HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	魚類筋肉のグリコーゲン分解系酵素に関する研究－Ｖ．：コイ筋肉ホスホリラーゼキナーゼの諸性質について
Author(s)	川田, 倫夫; 柴田, 猛
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 37(4), 314-325
Issue Date	1986-11
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23934
Type	bulletin (article)
File Information	37(4)_P314-325.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北 大 水 産 彙 報
37(4), 314-325. 1986.

魚類筋肉のグリコーゲン分解系酵素に関する研究—V. コイ筋肉ホスホリラーゼキナーゼの諸性質について

川 田 倫 夫・柴 田 猛*

Studies on Glycogen-Degradating Enzymes in Fish Skeletal Muscle-V. Subunit structure and catalytic properties of phosphorylase kinase from carp skeletal muscle

Michio KAWADA and Takeshi SHIBATA*

Abstract

In order to obtain further information on the regulation of glycogen metabolism in fish skeletal muscle, the subunit structure and catalytic properties of carp skeletal muscle phosphorylase kinase (EC. 2.7.1.38) were investigated. The results obtained are as follows:

(1) It was demonstrated that one of two active fractions, which were separated by gel filtration or ion exchange chromatography during the purification procedure of carp phosphorylase kinase, was the aggregated form of the enzyme.

(2) Four types of subunits present in the kinase were determined by SDS-electrophoresis and the following molecular weights for subunits were obtained: $\alpha=140000$, $\beta=120000$, $\gamma=42000$ and $\delta=17000$.

(3) Judging from the densitometric analysis of the protein bands, the molar ratio of these subunits was determined to be 1 : 1 : 2 : 1 and assuming the enzyme as tetramer, a total molecular weight of 1.44×10^6 dalton was calculated for the carp enzyme.

(4) The dependencies of the kinase activity on pH, temperature and substrate concentrations were studied. The kinetic properties of the carp enzyme were similar to those of rabbit enzyme. There is little difference between the two active fractions of carp phosphorylase kinase, despite one of the fractions was the aggregated form.

緒 言

魚類も筋肉や肝臓にグリコーゲンを貯蔵し，それを分解し種々の運動にエネルギーを供給しており，また，死後のグリコーゲン分解が著しく，その分解物の乳酸量が魚肉の品質に大きな影響を与える事がよく知られている。しかし，これらの現象を知りながら，グリコーゲンの分解・合成代謝の魚類における役割，とくに，酵素の挙動についての研究がなされていない。解糖系をへてグリコーゲンが利用されるために，まずホスホリラーゼによりグリコース-1-りん酸に分解されねばならない。このホスホリラーゼを活性化するのがホスホリラーゼキナーゼである。この酵素を研究する事により，グリコーゲン分解代謝の詳細を知ることが出来るからである[1]。それ故に，鍵酵素となるホスホリラーゼキナーゼ (EC. 2.7.1.38: 以下，本酵素と略す。) を取り上げ幾つかの性質を検討した。コイの本酵素の特徴は，ウサギの酵素のようではなく，りん酸化と脱りん酸化

* 北海道大学水産学部生物化学講座
(*Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University.*)

の相互転換による調節作用をもたず，Ca^{2+} による調節作用だけをもつことを報告した[2,3]。ここでは，さらに本酵素の諸性質の詳細を知るために精製酵素の分子型，サブユニット組成と触媒的性質をウサギの本酵素と比較検討した結果を報告する。

実 験 方 法

試料は市販の活魚を用いた。酵素の精製，活性測定法，たんぱく質の定量，SDS-電気泳動法はすべて前報において述べた[4]。Sepharose 4B によるゲルろ過法およびりん酸 (P)-セルロースによるイオン交換クロマトグラフ法については各図の説明文に述べた条件で常法通り操作した。なお，本酵素の基質にはウサギ骨格筋から精製したホスホリラーゼのみを用いた。

実 験 結 果

精製酵素のゲルろ過における挙動 前報においてコイ筋肉から精製された本酵素は DEAE-および P-セルロースカラムによっても，いずれも活性のもつ二つの区分 (Peak-I と Peak-II) に分離され，その活性区分は至適 pH, Ca^{2+} 濃度依存性や比活性度についても，ほとんど差がないことを報告した[4]。ウサギ[5,6] やツノザメ[7] 筋肉の本酵素の精製段階に二つの活性区分が観察され，その一つは本酵素の重合体であると報告されている。これは本酵素が高塩濃度[8] や高圧力[9] に対して不安定なためであるとされた。

コイに見られた二つの活性区分も重合体の生成によるのかどうかを確かめるために，Sepharose 4B により両活性区分の分離を試みた。ここでは，分離能を高めるために精製法に用いた時よりもカラムサイズを大きく 2.0×115 cm にして行った。大凡の分子量を知るためにウサギの本酵素 (分子量＝1.33×10^6 ダルトン)[6] を標準として使用した。ゲルろ過に供した試料はコイとウサギの何れも DEAE-セルロースカラムから溶出された全活性区分を用い，さらにコイの本酵素を硫安沈殿により，ウサギの場合はポリエチレングリコールを用いて濃縮した。この試料をカラム平衡緩衝液に透析後に使用した。両酵素のゲルろ過のパターンを Fig. 1 に示した。コイ (A) においては三つの活性区分が存在したが，速く溶出した最初の二つの区分を合わせて K_1, 三番目の区分を K_2 と称した。K_1 は 190-200 ml, K_2 は 280-290 ml の溶出液量であった。ウサギ (B) では単一な区分が得られ，その溶出液量は 290-300 ml であった。このことから，K_2 区分に溶出された酵素の分子量はウサギのそれに近いが溶出がウサギ酵素に比べて，やや速いことからウサギ酵素よりもやや大きい分子量をもつと推定された。また，K_1 は明らかに K_2 より速く溶出したことから，さらに大きい分子量の本酵素の存在を示しツノザメの場合[9] の例から推定すれば 2-4 分子の重合体の分子量に相当するが正確な値が測定出来なかった。コイにおけるこの重合体の形成は硫安分画の段階で生じたものと思われた。

次に得られた K_1 と K_2 区分が前述した Peak-I と Peak-II の何れに相当するのか，りん酸-セルロースに対する吸着性を検討した。コイおよびウサギ酵素のりん酸-セルロースによるクロマトグラフの結果を，それぞれ Fig. 2 と Fig. 3 に示した。コイの K_1 と K_2 区分をカラムに供試した後に精製法で述べたように 0.1-0.8 MKCl の濃度勾配法により溶出した。主な活性区分は図の矢印に示したように，K_1 (Fig. 2, A 図) においては 0.4 M, K_2 (Fig. 2, B 図) において 0.26 M の塩濃度で溶出した。それに対してウサギ (Fig. 3) の場合にはより低い 0.13 M の塩濃度であった。従って活性区分の溶出する塩濃度と溶出順序から，精製の時に示した Peak-I は K_2 区分に相当し，Peak-II は K_1 区分に相当し重合体の酵素であると推定される。二つの活性区分はアイソザイムという関係でなく，酵素の集合状態の変化によると推定された。コイの本酵素はウサギのものよりもりん

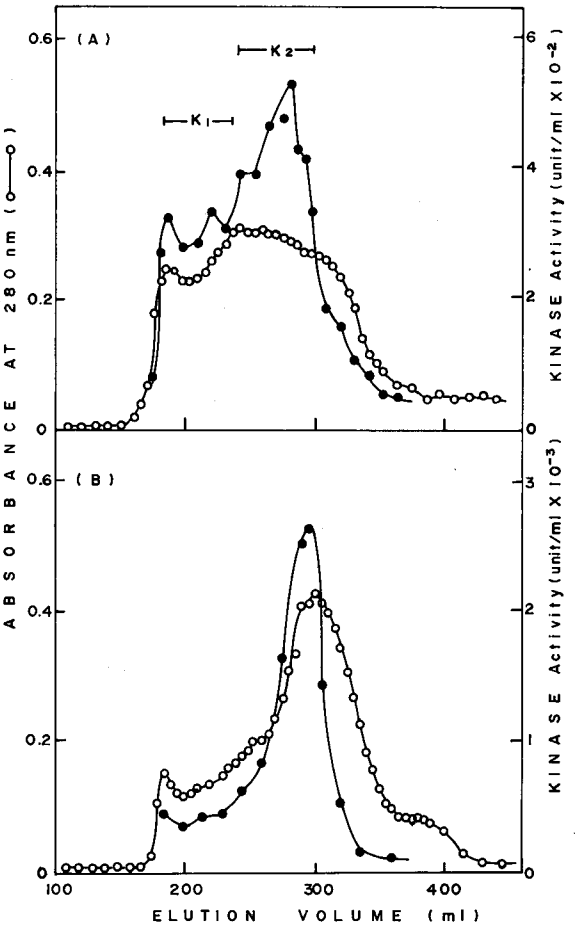

Fig. 1. Gel filtration of carp (A) and rabbit (B) phophorylase kinases on Sepharose 4B column. The column (2.0×115 cm) was equilibrated with 50 mM β-glycerophosphate-2 mM EDTA-10 mM mercaptoethanol-10% glycerol buffer at pH 6.8. Active fractions eluted from DEAE-cellulose (each protein, 84.5 mg) were applied to the column. Flow rate, 10 ml/hour; Fraction volume, 5.5 ml.

酸セルロースカラムからの溶出の塩濃度が高いことから，コイ酵素はウサギ酵素よりも分子量が大きいことも示唆された。

サブユニット組成と全分子量 ここでは本酵素に含まれるサブユニットの組成とその分子量およびモル比から全酵素の分子量を推定した。前報においてSDS-ポリアクリルアミド電気泳動によりコイのPeak-IおよびPeak-IIに含まれるたんぱく成分の検討を行ったところ，両区分に共通してα, βとγに相当する三成分が存在することを報告した[4]。そこで各成分の分子量を求めるために各成分の相対移動度を分子量既知の標準マーカーと比較した結果をFig. 4に示した。その結果，α, β, γの分子量はそれぞれ140000, 120000, 42000と求められた。ウサギの本酵素は前記の三成分の外にδサブユニット（分子量＝17000）の成分を含むことが報告されている[10]。また，カルモジュリンに相当するこのδ成分はコイの本酵素にも存在することを既に報告した[3]。この成分の移動度が全く牛脳カルモジュリンに一致することから，恐らく分子量も同じであろうと推定した。

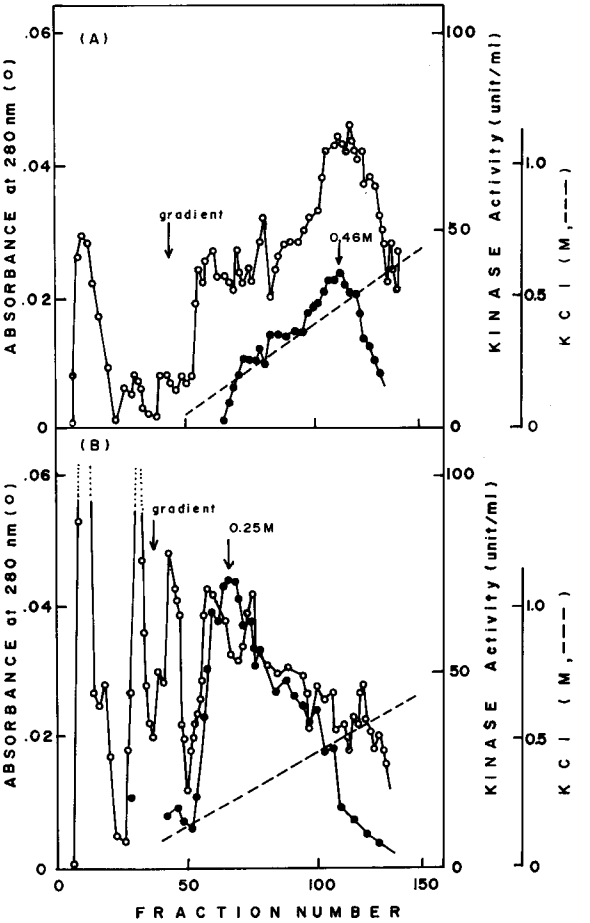

Fig. 2. Chromatography of carp phosphorylase kinase on phosphate-cellulose column. The column (1.6×18 cm) was equilibrated with 50 mM β-glycerophosphate-2 mM EDTA-10 mM mercaptoethanol-10% glycerol buffer at pH 6.8. K_1-fraction (protein, 7.4 mg) or K_2 fraction (protein, 11.7 mg) eluted from Sepharose 4B colum as described in Fig. 1 was applied to the cloumn. The column was washed with the above buffer containing 0.1 M KCl. (A) and (B) showed the elution-profiles of K_1 and K_2 fractions, respectively. Elution was carried out with a linear KCl gradient (0.1-0.8 M, total volume: 500 ml). Flow rate, 25 ml/hour; Fraction volume, 5 ml.

次に α, β, γ と δ 成分のモル比を求めた。すなわち，上記の各成分の推定分子量とデンシトメーター（島津製・TLC scanner CS-910）で測定したSDS-電気泳動したたんぱくバンドの吸光値を用いてそれらのモル比を計算した。ウサギの本酵素に上記の四成分が等モルに存在すると仮定[11]してウサギの本酵素から得られた実測値を用いて補正しながらコイの本酵素の四成分のモル比を求めた結果をTable 1に示した。コイにおいて γ 成分が外の二成分よりも倍多く含まれていた。従って，コイの本酵素のサブユニット組成は $(\alpha\ \beta\ \gamma_2\ \delta)_n$ となった。分子量の大きい標準物質が入手出来なかったので全分子量を測定出来なかったが，Fig. 1に示したゲルろ過の挙動がウサギの本酵素とよく類似していることから，コイの本酵素はウサギのものに近い分子量をもつことが示唆

Table 1. Molar ratios of subunits constituting phosphorylase kinase.

Origin \ Subunit	α	β	γ	δ
Carp	1	1	2	1
Rabbit	1	1	1	1

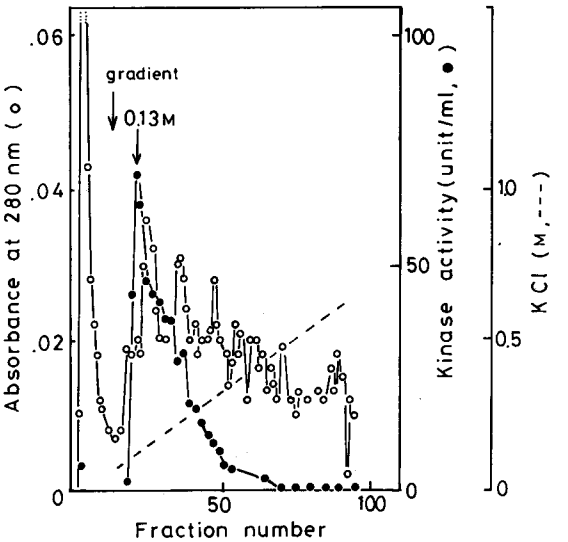

Fig. 3. Chromatography of rabbit phosphorylase kinase on phosphate-cellulose column. Active fractions eluted from Sepharose 4B column (4.5 mg of protein) were applied to the column. Elution was carried out with a linear KCl gradient (0-1.0 M, total volume: 500 ml). Other experimental conditions were the same as described in Fig. 2.

される。ウサギの場合と同様に四量体 (n=4) とすれば，その組成は $(\alpha\ \beta\ \gamma_2\ \delta)_4$ となり全分子量は 1.44×10^6 ダルトンと計算された。恐らく，この値はコイの本酵素の分子量の最小値になるであろう。

触媒的性質 精製時に得られた二つの活性区分の触媒的性質の違いの探求のために一部ウサギのものと比較して検討した。

(1) **pH 依存性** 精製したコイとウサギの本酵素について，活性の pH 依存性を比較した。その結果を Fig. 5 に示した。その至適 pH はコイでは pH 8.5-9.5 に，ウサギでは pH 9-10 に存在した。コイはウサギの場合よりもやや中性側にずれていた。また両者とも中性側の pH からアルカリ側の pH になると，活性は急激に上昇し，pH 依存性は類似していた。コイの peak-II もまた Peak-I と同じ pH 依存性を示すことは既に前報に述べた[4]。

(2) **温度依存性** コイとウサギの間で，酵素活性の温度依存性について比較した結果を Fig. 6 に示した。至適温度はコイは 35°C, ウサギではより高い 40°C であった。この差はコイとウサギの棲息する環境温度の差 (20-30°C) ほど大きくなかった。さらに，アレニウス・プロットから両酵素の活性化エネルギーを求めた図を Fig. 7 に示した。コイは Ea=10.7×10^3 (Kcal/mole), ウサギ

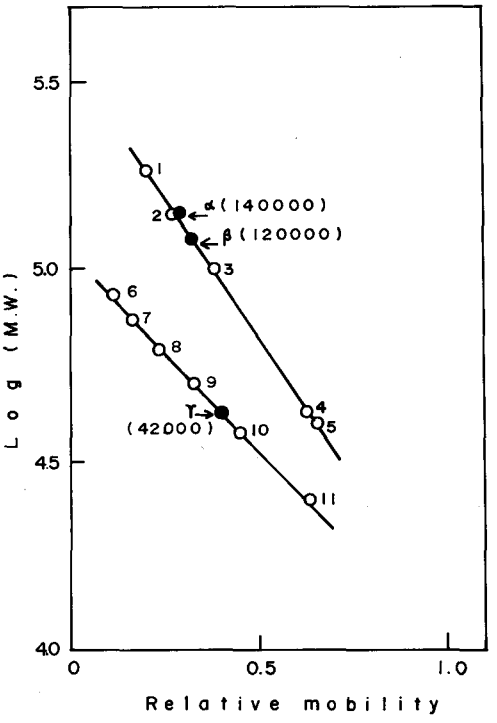

Fig. 4. Estimation of molecular weight of subunits of carp phosphrylase kinase on polyacrylamide gel containing 0.1% SDS. The molecular weight of the α and β subunits were determined on 5% gel using standard markers of RNA polymerase: 1 (180,000), 2 (140,000), 3 (100,000), 4 (42,000), and 5 (39,000) and that of γ subunit on 10% gel using cross linked cytocrom c: 6 (86,100), 7 (73, 800), 8 (61,500), 9 (49,900), and 11 (24, 600). (○), standard marker; (●), subunits of the enzyme.

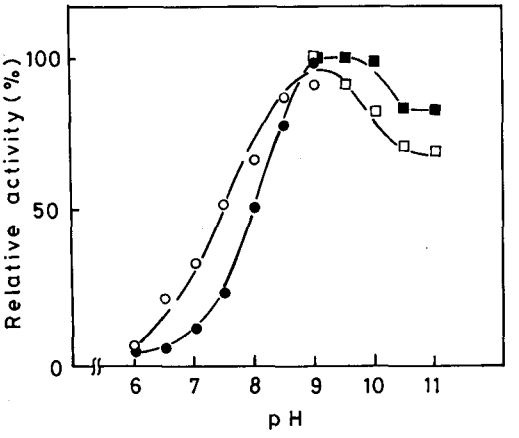

Fig. 5. pH dependency of phosphorylase kinase activity. Enzyme assay were carried out in the standard conditions except that buffer solutions were used as follows: (○, ●), Tris and β-glycerophosphate system; (□, ■), Tris and glycine system. Concentration of all buffers in the assay was 42 mM. Open symbols, carp enzyme (Peak I fraction); closed symbols, rabbit enzyme.

は 13.7×10^3 の値が得られ，活性化エネルギーについても両者の間に大きな相違はなかった。

(3) **ホスホリラーゼ b (ウサギ) に対する効果** ウサギ筋肉から精製したホスホリラーゼ b を基質たんぱくに用いてコイ本酵素の活性に対する濃度依存性を検討した。その結果を Fig. 8 に示した。ウサギでは測定時の pH により K_m が異なることが知られている[12]。ここではコイの Peak-I および II の区分について pH 6.8 と pH 8.2 の二点で測定した結果を示した。基質はんぱくの濃度の増加と共に活性の増加も見られ，pH 8.2 の方が活性が高く，また Peak-I よりも Peak-II の方が

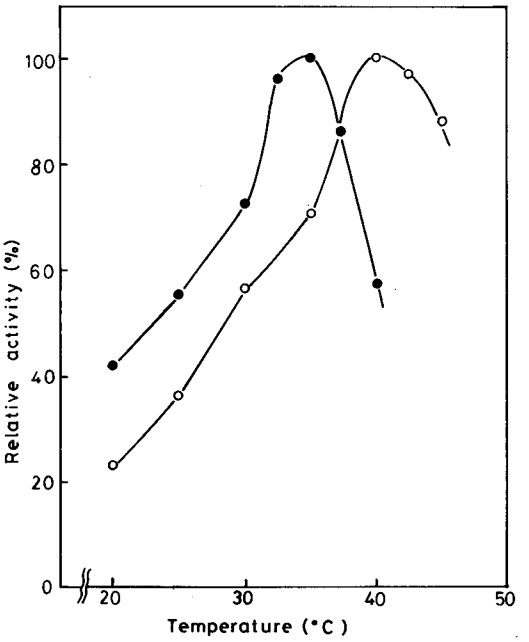

Fig. 6. Temperature dependency of phosphorylase kinase activity. Enzyme activity was assayed in the standard condition at various temperatures at pH 8.2. (●), carp enzyme (Peak I); (○), rabbit enzyme.

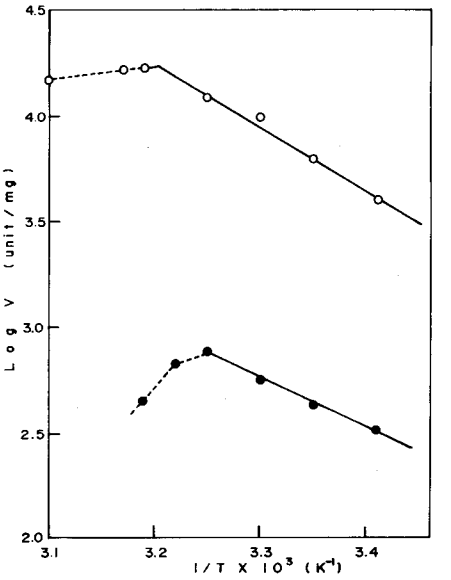

Fig. 7. Arrhenius plots for phosphorylase kinase activity. Experimental conditions were the same as described in Fig. 6. (●), carp enzyme (Peak I); (○) rabbit enzyme.

活性が大きかった。実験の困難性から，最大の値を与える基質たんぱくの濃度を用いることが不可能であったので，用いられた範囲の基質たんぱく濃度から Lineweaver-Burk の式により両逆数プロットをとると，直線関係が得られたので，それより K_m と V_{max} を求めた。pH 6.8 において，K_m は二つの区分で異なり Peak-I と Peak-II の K_m は各々330 μM と 500 μM になり，V_{max} は 1000 (unit/mg) と 1670 (unit/mg) となった。親和力は Peak-I が強かったが，しかし，最大速度は逆になった。pH 8.2 においては両区分とも 170 μM の同じ K_m を示した。しかしながら V_{max} は 1790 と 2500 (unit/mg) となり Peak-II の方が大きかった。pH 8.2 の方が pH 6.8 よりも親和力は強く活性も高く，より少ない基質たんぱく量で同じ活性を発現することを示す。この値はウサギの不活性型 (250 μM) と活性型 (80 μM)[13] の中間に位置した。普通の活性測定に用いる基質たんぱく濃度は 70 μM であるので，pH 8.2 でも最大活性の 30% しか測定されていない。

(4) **ATP と Mg^{2+} の効果** 前述したように，活性測定時の pH (6.8 および 8.2) がホスホリラーゼ b の K_m に大きな効果をもたらしたが，もう一つの基質である ATP に対する K_m と ATP と Mg^{2+} の濃度比との関連について両 pH で検討した。まず，Mg^{2+} 濃度を 10 mM (通常の活性測定の際にもちいられる) に固定して ATP 濃度のみを変えて両 pH における活性に対する ATP の濃度依存性を Fig. 9 に示した。Peak-I と Peak-II の濃度依存性はいずれの pH においても同じ傾向を示したが pH 8.2 の方にその効果が著しい。最大活性は 3-4 mM の ATP 濃度で得られ，それより大きい濃度では抑制的であった。また，最大活性の得られる ATP/Mg^{2+} 濃度比は 0.25-0.30 であった。これらの結果はウサギの場合[12] とよく類似していた。両逆数プロットの直線部分より求めた

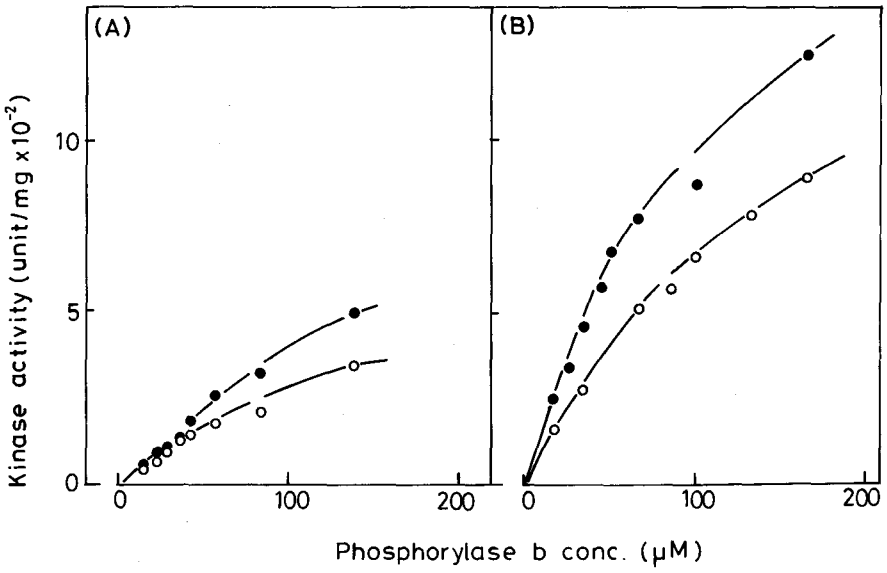

Fig. 8. Effect of phosphorylase b concentrations on carp phosphorylase kinase activity. Enzyme activity was assayed at pH 6.8 (A) or pH 8.2 (B) in the standard conditions except that phosphorylase b concentration was varied. (○), Peak-I; (●), Peak-II. The molecular weight of rabbit phosphorylase b was calculated on subunit molecular weight of 100000.

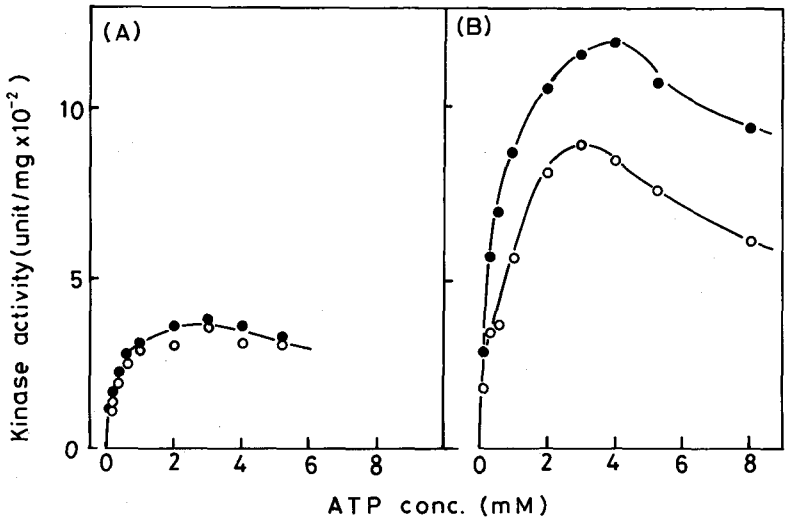

Fig. 9. Effect of ATP concentrations on carp phosphorylase kinase activity at a given Mg^{2+} concentration (10 mM). Enzyme activity was assayed at pH 6.8 (A) or pH 8.2 (B) in the standard conditions except that ATP concentrations were varied. (○), Peak-I; (●), Peak-II.

K_m は pH 6.8 においては Peak-I および II は各 300 と 360 μM の値をもち，pH 8.2 の値はそれぞれ 440 と 480 μM と得られた。従って ATP に対する K_m は pH 6.8 の方が小さく，ATP の親和力が強い。pH が高くなると K_m が大きくなり，この点に関してはホスホリラーゼ b の場合とは異なった。しかし二つの活性区分で余り差は無かった。ウサギの pH 8.2 の K_m は 220 μM と報告され[13]，コイの場合よりも二倍の ATP の結合の強さを示した。

次に活性に及ぼす Mg^{2+} 濃度の効果を検討した。ATP の関与する反応には常に Mg^{2+} 濃度が影響を与えるからである。ATP 濃度を 3 mM に固定して，Mg^{2+} 濃度のみを変えて測定した。Peak-I および II 区分についての結果を Fig. 10 に示した。いずれの pH においても両者は同じ Mg^{2+} 濃度依存性を示した。最大活性は 10-20 mM の Mg^{2+} 濃度で得られ，20 mM 以上でやや抑制的であった。両逆数プロットによる解析を試みたが Mg^{2+} 濃度と活性の間には，直線関係が得られなかった。S 字曲線を示すことから何か相互作用を暗示され，Mg^{2+} の複雑な効果を予想された。

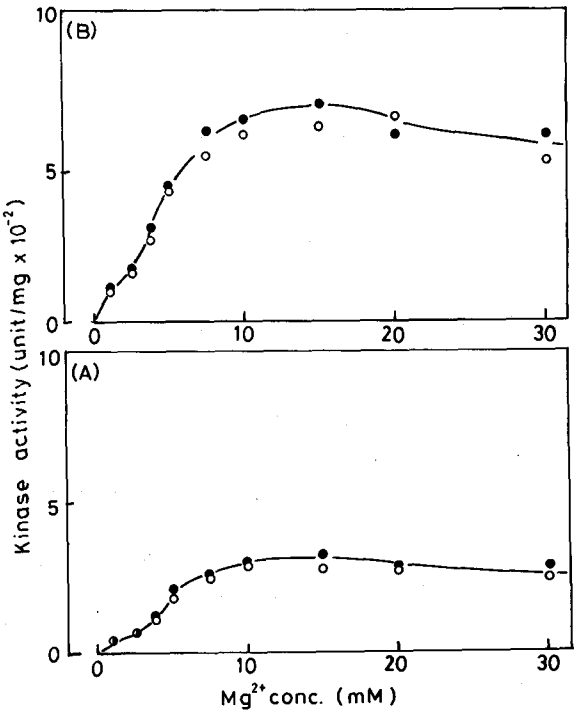

Fig. 10. Effect of Mg^{2+} concentrations on carp phosphorylase kinase activity at a given ATP concentration (3 mM). Enzyme activity was assayed at pH 6.8 (A) or pH 8.2 (B) in the standard conditions except that Mg^{2+} concentrations were varied. (○), Peak-I; (●), Peak-II.

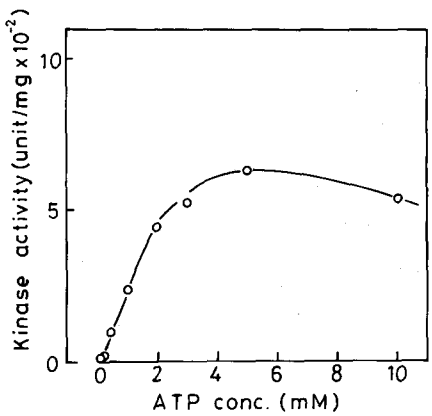

Fig. 11. Effect of ATP concentrations on carp phosphorylase kinase activity at a constant ratio of ATP/Mg^{2+} (0.30). Enzyme activity was assayed at pH 8.2 in the standard conditions except that both ATP and Mg^{2+} concentrations were varied.

前述したように，ATP/Mg^{2+} の濃度比が 0.3 のときに最大活性を示した。ウサギにおいて，この濃度比を一定 (0.3) にして ATP に対する K_m を求めると，その値は Mg^{2+} 濃度を 10 mM と固定した時の値よりも大きくなり，見かけ上，ATP に対する親和力が小さくなる[12]。この点について pH 8.2 においてコイの場合と比較検討した。ATP と Mg^{2+} 濃度を変えるが，各測定点においてはその濃度比を 0.3 と一定して ATP に対する活性変化を Fig. 11 に示した。この場合，最大活性は 5 mM 付近で得られ前述の Fig. 9 に見られたように Mg^{2+} 濃度を固定した場合に得られた値 (3-4 mM) よりやや高濃度側にあった。また，両逆数プロットは直線になり，それより求めた ATP に対する K_m は 2.1 mM であり，Mg^{2+} 濃度を固定した時の ATP の K_m (440 μM) よりも 5 倍大きくなり，見かけ上，親和力が小さくなった。K_m 値もウサギの本酵素の 4.3 mM[12] より小さくなった。しかし，ツノザメの 1.9 mM[9] とほとんど一致した。以上，コイとウサギの本酵素の各種の基質に対する依存性と K_m 値について検討した結果，K_m 値に両者の間で若干の相違が見られたが，その依存性はよく類似した。また，コイの Peak-I および II 区分の基質に対する依存性もよく似ていた。

考　　察

これまでコイの本酵素の理化学的と触媒的性質を述べ他の品種の本酵素の性質との比較を行った。本酵素の精製に際に，ウサギとツノザメの場合と同様にコイの本酵素も重合し易く，重合体の生成することを明らかにした。コイの本酵素の正確な分子量を測定出来なかったがウサギの本酵素の分子量の 1.3×10^6 ダルトンより大きいことがゲルろ過やイオン交換クロマトグラフ法から知られ，P-セルロースカラムから溶出順序が重合度と関連するとすれば，コイの Peak-I に相当する区分でもウサギのものよりも大きく 2-3 分子の重合体となるであろう。また，サブユニット組成において γ 成分が他のサブユニット成分よりも倍多く含まれていた。ツノザメ[9] も γ 成分が 0-8 の範囲に亙って変動すると報告されている。少なくとも水棲の生物においては γ 成分が変動し易い傾向にあるかもしれない。またツノザメでは γ 成分は触媒ユニットでないと報告されている。コイの γ 成分の機能について明らかにしえなかったが，トリプシンによる限定分解を受けることが他の本酵素と異なることを報告した[3]。コイの γ 成分が分解を受けると活性も減少するのでウサギと同様に触媒ユニットと推定されるが，しかしこの成分の複数化やその機能に多くの問題を残している。

本酵素はホスホリラーゼ b をりん酸化して活性型の酵素への転換を触媒をするが，基質がたんぱく質という高分子物質であるため動物種の起源により，同じ基質たんぱくでもいくらかの構造的変化が想像されるので，基質として作用するときに，触媒力に差があらわれると考えられる。これについて，コイの本酵素によるりん酸化がコイとウサギの両種のホスホリラーゼ b を用いたときに，異なることを既に報告した[1]。ここでは，基質たんぱく質にはウサギのホスホリラーゼ b を用いているので，コイのホスホリラーゼ b を基質とした時と K_m 値を異にし実際にコイの生体内で行われる状態を示していないかもしれない。実際の活性測定にはウサギの方がよい基質になるがこの点について未だ検討していない。ツノザメ[9] においてツノザメとウサギのホスホリラーゼの違いを比べ，K_m 値が pH 6.8 ではツノザメの方に，また pH 8.2 においてはウサギの方に親和力が強いと報告されている。生理的条件では本来の基質たんぱく質がよく作用するかもしれないことを示唆する。

これまで調べたコイの本酵素の性質をウサギとツノザメのものと比較した表を Table 2 と 3 に一括して示した。

Table 2. Comparison of physiochemical properties of phosphorylase kinases.

	Carp	Dogfish[a)]	Rabbit
Molecular weight of phosphorylase kinase (dalton)	1.44×10^6	1.30×10^6	1.28×10^6[b)] (1.33×10^6)[c)]
Molecular weight of subunits (dalton)			
α	140000	131000	145000
β	120000	118000	128000
γ	42000	45000	45000
δ	17000		17000
Molar ratio of subunits ($\alpha:\beta:\gamma:\delta$)	1 : 1 2 : 1	$1:1:n_{0-8}:(1)$	1 : 1 : 1 : 1[d)]
Subunit composition	$(\alpha\beta\gamma_2\delta)_4$		$(\alpha\beta\gamma\delta)_4$[d)]

[a)]: Pocinwong, in Reference(9); [b)]: Cohen, in Reference(5);
[c)]: Hayakawa et al., in Reference(6); [d)]: Shenolikar et al., in Reference (11).

Table 3. Comparison of some catalytic properties of phosphorylase kinases.

	Carp	Dogfish[a)]	Rabbit[b)c)d)]
Optimum pH	8.5-9.5	8.3	9.0-10.0
Optimum Temperature	35°C		40°C
Activation Energy (Kcal/mol)	10.0×10^3		13.7×10^3
Ratio of activity (pH 6.8/pH 8.2)	0.3-0.4	0.5	0.05-0.08
Ratio of activity for Trypsin-treated Enzyme	0.50	0.88	0.99
K_m for phosphorylase at pH 6.8(μM)	330	167	
〃 at pH 8.2(μM)	170	84	250[c)]
K_m for ATP with 10 mM Mg^{2+} at fH 6.8(μM)	300	250	(240)[d)]
〃 at pH 8.2(μM)	440	70	220[c)](310)[d)]
K_m for ATP at a given ratio of ATP/Mg^{2+}(0.3)	2.1(mM)	1.9(mM)	4.3(mM)[d)]

[a)]: Pocinwong, in Reference (9); [b)]: Author's data;
[c)]: Chan et al., in Reference(13); [d)]: Krebs et al., in Reference(12).

要　　約

魚類筋肉におけるグリコーゲン代謝，とくに分解系の詳細を知る目的で分解代謝系の鍵酵素となるホスホリラーゼキナーゼを取り上げ，サブユニット組成と触媒的性質を検討した。主な結果は次のようになった。

1. 精製時に分離された二つの活性区分の一つは酵素の重合体の生成による分離であることを明らかにした。

2. サブユニットの分子量は α 成分は 1400000, β 成分は 120000, γ 成分は 42000, δ 成分は 17000 ダルトンと測定された。

3. 本酵素のサブユニット組成は $(\alpha\ \beta\ \gamma_2\ \delta)_n$ となり，最小の分子量を 1.44×10^6 ダルトンと推定した。

4. 温度，pH 依存性，基質濃度に対する K_m を検討した結果，二つの活性区分はほとんど類似

した性質を示し，重合体による性質の差はなかった。また，一部の性質（温度，pH 依存性，活性比）を除くと，反応速度論的性質はウサギの場合とかなりよく類似した。

文　　献

1. 川田倫夫・柴田　猛 (1986). コイ筋肉ホスホリラーゼの活性化. 日水誌, **52**, 1401-1407.
2. 川田倫夫・柴田　猛 (1986). コイ筋肉ホスホリラーゼキナーゼの活性化とりん酸化. 同誌, **52**, 1409-1416.
3. 川田倫夫・柴田　猛 (1986). コイ筋肉ホスホリラーゼキナーゼのカルシウムと他の因子による活性化. 同誌, 53, No. 1 印刷予定
4. 川田倫夫・柴田　猛 (1984). コイ筋肉ホスホリラーゼ b キナーゼの精製とその触媒的性質. 同誌, **50**, 287-292.
5. Cohen, P. (1973). The subunit structure of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase, and the molecular basis of its activation reactions. *Eur. J. Biochem.* **34**, 1-14.
6. Hayakawa, T., Perkins, J.P., Walsh, D.A. and Krebs, E.G. (1973). Physicochemical properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *Biochemistry*, **12**, 567-573.
7. Pocinwong, S., Blum, H. and Fischer, E.H. (1981). Phosphorylase kinase from dogfish skeletal muscle. Purification and properties. *Biochemistry*, **20**, 7219-7226.
8. Delange, R.G., Kemp, R.G., Riley, W.D., Cooper, R.A. and Krebs, E.G. (1968). Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by adenosine triphosphate and adenosine 3′, 5′-monophosphate. *J. Biol. Chem.* **243**, 2200-2208.
9. Pocingwong, S. (1975). Regulation of glycogen breakdown in relation to muscle contraction in the pacific dogfish. Ph. D. Thesis, Washington University. 225 p.
10. Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, G., Cohen, P.T.W., Vanaman, T.C. and Nairn, A.C. (1978). Identification of the Ca^{2+}-dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *FEBS Lett.* **92**, 287-293.
11. Shenolikar, S., Cohen, P.T.W., Cohen, P., Nairn, A.C. and Perry, S.V. (1979). The role of calmodulin in the structure and regulation of phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **100**, 329-337.
12. Krebs, E.G., Love, D.S., Bratvold, G.E., Trayser, K.A., Meyer, W.L. and Fischer, E.H. (1964). Purification and properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase b kinase. *Biochemistry*, **3**, 1022-1033.
13. Chan, K-F.J. and Graves, D.J. (1982). Rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase catalytic and regulatory properties of the active $\alpha\ \gamma\ \delta$ and $\gamma\ \delta$ complexes. *J. Biol. Chem.* **257**, 5948-5955.