。Watson - Crick が DNA の二重らせんモデルを発表した年である。敗戦から8年、わが国の社会は大学を含めてまだひどい混乱期にあった。私はデンプンを看板とする研究室で育ったが、デンプンはグルコースから成る枝分かれをもつ複雑な巨大分子で、食品として重要であっても生物学的な機能をもたない。私の興味は徐々にデンプンに働く酵素の方に移って行った。

1. 一次構造^{1,2}

α -グルカン ホスホリラーゼは、グリコーゲンやデンプンのような α -グルカンを加リン酸分解して、 α -グルコース 1-リン酸を生成する酵素である。哺乳動物の筋肉では、活性なリン酸化型と不活性な脱リン酸化型の2種で存在するが、植物組織にはリン酸化されない活性型だけが存在する。筋肉ホスホリラーゼは典型的な調節酵素として、1950年頃から活発に研究されていた。

我々のホスホリラーゼ研究は、動物酵素と植物酵素の酵素学的な特性を比較することによって、酵素の調節性に関する理解を深めようとして始まった。1960年後半のことであったが、それだけでは酵素の本質的なところまで到達できそうになかった。米国ワシントン大学で、ウサギ筋肉酵素の全一次構造決定が進められているという情報に刺激されて、1976年頃から我々はジャガイモ塊茎酵素の一次構造の研究を始めた。蛋白質の構造研究にまったく経験がなかったので、当初は大阪大学理学部松原グループの全面的な協力を得た。当時は蛋白質一次構造決定の自動化はまだ進んでいなくて、蛋白質の部分加水分解物から単離したペプチドを、試験管内でEdman分解して、生じたPTH-アミノ酸を1個ずつTLCで同定する手法が一般的であった。

ほとんど無謀であったと思うが、中野らによる10年近くの努力が実って、ジャガイモ塊茎ホスホリラーゼの全一次構造(916残基)の決定が完成した。この結果は、調節性の異なる2種のホスホリ

ラーゼの構造比較を可能にただけでなく、分子量が10万を越す巨大な蛋白質の全一次構造を、化学的手法によって決定した希少な例としても評価された。

動物と植物のホスホリラーゼの一次構造を比較すると、全体としてかなり高い類似性が認められたが、筋肉酵素のアミノ末端に近いリン酸化部位の構造はジャガイモ酵素では全く異なっていて、両酵素の調節性の差を裏付けることが出来た。また、ジャガイモ酵素のポリペプチド鎖の中央部分に、78残基から成る特徴的な挿入配列が見つかった。同じ頃に、ウサギ筋肉ホスホリラーゼの6Å分解能での立体構造が、カナダのアルバータ大学グループによって決定された。その結果に今回の一次構造比較を当てはめると、ジャガイモ酵素の巨大な挿入配列は、ウサギ筋肉酵素の活性部位クレバスの入口付近にあつて、基質グルカンを優先的に結合する“グリコーゲン貯蔵部位”を被うように見えた。

筋肉酵素では、枝分れが多いグリコーゲン分子は、一つの枝が“グリコーゲン貯蔵部位”に優先的に結合して、他の枝がそこから離れた触媒部位で反応を受けるものと考えられていた。それに対して、ジャガイモ酵素では、“グリコーゲン貯蔵部位”が巨大な挿入部分によって被われているため、グルカン分子はここに結合しなくて、直接に触媒部位で反応を受けると考えられる。直鎖のグルカン分子は、筋肉酵素でこのようなまたがった結合が出来ないために良い基質になれない。それに対

して、植物酵素ではグルカン分子が直接に活性部位に入り、触媒反応を受けるようである。

2. 分子生物学的手法^{3,4}

1980年頃から、分子生物学的な手法を蛋白質科学に取り入れることが、一般的になって来た。高等植物の組織には、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いる。我々は、これまで研究してきたL型アイソザイムと、もう一つのH型アイソザイムをコードする2種のcDNAをジャガイモ塊茎から単離して、それぞれのヌクレオチド配列を決定した。L型アイソザイムには、アミロプラストへのシグナル・ペプチドと考えられる、アミノ末端の伸長配列(50残基)があったが、それを除いた成熟蛋白質部分916残基の配列は、先の化学的構造決定の結果と完全に一致した。

ジャガイモ塊茎の2つのアイソザイムの一次構造はよく類似していたが、先にL型アイソザイムに見つけたポリペプチドの中央部分の挿入配列は、H型アイソザイムには見当たらず、H型アイソザイムの構造は、むしろウサギ筋肉酵素の構造に類似していた。H型アイソザイムのグルカン分子に対する高親和性は、筋肉酵素と同じような“グリコーゲン貯蔵部位”の存在に起因するものと推定された。

そのことを確かめるために、L型アイソザイムの“グリコーゲン貯蔵部位”に相当する領域を、H型アイソザイムあるいはウサギ筋肉酵素の相当する領域で置換したキメラ酵素を作製して、それらのグルカン分子に対する親和性を比較した。作製したキメラ酵素では、すべてのグルカン分子に対する親和性が予想通りに大きく上昇していた。このようにして、この挿入部分がL型アイソザイムのグルカン親和性を支配していることを確かめることができた。

3. 補酵素の役割⁵⁻⁷

すべての α -グルカンホスホリラーゼには、起源によらず、ピリドキサル5'-リン酸を共有結合している。この化合物は、アミノ酸代謝に関連する酵素の間では広く存在していて、触媒作用に直

接的に関与するが、ホスホリラーゼは例外的な存在であった。ある教科書では「酵素学上の興味ある謎」として取り上げられていて、この謎を解くための研究が広く行われていた。

下村らはピリドキサル5'-リン酸の種々の誘導体を合成して、ウサギ筋肉ホスホリラーゼから調製したアポ酵素との結合性を調べていたが、ピリドキサル5'-二リン酸-5'-ピリドキサルが、2つのLys残基にまたがって結合することを見出した。一つの残基はもともとピリドキサル5'-リン酸が結合していた残基で、もう一つの残基はLys574と同定できた。このLys残基は、ジャガイモ酵素にも保存されていた。

多くのアミノ酸代謝関連酵素では、ピリドキサル5'-リン酸のアルデヒド基に基質アミノ酸が結合して触媒反応が起こる。それに対して、ホスホリラーゼでは、結合ピリドキサル5'-リン酸のアルデヒド基ではなくて、5'-リン酸基が必須である。我々は、ピリドキサル5'-リン酸と α -グルコース1-リン酸とがピロリン酸結合で縮合した化合物である、ピリドキサル5'-二リン酸- α -グルコースを合成して、アポ酵素に再構成させた。この再構成酵素にグリコーゲンを加えると、触媒反応が起こって、合成化合物のグルコース残基がグリコーゲンに転移することを見出した。

この発見は、補酵素ピリドキサル5'-リン酸のリン酸基と基質 α -グルコース1-リン酸のリン酸基が、直接的に相互作用することによって、触媒反応が起こるとする仮説に対する直接的な証拠となった。X線結晶解析から決められたホスホリラーゼの立体構造では、結合ピリドキサル5'-リン酸のリン酸基と基質のリン酸基との距離は7~8Åであったが、これは酵素の不活性状態での結果であって、活性状態ではもっと近づいて相互作用が起こるのだろう。

4. 親和標識⁸⁻¹⁰

ピリドキサル5'-リン酸は蛋白質のリン残基の一般的な修飾剤としても用いられてきた。多賀谷は、ピリドキサル5'-リン酸のリン酸基にピロリン酸結合で基質を結合させることによ

て、基質結合部位に特異的な新しい親和標識剤をつくることを考案した。それを試すために、UDP - グルコースを基質とする筋肉グリコーゲン合成酵素を用いた。合成した新しい標識剤である UDP - ピリドキサル (図 1) は、筋肉酵素の基質結合部位に特異的に結合して、そこにある Lys574 を修飾することが明らかになった。

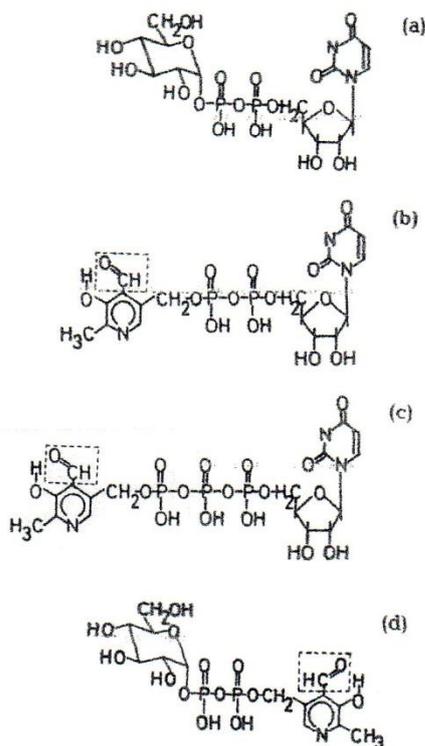


図 1. UDP - グルコース (a)、UDP - ピリドキサル (b)、UTP - ピリドキサル (c)、ピリドキサル ニリン酸 - グルコース (d) の化学構造

この成功に刺激されて、ウリジンの代わりにアデノシンまたはグアノシンをもち、さらにリン酸基の数が異なる修飾剤を合成した。これらの新しい親和標識剤は、アデニル酸キナーゼ、ATP 合成酵素、ホスホリラーゼ キナーゼ、アミノ酸 - tRNA 合成酵素、*ras* 遺伝子産物 p21 などを含む、多くの蛋白質に適用されて、それぞれの基質結合部位に存在するリシン残基を同定することが出来た。その多くは“Gly-リッチ領域”に含まれるものであっ

たが、“Gly-リッチ領域”に含まれる Lys 残基の反応性は、標識剤のリン酸基の数にあまり関係なかった。反応する Lys 残基がフレキシブルな“Gly-リッチ領域”に含まれていると、位置がかなり自由になるからであろう。親和標識によって同定された Lys 残基は、次に別のアミノ酸に置換されて、その役割が検討された。

5. 親和標識と変異導入の組合せ^{11~13}

大腸菌グリコーゲン合成酵素は ADP - グルコースを基質とする。大腸菌酵素を ADP - ニリン酸ピリドキサルと反応させたところ、Lys - Thr - Gly - Gly 中にある Lys15 が標識された。大腸菌酵素と筋肉酵素 (UDP - グルコースを基質とする) との間には一次構造類似性がない。それにも関わらず、筋肉酵素で標識された Lys574 は、Lys - Val - Gly - Gly という類似した Gly リッチな配列の中にあっ

た。大腸菌酵素の Lys15 を Arg に置換すると、基質に対する ADP - グルコースに対する K_m はあまり変わらなかったが、Gln または Glu に置換すると K_m は 30~40 倍大きくなった。 k_{cat} はいずれもかなり下がったが、置換した残基の電荷とは関係なかった。これらの結果は Lys15 が基質とのイオン結合に関係していて、触媒反応には必須でないことを示している。さらに、Lys15 周辺の Gly 残基を 1 個ずつ Ala に置換すると、いずれでも k_{cat} が大きく下がった。これらの Gly 残基は活性部位領域の構造変化を助けるのだろう。

さらに、Lys15 を Gln に置換した大腸菌変異酵素を ADP - ニリン酸ピリドキサルと反応させると、新しく Lys277 が標識されることが分った。この Lys 残基を Gln に置換すると、ADP - グルコースに対する K_m は余り変わらないのに、ほとんど完全に失活した。このように、親和標識と変異導入を組み合わせることによって、酵素反応についての有用な知見が得られた。

6. “比較親和標識法”^{14~16}

我々が考案した親和標識剤では、親和基の種類と反応基との距離を任意に変えることが出来る。UDP - グルコース ピロホスホリラーゼは、UDP -

グルコースを加ピロリン酸分解する酵素である。ジャガイモ塊茎酵素に UDP - ピリドキサルまたは UTP - ピリドキサル (図 1) を作用させると、急速な失活が起こった。完全な失活は酵素モル当たり約 1 モルの試薬の結合に対応していたが、5 個の異なるリシン残基が標識された。このように多数の Lys 残基が同時に標識されるという結果は、UDP - グルコース ピロホスホリラーゼと共に、アミノ酸 tRNA 合成酵素のような基質が多くのリン酸基をもつ酵素の場合に見られた。

ピリドキサル ニリン酸グルコース (図 1) は、先の 2 つの標識剤と比べると、反応性ピリドキシル基がピロリン酸基を挟んで逆の位置にある。この標識剤も先と同じ 5 個の Lys 残基を標識したが、それぞれの Lys 残基が標識される度合いは、先の 2 つの標識剤の場合と明らかに異なっていた。標識剤の構造の違いから来るこれらの差違は、それぞれの Lys 残基の ϵ - アミノ基と標識剤の反応基との距離を反映するものと想定して、活性部位におけるこれら 5 個の Lys 残基の位置を推定した (図 2)。

さらに、これら 5 個の Lys 残基をそれぞれ別個に Gln に置換した酵素を作成し、それぞれの性質を調べたが、それらの結果はこの仮想的なモデルによって、ほぼ矛盾なしに説明できた。また、

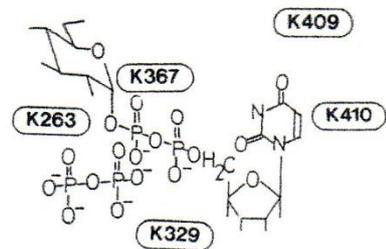


図 2. ジャガイモ塊茎 UDP - グルコースピロホスホリラーゼに結合する基質周辺にある 5 個のリシン残基の可能な配置。“比較親和標識法”に基づいて作成した仮想的なモデル

大阪大学蛋白質研究所楠木グループとの共同研究で得られた、本酵素の立体構造ともよく一致した。蛋白質がもつ分子認識能の高さを裏付けるものであろう。

今から 50 年ほど前に、蛋白質に全く素人であった我々が始めたホスホリラーゼに関する研究が、その後どのような道をたどったか、私が停年退官した 1995 年までをまとめてみた。長年にわたる多くの共同研究者及びこれを発表する機会を与えられた日本蛋白質科学会に感謝する。大阪大学時代の同級生であり、蛋白工学会の発足に際して中心的な役割を果たした次田 皓君にこの小文を捧げたい。



中野憲一・下村正二



良き先輩（濱口、池中）・同輩（松原）・後輩（高木）



研究室メンバー（1992年頃）

文献

1. Nakano, K. and Fukui, T. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9230-9236.
2. 福井俊郎, 中野憲一 (1986) *化学と生物* 23, 357-365.
3. Mori, H., Tanizawa, K., and Fukui, T. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 5574-5581.
4. Mori, H., Tanizawa, K., and Fukui, T. (1993) *Protein Sci.* 2, 1621-1629.
5. Shimomura, S. and Fukui, T. (1978) *Biochemistry* 17, 5359-5367
6. Takagi, M., Shimomura, S., and Fukui, T. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3716-3719.
7. 福井俊郎 (1983) *生化学* 54, 444-447.
8. Tagaya, M. and Fukui, T. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 6670-6676.
9. Tagaya, M., Tanizawa, K. and Fukui, T. (1994) in *Molecular Aspects of Enzyme Catalysis* (Kodansha Scientific, Tokyo), pp. 73-86.
10. 多賀谷光男, 福井俊郎 (1987) *生化学* 59, 1020-1026.
11. Furukawa, K., Tagaya, M., Tanizawa, K., and Fukui, T. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 868-871.
12. 谷澤克行, 多賀谷光男, 福井俊郎 (1993) *化学と生物* 31, 797-806.
13. Fukui, T., Kazuta, Y., Katsube, T., Tagaya, M. and Tanizawa, K. (1993) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 18, 209-216.
14. Kazuta, Y., Tanizawa, K., and Fukui, T. (1991) *J. Biochem.* 110, 708-713.
15. Fukui, T. (1995) *J. Biochem.* 117, 1139-1144.
16. Tanizawa, K., Kusunoki, M. and Fukui, T. (2000) *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 5, 83-98.

福井俊郎先生ご略歴：

- 1931年 兵庫県に生まれる。
- 1953年 大阪大学理学部化学科卒業
- 1958年 大阪大学大学院理学研究科博士課程
修了、理学博士
- 1958年 大阪大学助手
- 1958年 米国パデュー大学博士研究員
- 1964年 米国パデュー大学訪問助教授
- 1966年 大阪大学助教授
- 1970年 大阪大学教授
- 1995年 大阪大学名誉教授

