

氏 名 (本籍)                    高            原            英            成

学 位 の 種 類                    農            学            博            士

学 位 記 番 号                    農 博 第    2 1 9    号

学 位 授 与 年 月 日                昭 和 5 3 年    3 月 2 4 日

学 位 授 与 の 要 件                学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻                    東 北 大 学 大 学 院 農 学 研 究 科  
( 博 士 課 程 ) 農 芸 化 学 専 攻

学 位 論 文 題 目                    BIOSYNTHESIS OF GLYCOGEN  
IN *NEUROSPORA CRASSA* 糸 状 菌  
Neurospora crassa にお け る  
Glycogen の 生 合 成 機 構

論 文 審 査 委 員 ( 主 査 )

教 授 松 田 和 雄                    教 授 志 村 憲 助

教 授 高 橋 甫

教 授 立 木 蔚

# 論文内容要旨

## 緒論

糸状菌は醸造工業上並びに医薬工業上非常に有用である反面、各種の植物病原菌の例の様に害をもたらす微生物でもある。この様な糸状菌を理解する上で、また糸状菌を各種の用途に应用する上からも、糸状菌の細胞生理的な面からの研究は重要であると思われる。糸状菌は増殖細胞として胞子を、また栄養生長細胞として菌糸を形成し、この2つの形態を繰り返しながら生命を維持しているが、この様な糸状菌の life cycle 上重要であるエネルギー貯蔵物質に関する研究は乏しく、その代謝に関する研究はもとより、糸状菌におけるエネルギー貯蔵物質の存在並にその性状についてさえ、明確な知見が得られていない。一方、動物組織における重要なエネルギー貯蔵物質として Glycogen が存在していることは古くから知られ、また糸状菌と近縁な微生物である酵母についても Glycogen の存在が認められていることから、本研究では、まず、糸状菌における Glycogen の存在並にその性状を明らかにし、更に Glycogen 代謝の特に生合成機構に関して詳しい研究を行なった。

## 第I章、各種糸状菌における Glycogen の蓄積の有無および代表的糸状菌 *Neurospora crassa* の Glycogen の性状。

各種糸状菌における Glycogen の蓄積の有無について、ヨウ素液による菌体の呈色により判断した結果、Table I に示した様に大部分の糸状菌において Glycogen の蓄積を認めた。

TABLE I  
Distribution of the Fungi Capable of Storing Glycogen

Species	Glycogen Accumulation		
	CA	VA	PDA
<i>Aspergillus</i> species	+	+	
<i>Alternaria</i> solani	±	+	
<i>Botrytis cinerea</i>	+	+	
<i>Fusarium</i> species	+	+	
<i>Neurospora crassa</i>	+	+	
<i>Piricularia oryzae</i>		+	
<i>Taphrina deformans</i>	±	±	
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>			+
<i>Lentivirus edodes</i>			+

CA: Czapek Agar medium  
VA: Vogel's N Agar medium  
PDA: Potato Dextrose Agar medium

そこで以後の実験材料として、代表的な糸状菌であり、胞子を得やすく、しかも生育の早い、*Neurospora crassa* の野生株(6068, 1F0) を用いることにした。本菌は Glucose を炭素源とする液体培地で振盪培養し、まず *N. crassa* の菌体より、Glycogen を抽出・精製し、その構造を検討した。

トリクロロ酢酸を抽出剤とし菌体より Glycogen を抽出し、水溶液 エタノール沈殿の繰り返しにより Glycogen の精製標品を得た。このものが Glycogen であることは Fig. 1 に示した

様に完全酸水解 (Glucose が構成糖)、部分酸水解 (Maltooligosaccharide, isomaltose の存在) の結果から確認した。また、この精製 Glycogen 標品は窒素を含まなく、電気泳

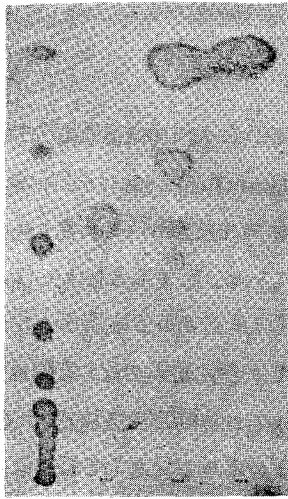


FIG. 1. Paper Chromatography of Complete and Partial Acid Hydrolyzates of the Purified Glycogen.

Aliquots of the acid hydrolysis in each reaction system, as described in the text, subjected to paper chromatography using the solvent system, *n*-butanol:pyridine:water (6:4:3). A. A mixture of maltoligosaccharides, B. Isomaltose, C. Partial acid hydrolyzates, D. Complete acid hydrolyzates.

動的にまた分子量的にも均一であり、超遠心分析、ゲル濾過分析の結果から、精製 Glycogen は  $2 \times 10^7$  ないしそれ以上の分子量を持つことがわかった。次に、種々な方法により本菌の Glycogen の性状を検討し、併せて、他の生物由来の Glycogen の性状との比較を行なった。その結果を Table II にまとめた。 *N. crassa* の Glycogen は平均鎖長、外部鎖長並に内部鎖長共に短いことが特徴であることから、本菌の Glycogen は分枝が多い構造を持つものであることが推測された。

TABLE II COMPARISON OF GLYCOGEN

	<i>N. crassa</i>	Rabbit liver	Shell-fish	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>
$\alpha$ -Amylolysis limit % <sup>a)</sup>	58.3	68.2	60.0	44	47-56
$\beta$ -Amylolysis limit % <sup>a)</sup>	33.6	48.8	32.3		
Isoamylolysis limit % <sup>a)</sup>	23.7		28.5		
$\beta$ -Amylolysis + Isoamylolysis limit % <sup>a)</sup>	104.2		108.5		
Average chain length <sup>b)</sup>	10	18	12	13	10-13
Exterior chain length <sup>b)</sup>	6	11	6	8	8-9
Interior chain length <sup>b)</sup>	3	6	5	4	1-3
$[\alpha]_D^{25}$ ( <i>c</i> =1, H <sub>2</sub> O)	+170°	+179°	+188°		
Iodine complex $\lambda_{max}$ (nm)	420	485	425		420-445

<sup>a)</sup> Percent of conversion into maltose in 3 hr incubation at 35°C in each reaction system, as described in the text.

<sup>b)</sup> Experimental procedures and calculation are described in the text.

<sup>c)</sup> Determined according to the method as described in the text, using 0.025% glycogen.

Fig. 2 に本菌の生育と Glycogen の蓄積の関係について調べた結果を示したが、この様に培養直後の菌体内には、Glycogen の蓄積が認められず、増殖期に入る頃から蓄積が開始し、増殖期後期に最大量に達することがわかった。

Glycogen の生合成は糖スクレオチドを基質として  $\alpha$ -1,4 結合の鎖を伸ばす Glycogen

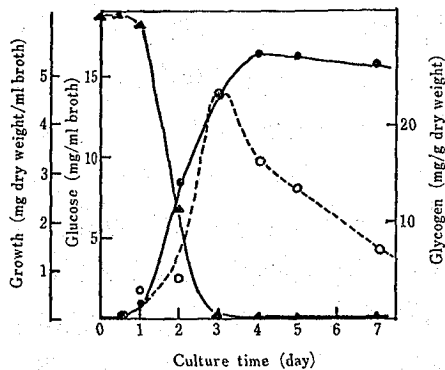


FIG. 2 Changes in Glycogen and Glucose during Incubation of *Neurospora crassa*.

Experimental procedures are described in the text.  
●—●, growth; ○—○, glycogen content; ▲—▲, glucose in both.

Synthase<sup>1)</sup>と $\alpha$ -1,6結合の分枝炭水化合物を合成する Branching enzyme<sup>2)</sup>によることは主に動物細胞を用いた研究から明らかにされている。しかし Glycogen synthase はポリマーである Glycogen が存在しないと、その活性発現が起こらないことから、Glycogen の初発合成機構は、Glycogen の生合成の不明な炭水化合物として残されている。さて *N. crassa* の場合、Fig. 2 に示した様に、胞子の培養直後の菌体には Glycogen が殆んど存在しないこと、また最近

Drucker<sup>3)</sup>は本菌の胞子には貯蔵多糖が存在しないことを報告していること等から、本菌を用いることにより Glycogen の生合成の初発合成機構が解明できるのではないかと推測し以下 Glycogen の生合成に関する研究を行なった。

## 第二章, *N. crassa* における Glycogen の生合成機構, 初発合成機構に関する糖蛋白質中間体の存在。

最近 Krisman<sup>4)</sup>は、ラット肝の粗酵素系を用いた実験結果から、Glycogen はある種のタンパク質に結合した形で出来上がることを報告している。しかし、この反応には生体内では考えられない条件を必要とすること等、疑問な点も多く、今後の詳細な研究結果が注目されている。そこでこの様な知見を参考にまず本菌の粗酵素系における Glycogen の生合成機構について検討した。Glycogen の蓄積が開始する stage の菌体から抽出した 25xg 上澄の可溶性酵素液は、UDP-[<sup>14</sup>C]glucose を基質として用いた場合、ポリマーなしの条件下において、トリクロル酢酸 (TCA) 可溶-エタノール不溶の Glycogen 画分と共に TCA 不溶画分にも [<sup>14</sup>C]glucose の顕著な転移反応を示した。この転移反応には高濃度の塩、化学試薬および二価の金属イオンの添加を必要としなかった。また、TCA 不溶画分への転移酵素活性は、菌体内 Glycogen 含量が低い lag-phase の菌体より抽出した酵素液

において高く、Glycogen含量が高いstageの菌体の酵素液において低いこと、さらに酵素反応系にGlycogenを加えると、この転移酵素活性は著しく阻害されることから、TCA不溶画分への転移酵素活性は、本菌のGlycogenの生合成における初発合成機構に關与し、しかもGlycogenによって調節されている可能性が示された。

TCA不溶画分の反応生成物を各種の化学試薬処理およびグルコアミラーゼ、プロナーゼなどの酵素を用いて検討した結果、この反応生成物は、ある種のタンパク質に共有結合した $\alpha$ -グルカンであり、このグルカンとタンパク質の結合は非常に酸に弱い結合を有することがわかった。そこでこの結合の特性を利用し、タンパク質上に生成した $\alpha$ -グルカンの性状を検討した結果、Fig. 3に示した様にこのものはGlucose 1個から高重合度にわたる

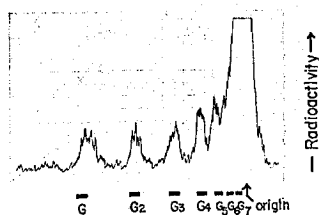


Fig. 3. Distribution of radioactivity of the products obtained after mild acid treatment of TCA-insoluble product. The paper strips were scanned for radioactivity with a radiochromatogram scanner. G-G<sub>7</sub>, a mixture of malto-oligosaccharides (the numbers indicate the number of constituent glucose units).

タンパク質上で生成した高重合度のグルカンは $\alpha$ -1,4-結合の主鎖に $\alpha$ -1,6結合の分枝を持つものであり、基本的にはGlycogenと同じ構造を持つことがわかった。

次いで、この糖タンパク質がGlycogenの生合成に果たす役割について詳細に検討する目的で、パルスラベルフェイス実験を行った。先の粗酵素の反応系を用い、UDP-[<sup>14</sup>C]glucoseで15分間

グルカンがタンパク質上に結合したものであることがわかった。またFig. 4に示した図は、各種アミラーゼ分解により、この高重合度のグルカンの構造について検討した結果であるが、この結果から、

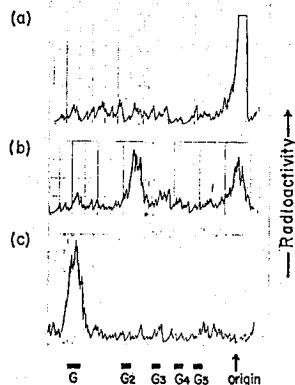


Fig. 4. Distribution of radioactivity of the products obtained after amyolysis of the carbohydrate prepared from TCA-insoluble product. Experimental procedures are described in "MATERIALS AND METHODS." The paper strips were scanned for radioactivity with a radiochromatogram scanner. (a) not treated, (b)  $\beta$ -amyolysis, (c) glucoamyolysis G-G<sub>5</sub>, a mixture of malto-oligosaccharides.

パルスラベルし、続いて種々の時間チェイスした結果、Fig.5. に示した様に、短時間チェイスした場合、TCA不溶画分からGlycogen画分への放射能の移行が認められ、更に長時間

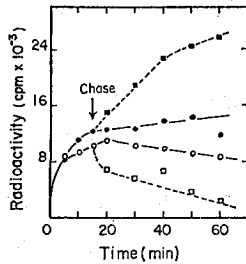


Fig.5. Pulse labeling-chase curves. Experimental procedures are described in "MATERIALS AND METHODS." Open symbols indicate the radioactivity of TCA-insoluble fraction and closed symbols indicate the radioactivity of TCA-soluble, ethanol insoluble fraction. ----, chase was performed; —, without chase.

以上の結果から、この糖タンパク質は Glycogen の生合成において、Glycogen synthase のプライマーを産生する中間体の役割を持つものがあり、また、*N. crassa* における Glycogen の一連の生合成は、この糖タンパク質中間体を中心として Fig.7 に示した様な経路をたどって行なわれるものと推測された。

(1) Protein glucosyltransferase により最初の Glucose 残基が Protein carrier に結合、(2) Glycogen primer synthase と Branching enzyme の働きで 13S 程度のプライマーがタンパク質上で合成される、(3) Releasing

因子が放出され、Glycogen 画分の放射能が直線的に増加した。また、ゲル濾過法によって糖タンパク質の糖部分の分子量分布を測定した結果、ある種のタンパク質と結合する  $\alpha$ -グルカン は Glycogen に比べ低分子量に分布するものであることが認められた (Fig. 6)

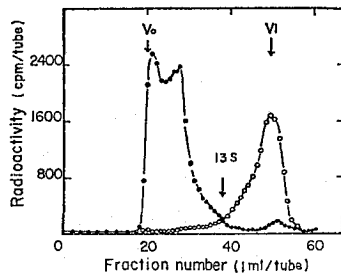
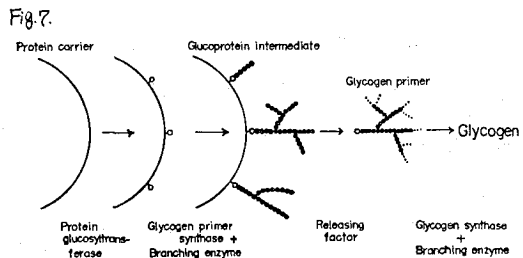


Fig.6. Gel filtrations of the labeled glucan from the TCA-insoluble and TCA-soluble fractions. The labeled glucans obtained from TCA-insoluble and TCA-soluble fractions as described in "MATERIALS AND METHODS" were individually applied to a Sepharose 2B column (1x7 cm). Radioactivity was determined by counting directly with a dioxane mixture. (O) the glucan from TCA-insoluble fraction, (●) the glucan from TCA-soluble fraction.  $V_0$ , blue dextran;  $V_1$ , glucose; the value of 13S was determined with a partial hydrolysis of shellfish glycogen.



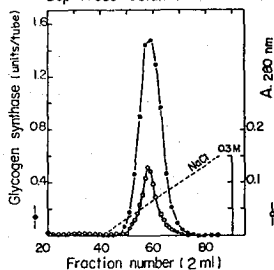
factorが働き、プライマーが遊離し、このプライマーをGlycogen synthase が利用し、Branching enzyme との共同作用によりGlycogenが出来上がる、機構である。

この様に推測した生合成機構について更に検討する為には、ここでその存在を推定した各酵素、Factor、中間体の分離、精製およびその性質についての検討が必要である。そこで本研究では、プライマーをGlycogenに作り上げるGlycogen synthaseを分離・精製を試み、次いで本酵素の詳しい性質の検討を行なった。

### 第三章、Glycogen synthaseの分離・精製並びにGlycogen synthaseの一般的諸性質、タンパク質化学的諸性質。

*N. crassa* のGlycogen synthase を超遠心分離、DEAE-cellulose column chromatography, 硫酸分離、3-Aminopropyl-Sepharose column chromatography により精製した。本酵素活性の測定は基質UDP- $^{14}\text{C}$  glucoseの $^{14}\text{C}$  glucoseがプライマーとして加えたGlycogenに転移する量を測定して行なった。Fig. 8は上記の方法に従い大量に精製した

Fig. 8. Rechromatography of Glycogen synthase on a 3-Aminopropyl-Sepharose column



本酵素の3-aminopropyl-Sepharose column chromatographyのre-chromatogramである。この様に塩濃度勾配により、タンパク質と本酵素活性が一致して溶出されることかわかる。上記の方法に従って精製した場合の比活性の変化および回収率をTable IIIにまとめただが、この様に比活性は約300倍に、また回収率は43%で収率よく回収されることかわかる。

精製Glycogen synthaseはGlucose-6-P依存型(D型)であり、Glycogen Branching enzyme,

TABLE III  
PURIFICATION OF *N. CRASSA* GLYCOGEN SYNTHASE

Purification step	Volume (ml)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
1. 20 000 X g supernatant	100	38 511	0.023	100
2. 100 000 X g pellet	100	39 415	0.051	102 *
3. DEAE-cellulose	165	26 285	0.208	68
4. 45% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitate	10	25 341	1.633	66
5. 3-Aminopropyl-Sepharose	20	16 384	6.884	43

\* Overestimated value should be due to the experimental error.

Phosphorylase 活性を含まなく、ディスク、SDS 電気泳動的にも均一であった。精製酵素の一般的諸性質 (pH, 温度, 金属イオン, 化学試薬の影響) を検討し、併わせて他の生物由来の酵素との比較を行った。また、本酵素の分子量を SDS 電気泳動法, 超速心分析法並びにショ糖密度勾配遠心分析法により検討した。本酵素を常法処理後, SDS 電気泳動法から得た本酵素の分子量は 88,000 であり, また, 超速心分析の沈降パターン Fig. 9

Fig. 9. Sedimentation Patterns of Purified Glycogen synthase

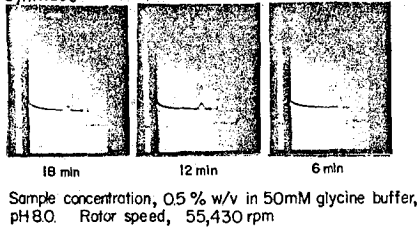
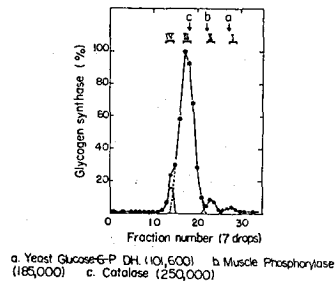


Fig. 10. Sucrose Density Gradient Centrifugation of Purified Glycogen synthase



から求めた S 値 (2.5 S) が示す本酵素の分子量はおよそ 25~30 万であった。この結果より本酵素は同一なタンパク質が数個会合したものであることが予想され、この点につきショ糖密度勾配遠心分析を用いた検討を加えた。Fig. 10 は 5~20% ショ糖密度勾配を用いた超速心分析の結果である。a, b, c は分子量概知の酵素タンパク質の沈降位置を示し、この様に、

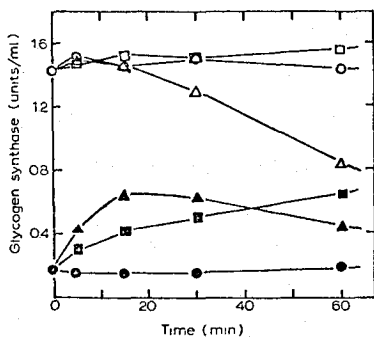


Fig. 11. Effect of proteases on the activity of glycogen synthase, glucose-6-P-dependent form. For conditions see in the text. Aliquots were withdrawn at different times and the activity was measured either in the absence or in the presence of glucose-6-P. Open symbols and solid symbols represent the activity in the presence and in the absence of glucose-6-P, respectively. ○, ●, control; △, ▲, trypsin; □, ■, chymotrypsin.

本酵素は 1 つの major peak (III) と 3 つの minor peak (I, II, IV) を示し、それぞれの沈降位置から求めた分子量と SDS 電気泳動法から求めた分子量の結果から、(I), (II), (III), (IV) はそれぞれモノマー、ダイマー、トリマー、テトラマーと推定された。この様な結果から、本酵素は 88,000 の分子量を持つ subunit が主として 3 個会合した会合酵素である

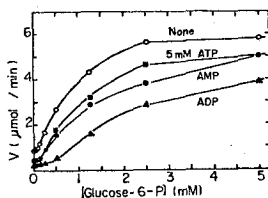


ことがわかった。またアミノ酸分析, DNS 化法による N 末端アミノ酸分析の結果から、本酵素の subunit はアミノ酸 700 個余りが重合し、Histidine を N 末端とする single peptide から構成されることわかった。本酵素の Glucose-6-P 依存性決定部位と活性中心部位の関係を検討する目的で、本酵素のタンパク質分解酵素(トリプシン, キモトリプシン)による限定分解を行なった。Fig. 11 に示した様に、キモトリプシンによる限定分解では、全活性量の変化なしに Glucose-6-P 非依存性活性の増加が起こる。この様なことから本酵素の Glucose-6-P 依存性決定部位は、ある程度活性中心部位から離れた所にあると推測される。

#### 第四章, Allosteric 効果による Glycogen synthase の活性調節機構, Glucose-6-P の活性化機構並びに Glycogen synthase のプライマー依存性

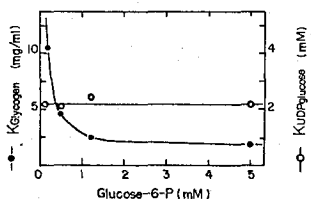
動物組織における Glycogen synthase の活性調節は酵素の Glucose-6-P 依存型(D 型)と非依存型(I 型)の相互変換によることわ認められている<sup>5)</sup>。しかし本菌の場合 Glycogen を盛んに蓄積している Stage から得られる Glycogen synthase とも、大部分 Glucose-6-P 依存性であることから、本菌の Glycogen の生合成は、Glycogen synthase に対する Glucose-6-P と Glucose-6-P antagonist による Allosteric な調節の可能性が考えられる。この点について検討を行なった結果、Adenosyl phosphate が Glucose-6-P に対する特異的な antagonist であることがわかった。Fig. 12 からわかる様に、特に ADP が強い働きを示し、低濃度の Glucose-6-P 条件下においてその作用の著しいことが認められる。更に、Adenosyl phosphate の作用機構に関し Kinetics の面から詳しく検討した結果、Adenosyl phosphate は Glucose-6-P の酵素への結合以外に UDP-glucose の結合に対しても阻害することがわかった。次いで Glucose-6-P の本酵素に対する活性化機構についても検討した。Fig. 13 に示した結果は、Glucose-6-P 濃度変化による本酵素の UDP-

Fig. 12. Effect of Glucose-6-P on the Activity in the Presence of ATP, ADP & AMP



を示し、低濃度の Glucose-6-P 条件下においてその作用の著しいことが認められる。更に、Adenosyl phosphate の作用機構に関し Kinetics の面から詳しく検討した結果、Adenosyl phosphate は Glucose-6-P の酵素への結合以外に UDP-glucose の結合に対しても阻害することがわかった。次いで Glucose-6-P の本酵素に対する活性化機構についても検討した。Fig. 13 に示した結果は、Glucose-6-P 濃度変化による本酵素の UDP-

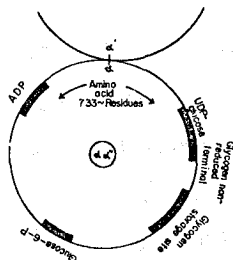
Fig. 13. Apparent Michaelis Constants of Substrates as a Function of Glucose-6-P



glucose および Glycogen に対するミカエリス定数の変化である。この結果から Glucose-6-P は本酵素の Glycogen に対する親和力を増加させる働きを持つことがわかる。Glycogen synthase の Glycogen に対する親和性の問題は、本酵素の合成機構の解明に於いて重要である。そこで先の Glucose-6-P

の活性化機構に関する実験結果を参考に、種々の条件下における本酵素と Glycogen の複合体形成について検討した結果、本酵素は活性中心以外にも Glycogen と結合する部位を有することが推測された。Fig. 14 は以上の結果をもとに、*N. crassa* の Glycogen synthase を模

Fig. 14. Enzyme Sites on Glycogen synthase



式的に表わしたものである。αα'並のαα'は subunit 間を隣接していることを示し、それぞれの subunit には、活性中心部位、Glycogen、Glucose-6-P 並びに ADP の結合部位が存在する。

Glycogen synthase は Glycogen 生合成機構の中でプライマーを Glycogen に作り上げる酵素であると述べたが、この点を明確にする為、Glycogen synthase のプライマー依存性について検討した。Table IV にマルトオリゴ糖のプライマー活性について調べた結果をまとめたが、この様に、Glucose, Maltose, Maltotriose のオリゴ糖は Glycogen と比較し、

TABLE IV. ACTIVITIES OF OLIGOSACCHARIDE ACCEPTORS OF GLYCOGEN SYNTHASE

Acceptor	Concentration	Glucose transferred	
		μmol/min per mg protein	
Glucose	100 mM	0	0
	200 mM	0	0
Maltose	100 mM	0.128	1.9
	200 mM	0.304	4.4
Maltotriose	100 mM	0.047	0.7
	200 mM	0.100	1.5
<i>N. crassa</i> glycogen	10 mg/ml	6.854	100

高濃度でも殆んどプライマー活性を持たない。また、本菌の Glycogen, この Glycogen を phosphorylase 並に  $\beta$ -Amylase 分解した dextrin, それぞれについてプライマー活性を調べた結果, Fig. 15 (左図) に示した様に, Outer chain の長さが 2 ないし 3 個の  $\beta$ -Amylase limit dextrin は殆んどプライマーとして働かないことがわかる。また Glycogen と Phosphorylase limit dextrin 両者のプライマー活性の差について Kinetics の面から検討した結果 (Fig. 15, 右図), プライマーの Outer chain が短くなると酵素に対する親和性が減少することわかった。以上の結果から, Glycogen synthase は, その活性発現にプライマーを必要とし, その為のプライマーは高重合度の, しかも Outer chain が 4 個以上の Glucose 残基を持つものが必要ならなければならないことがわかった。この様な結果は一連の Glycogen 生合成機構における本酵素の役割を更に明確にするものと思われる。

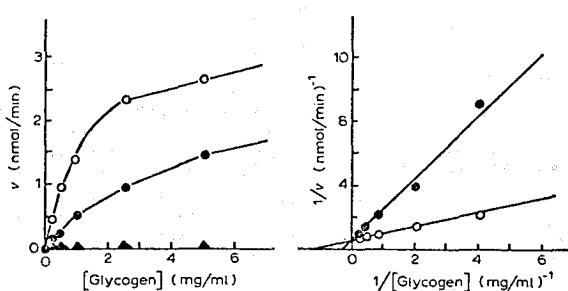


Fig. 15. Various primer saturation kinetics of the purified *N. crassa* glycogen synthase. Glycogen synthase was assayed under the conditions (in the presence of glucose-6-P) described in Materials and Methods at the final concentrations of primer indicated. Double-reciprocal concentration of the same data are shown in the diagram on the right. —○—, *N. crassa* glycogen; —●—, phosphorylase limit dextrin of *N. crassa* glycogen; —▲—,  $\beta$ -amylase limit dextrin of *N. crassa* glycogen. Details are in the text.

## 第V章, Glycogen synthase の反応機構の解析

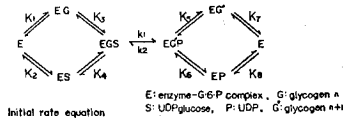
Glycogen synthase は  $\text{UDP-glucose} + (\text{Glycogen})_n \rightleftharpoons (\text{Glycogen})_{n+1} + \text{UDP}$  で表わされる 2 基質, 2 生成物反応の解媒であるが, Glycogen synthase の反応機構に関する研究はまわめて乏しい。本研究では *N. crassa* の Glycogen synthase を用い反応機構の解析を行なった。まず Glucose-6-P 濃度と反応速度の検討結果から, 本酵素は Glucose-6-P と Michaelis-menten 形式の複合体を形成し, また, Glucose-6-P に対する  $K_m$  値は  $0.489 \text{ mM}$  であることがわかった。一般の反応と異なり, 本酵素反応の場合, Glycogen

は反応前後を通じて殆んど性質の上でも濃度の上でも区別出来ない reactant である。

この点を考慮し、反応機構の解析を行なった。

各基質濃度変化に伴う初速度変化の解析、反応生成物 UDP の阻害型の解析並びに逆反応速度の解析から本酵素反応の反応形式は Fig. 16 に示した様な Rapid Equilibrium Random Bi-Bi 機構形式であり、また図に示した様な、正反応の反応速度式が誘導された。次いで誘導した反応初速度式と実験結果から、反応初速度式の係数、反応速度定数並びに各解離定数を求めた。その結果を Table V にまとめたが、得られた反応速度定数の結果から本酵素反応は著しく合成反応に傾いていることがわかり、また解離定数の結果から本酵素反応の律速は遊離の酵素と片方の基質の複合体が形成する段階にあることがわかる。

Fig. 16. Rapid Equilibrium Random Bi-Bi mechanism



$$v = k_1(EGS) - k_1'(E_0) = \frac{k_1(S)K_1K_4}{1 + (G)/K_1 + (G)/K_7 + (S)/K_2 + (GS)/K_3K_4}$$

$$K_1K_4 = K_2K_8$$

$$\frac{(E)}{v} = \frac{1}{k_1} + \frac{K_4}{k_1(G)} + \frac{K_3(1 + \frac{K_1}{K_7})}{k_1(S)} + \frac{K_1K_4}{k_1(G)S}$$

$$= \phi_0 + \frac{\phi_1}{(G)} + \frac{\phi_2}{(S)} + \frac{\phi_3}{(GS)}$$

$$\left[ \begin{matrix} \phi_0 = \frac{1}{k_1}, \phi_1 = \frac{K_4}{k_1} \\ \phi_2 = \frac{K_3}{k_1}(1 + \frac{K_1}{K_7}), \phi_3 = \frac{K_1K_4}{k_1} \end{matrix} \right]$$

TABLE V

Summary of Data

Kinetic coefficients	Corresponding kinetic constants
$\phi_0 = 0.106 \text{ mg of protein} \times \text{min per } \mu\text{mol}$	$k_1 = 9.434 \text{ } \mu\text{mol/min per mg}$
	$k_2 = 0.106 \text{ } \mu\text{mol/min per mg}$
$\phi_1 = 0.076 \text{ mg of protein} \times \text{min} \times \frac{\text{mM}}{\text{mM}} \text{ per } \mu\text{mol}$	$K_1 = 8.810 \text{ mg/ml glycogen}$
	$K_2 = 8.224 \text{ mM UDPglucose}$
$\phi_2 = 0.143 \text{ mg of protein} \times \text{min} \times \text{mM per } \mu\text{mol}$	$K_3 = 0.676 \text{ mM UDPglucose}$
$\phi_3 = 0.625 \text{ mg of protein} \times \text{min} \times \frac{\text{mM}}{\text{mM}} \times \text{mM per } \mu\text{mol}$	$K_4 = 0.717 \text{ mg/ml glycogen}$

## 考察

Glycogen は糸状菌においてもエネルギー貯蔵多糖として大切な役割を果たしていることが本研究より明らかとなった。糸状菌の Glycogen は動物由来の Glycogen と比較し、分枝の多いことが種々の分析結果からわかったが、Table II に示した結果からもわかる様に、この様な構造上の特徴は微生物由来の Glycogen に共通する点としてあげることが出来るものと思われる。Glycogen の生合成に関する研究は、もっぱら Glycogen の  $\alpha$ -1,4 結合の

鎖を伸ばす酵素系を中心に行なわれているが、今後Glycogenの分枝合成機構についても詳細な研究が望まれる。その場合、糸状菌 *N. chassa* の様に、分枝の多いGlycogenを合成する能力を有する微生物が研究材料として役立つであろう。

Glycogenの生合成機構の中でまだ明らかとなっていない初発合成機構について本菌の粗酵素系を用いて検討した結果、Fig. 7に示した様な初発合成機構を推定した。Krisman<sup>2)</sup>と同様ある種のタンパク質がプライマー合成の受容体として働いている可能性が示されたが、本菌の酵素系では特別な条件を与えなくても反応が認められ、この様なことは、実際にこの機構が細胞内において働いている可能性を更に強く示唆するものであろう。また、Krismanが示した様なGlycogenがタンパク質を含んだ形で出来上がる考えと異なり、本研究の結果からタンパク質上で合成されたプライマーは早くして遊離して、Glycogen synthaseのプライマーとして働く機構が推定された。本菌の菌体から冷トリクロロ酢酸を用いて抽出・精製したGlycogenはタンパク質を含んでいないことも上記の機構を裏付ける結果であると考えられる。最近テンアンプセルロース生合成系においても、その初発合成にある種のタンパク質が関与しているという報告があることから、この様なタンパク質を介する多糖の初発合成機構は新しい生合成機構の一つとして認められつつある。

次いで、本研究では上記の様に推定したGlycogenの生合成機構を詳細に検討する為、まずGlycogen synthaseの分離・精製を試み、ほぼ均一なGlycogen synthaseを得た。Glycogen synthaseはGlycogen顆粒との分離が困難であることや、不安定な酵素であること等から、本酵素の分離・精製において幾つか工夫が必要である。*N. chassa*のGlycogen synthaseのsubunit当りの分子量は動物由来の酵素とほぼ類似の分子量を持ち、同じく会合酵素であることがわかった。

本酵素のプライマー依存性に関する実験結果は、本酵素がde novo合成能力を有しないこと、また、高分子量のしかもOuter chainの長さが4個以上のGlucose残基を有するプライマーを必要とすることから、先に示した機構の中でこのGlycogen synthaseはプライマーをGlycogenに作り上げる段階にのみ働く酵素であることは間違いないものと思われる。従って今後は更にGlycogen primer synthase, Protein glucosyltransferase, Protein carrier 並に Branching enzymeの分離・精製により、詳細なGlycogen生合成機構の解明が出来るものと考えられる。

## 参考文献

- 1) Leloir, L.F. and Cardini, C.E. (1957) J. Am. Chem. S 79, 6340.
- 2) Larner, J. (1953) J. Biol. Chem. 202, 481.
- 3) Drucker, H. (1972) J. Bact. 110, 1041.
- 4) Krisman, C.R. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1206.  
Krisman, C.R. and Barengo, R. (1975) Eur. J. Bioche 52, 117.
- 5) Larner, J. and Villar-Palasi, C. (1971) Curr. Top. Regul. 3, 195.

## 発表論文

The Structure of Neurospora crassa Glycogen.

Hidenari Takahara and Kazuo Matsuda (1976)  
Agr. Biol. Chem. 40, 1699.

Biosynthesis of Glycogen in Neurospora crassa.

Existence of a Glucoproteic Intermediate in the  
Initiation Process.

Hidenari Takahara and Kazuo Matsuda (1977)  
J. Biochem. 81, 1587.

Biosynthesis of Glycogen in Neurospora crassa.

Purification and Properties of the UDP-glucose:  
Glycogen 4- $\alpha$ -glucosyltransferase.

Hidenari Takahara and Kazuo Matsuda (1977)  
Biochim. Biophys. Acta BBA 68354, in press.

## 審査結果の要旨

グリコーゲンの代謝に関する研究は主として動物組織または細菌菌体を材料として行なわれており、糸状菌については貯蔵物質としてのグリコーゲンの存在およびその性状についてさえ情報に乏しく、代謝に関する詳細な研究は殆んど行なわれていない。本論文は糸状菌におけるグリコーゲンの存在並びにその性状を明らかにし、さらにグリコーゲン代謝、特に生成機構、について詳細な研究を行なったものである。

著者はまず各種糸状菌について菌体内におけるグリコーゲン蓄積の状態を検討した結果、胞子を得易く、生育の速い *Neurospora crassa* の野生株を実験材料として選定した。ついで、本菌の菌体から稀トリクロル酢酸によりグリコーゲンを抽出し、その性状を検討した結果、本菌のグリコーゲンは動物由来のグリコーゲンと比べて分枝の多い構造を有することを確認した。

本菌の生育とグリコーゲンの蓄積との関係を検討した際、胞子から出発した培養直後の菌体内にはグリコーゲンの蓄積が認められなかったこと、および本菌の胞子は全くグリコーゲンを含有しないという報告に接したことから、著者は本菌がグリコーゲン生成機構のなかで未解明な点の多い初発合成機構を研究するのに好適な材料であろうと考え、本菌の粗酵素系を用いて初発合成機構について検討した。その結果、グリコーゲンの初発合成に際してある種の蛋白質がプライマー合成の受容体として機能している可能性が示された。この可能性は他の研究者によっても示唆されているが、蛋白質への糖残基の転移には非生理的条件が必要であって、生理的条件下で反応が行なわれることを確認したのは本論文が最初である。また、著者は蛋白質上で合成されたプライマーはやがて遊離してグリコーゲン合成酵素のプライマーとして働く機構を推定した。

著者はついで、グリコーゲン合成における主要な酵素であるグリコーゲン合成酵素の分離、精製を試み、ほぼ均一な蛋白質として得ることに成功した。精製酵素の性質を詳細に検討した結果、本酵素は動物由来の酵素と類似の subunit 当りの分子量を有する会合酵素であり、ヒスチヂンをN-末端とする single peptide から構成されることが判明した。著者はさらに蛋白質分解酵素による限定分解、種々な条件下における酵素とグリコーゲンの複合体形成の検討などの結果から、本酵素における Glucose-6-P 依存型決定部位、活性中心部位および基質結合部位の関係を推定した。また、本酵素のプライマー要求性、反応機構についても明らかにすることに成功した。

以上、本論文は糸状菌におけるグリコーゲン生成の機構に新しい知見を加えたものであり、糖質生化学、微生物生化学の分野に貢献するところが大きく、農学博士の学位を授与するに値するものと判定する。