

氏名	寺 田 和 豊
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1379 号
学位授与の日付	平 成 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	部 位 特 異 的 変 異 法 に よ る ホ ス ホ エ ノ ール ピ ル ビ ン 酸 カ ル ボ キ シ ラ ー ゼ の 構 造 一 機 能 相 関 に 関 す る 研 究
論文調査委員	(主 査) 教 授 鈴 木 仁 美 教 授 郷 信 廣 教 授 伊 藤 維 昭

### 論 文 内 容 の 要 旨

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) はホスホエノールピルビン酸に炭酸水素イオンを固定して、オキサロ酢酸を生成する反応を触媒とする酵素である。本酵素は大部分の細菌、原生動物、全ての植物に存在し、主としてクエン酸サイクルにオキサロ酢酸を供給する補足的な役割を果たしている。その他にトウモロコシやサトウキビなどの高い光合成能を有する  $C_4$  植物では、PEPC のアイソザイムが存在し、初期炭酸固定酵素として重要な働きを行っている。また、本酵素は一般にアロステリック酵素であり、そのエフェクターの種類は生物種によって多様性に富んでいる。PEPC の活性発現にはヒスチジン残基の関与が示唆されているが、その位置は特定されていない。一方、現在までにその構造が明らかとなった10種類の PEPC のアミノ酸配列上で、ヒスチジン残基は2カ所において保存されているに過ぎない。そこで申請者は PEPC の触媒部位や制御部位に位置するアミノ酸残基の特定を目指して、部位特異的変異法により大腸菌酵素の2つの保存性ヒスチジン残基 (His138 と His579) を他のアミノ酸残基に置換した変異型酵素を調製し、その解析を行った結果、以下の新しい知見を二編の主論文として発表している。

#### 1) His579 の果たす役割

His579 周辺の配列は高い保存性を持ち、PEPC に固有の2回の繰り返し配列 Gly-Arg-Gly-Gly が存在することから、基質ホスホエノールピルビン酸の結合部位であることが推測されていた。そこで His579 をアスパラギンもしくはプロリンに置換した変異型酵素 (H579N と H579P) の性質を調べた。これらの変異型酵素はいずれも活性を有しており、均一精製した H579N の最大速度は野生型酵素の70%であった。基質とコファクターなどのリガンドのうちで、野生型酵素と変異型酵素でとくに大きな違いがみられたのはホスホエノールピルビン酸に対する半飽和濃度であり、各変異型酵素とも24倍に増大していた。また、アロステリックエフェクターに対する感受性も、変異型酵素は野生型酵素と大きく異なっていた。なかでもアセチル-CoA に対する半飽和濃度が20倍以上に増大していたが、ラウリン酸に対する半飽和濃度に変化はみられなかった。さらに活性化因子の濃度が無限大の時に達成される最大速度がフルクトース-1,

6-ビスリン酸, GTP, ラウリン酸で著しく低下していた。置換が高次構造におよぼす影響についてはクロマトグラフィーにおける挙動や熱安定性から検討しており, H579N はおおむね野生型酵素と同様であったが, H138P はやや不安定になっていることが示唆された。以上の結果から His579 は触媒機能に不可欠ではないものの, 触媒能および制御能に重要であることが示された。

## 2) His138 の果たす役割

もう一方の保存された His138 をアスパラギンに置換した変異型酵素 H138N は触媒活性を全く示さなかった。そこで PEPC の反応機構として提唱されている段階的反応機構を考慮して, H138N の均一精製標品を用いて, 一段階目の部分反応を触媒しうるか検討したところ, 炭酸水素イオンとマグネシウムイオンに依存したホスホエノールピルビン酸の加水分解反応を有することを見いだした。H138N の示すこの活性の速度論的解析を行った結果, 最大速度は野生型酵素の正規の反応の 1% であり, ホスホエノールピルビン酸に対する半飽和濃度が野生型酵素の 70 倍に増大していることを明らかにした。さらに野生型酵素のアロステリック活性化因子, アロステリック阻害因子に対して感受性を示すことを確認した。以上の結果から PEPC の反応機構は, ホスホエノールピルビン酸を基質とした時にも, カルボキシリン酸の生成反応とカルボキシル基の転移反応の 2 つの部分反応から成り立っており, この 2 つの部分反応を切り離し得ることを示した。また, PEPC 触媒能において必須とされてきたヒスチジン残基を初めて同定したこととなり, His138 が二段階目の部分反応に必須であることを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

本申請論文はホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの触媒反応機構とアロステリックエフェクターの生物種による多様性の分子的基礎を明らかにすることを旨として, 触媒部位に位置すると考えられるヒスチジン残基の特定を部位特異的変異法により行った研究からなり, 2 編の論文として発表されている。主論文 1 は本酵素に固有の 2 回の繰り返し配列中に存在する保存性ヒスチジン残基の役割を明らかにするために, 大腸菌酵素のこのアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置換した 2 種類の変異型酵素を調製して, それらの速度論的性質とアロステリックエフェクターに対する感受性を調べて, このヒスチジン残基が果たす役割を検討したものである。主論文 2 は, もう 1 つの保存されたヒスチジン残基をアスパラギンに置換した変異型酵素を調製して, 活性を完全に喪失していることを明らかにした。つづいて, 本酵素の反応機構として提唱されている段階的反応モデルを考慮して, 部分反応の有無を検討し, この変異型酵素が一段階目の部分反応を触媒していることを示した。その結果, 本酵素のこの保存性ヒスチジン残基が, 二段階目の部分反応に必須なアミノ酸残基であると結論した。

研究内容を審査した結果, 特に顕著な成果として次のような点があげられる。

1) 申請者の研究はホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼについて初めて, 部位特異的変異法という遺伝子操作による解析を行ったものであり貴重な研究といえる。本酵素は約 1000 個のアミノ酸残基よりなるポリペプチドの 4 量体であり, 大きな酵素である。これまでその一次構造が明らかとなった全ての本酵素において保存されている 2 つのヒスチジン残基の役割に関する知見は, 本酵素の構造と機能の相関に関する研究として普遍的な意味をもつものである。この点で本研究は先駆的であると評価できる。

2) ホスホエノールピルビン酸の結合部位に位置すると推測されてきた保存性ヒスチジン残基を部位特異的変異法により他のアミノ酸残基に置換した変異型酵素を調製して、その酵素学的性質を検討しこのアミノ酸残基が触媒機能に不可欠ではないものの、触媒能およびアロステリックな制御能に重要であることを明らかにした。

3) もう1つの保存性ヒスチジン残基をアスパラギンに置換した酵素は完全に触媒活性を失っていたことから、この残基が触媒機能に必須であることをはじめて明らかにした。さらに、この変異型酵素が一段階目の部分反応を触媒することを明らかにした。この知見はこれまで提唱されてきた二段階反応説を酵素の側から示した重要な知見といえる。この変異型酵素を用いれば、本酵素の仮想的な反応中間体、カルボキシリン酸、を同定することが可能となると思われ、反応機構の分子的解明に向けて重要な寄与をなすものと考えられる。

本酵素は他の多くの炭酸固定酵素と異なり、化学的に反応性に乏しい炭酸水素イオンを基質としており、その反応機構の解明が待たれるところである。また、本酵素はアミノ酸の生合成において鍵となる酵素であり、 $C_4$ 植物の光合成では中心的な役割を果たしているため、以上で述べてきた研究成果は単に学術的価値にとどまらず、遺伝子操作によって酵素機能を改質して工業的にアミノ酸発酵を行わせたり、植物の光合成機能を高めるといった応用研究の面からも興味深い内容を含んでいる。地球環境対策に関して、増加しつつある大気中の二酸化炭素を有用な物質に転換する上でも、炭素固定酵素である本酵素は有力視されているので、今後の展開が期待される場所である。従って、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。