

ジャガイモ塊茎 ADP-glucose pyrophosphorylase の アロステリック調節に関する研究

生命分子化学講座 生物化学分野
西村 祐美

【背景と目的】 植物 ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase; EC 2.7.7.27) は, グルコース 1-リン酸 (G1P) と ATP を基質とし, デンプン生合成における唯一のグルコース供与体である ADP-glucose (ADPG) の生成を触媒する酵素である. 本酵素は異なる2種のサブユニットから形成されるヘテロ四量体であり, 3-ホスホグリセリン酸 (3-PGA) により活性化され, 無機リン酸 (Pi) によって阻害を受けるアロステリック酵素として知られている. しかしながら, そのアロステリック調節機構の詳細な分子機構については明らかではない. 本研究では, アロステリック調節機構の解明を目指し, これまでに得られたジャガイモ塊茎 AGPase の2種のアロステリック変異酵素 (Up1 および Up2 酵素) を材料に, 両変異を同時に有する Up3 酵素を作製し, その酵素化学的諸性質の解析を行った.

【方法】 細菌 AGPase を欠損した大腸菌を宿主として, 野生型および3種の Up 酵素を発現させた. 大腸菌が合成したグリコーゲンをヨウ素で染色し, 染色強度から発現した AGPase の活性を推定した. 形質転換大腸菌を培養し, 各酵素を電気泳動的に均一に精製し, 酵素化学的諸性質を解析した.

【結果】 各酵素を発現した大腸菌をヨウ素で染色したところ, 野生型酵素に比べ Up 酵素を発現する大腸菌はいずれも強く染色された. なかでも, Up3 酵素を発現した大腸菌の染色強度は高く, *in vivo* において Up3 酵素は Up1 および Up2 酵素よりも高い活性を保持していることが期待された. 精製酵素の速度論的解析により, 各 Up 酵素の両基質に対する K_m および V_{max} 値はいずれも野生型酵素の約 1/3 に低下したため, 各酵素間での触媒効率に大きな差異は認められないことが明らかになった. 一方, 各 Up 酵素は野生型酵素に比べ, いずれも

3-PGA による活性化を受けやすく, Pi による阻害を受けにくいアロステリック調節向上型であった. なかでも, Up3 酵素は, それぞれの変異を単独で有する Up1 および Up2 酵素以上にアロステリック調節向上型であることが明らかになった. また, 種々の糖代謝中間体による各酵素の活性化を調べたところ, いずれの酵素も 3-PGA に加えいくつかの代謝中間体により活性化され, 全体として野生型酵素に比べ, Up 酵素は感受性が高くなった. 特に Up3 酵素のフルクトース 2,6-ビスリン酸 (F2,6BP) により活性化は顕著で, 3-PGA による活性化の 112% にまで活性化されることが明らかとなった.

【考察および結論】 本研究では, これまでに報告されている2種の Up 変異を同時に有する Up3 酵素が, 各変異を単独で有する Up1 および Up2 酵素以上にアロステリック調節向上型酵素であることを明らかにした. また, ジャガイモ塊茎 AGPase が *in vitro* で, F2,6BP によって活性化されることを初めて示した. 各変異酵素の立体構造をモデリングし, 変異導入による影響を構造的に考察したところ, 両変異ともサブユニット間相互作用に影響する構造変化をもたらすと推定され, そのために各変異酵素のアロステリック特性が変わると考えられた.

