

氏名	静田裕 しずた ゆたか
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第411号
学位授与の日付	昭和47年5月23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	医学研究科生理系専攻
学位論文題目	<b>CRYSTALLIZATION AND CHARACTERIZATION OF ADENOSINE 5'-MONOPHOSPHATE-DEPENDENT THREONINE DEAMINASE FROM <i>ESCHERICHIA COLI</i></b> (大腸菌から分画したAMP依存性スレオニン脱アミノ酵素の 結晶化と性質) (主査) 論文調査委員 教授 沼正作 教授 藤原元典 教授 早石修

### 論文内容の要旨

最近、ある種の酵素の触媒活性が特定の低分子物質によって賦活化される、或いは阻害を受けるという例が数多く報告され、この現象の生理的意義が注目を集めている。一般にアロステリック効果と呼ばれるこの様な現象は、細胞内での物質代謝の調節に主要な役割を演ずるものと考えられており、その機構に関してはそれら低分子物質の結合による酵素蛋白質の構造変化に由来するものと推量されているが、その詳細については不明な点が多い。従ってこの種の酵素とその触媒活性を調節する諸因子との相互作用を研究することは、物質代謝の調節という生物の持つ合目的性を分子のレベルで解明する為に貴重な貢献を果たすものと思われる。そこで著者は上記現象の代表的1例とされる大腸菌スレオニン脱アミノ酵素のAMPによる活性化機構を究明するため下記の実験を行なった。

本酵素は、L-スレオニンを分解して、 $\alpha$ -ケト酪酸とアンモニアを生ずる反応を触媒する酵素である。助酵素としてピリドキサルリン酸を含有することが以前から示唆されており、またAMPがないと殆んど触媒活性が認められないことから、AMPがアロステリック因子であることが最近の当教室の研究で明らかにされた。しかし本酵素は著しく不安定でありその精製が極めて困難であった為、酵素の性質やAMPによる活性化機構の詳細に関してはなお未知の点が多かった。その為著者は以下に述べる特殊な方法を創案して、まづ本酵素を純粋な結晶状に単離する方法を確立し、ついでAMP及びピリドキサルリン酸と本酵素蛋白質の相互作用について解析を行なった。

まず培養条件を検討した結果、大腸菌をL-スレオニンとL-セリンに適応させると、従来の報告よりも比活性が約10倍高い粗酵素が得られることを見出した。そこでこの適応菌をアルミナで磨砕して粗抽出液を得た後、全精製過程でAMP及びメルカプトエタノールを共存させて酵素の安定化を図りつつ約70倍精製すると超遠心的、電気泳動的に均一な結晶蛋白を得ることができた。

結晶酵素は鮮明な黄色を呈しており可視部415 m $\mu$ に極大吸収が認められる。さらに同部に励起極大を有する蛍光と円偏光二色性が認められ、これらはいずれも酵素蛋白に結合したピリドキサルリン酸に由来

するものと考えられる。そこで諸種方法を用いて含有ピリドキサルリン酸の定量を行なうと、酵素蛋白 1 mg 中に約 6.35  $\mu\text{g}$  のピリドキサルリン酸が結合していることが明らかになった。このことは本酵素の分子量が沈降定数 ( $8.16 \times 10^{-13} \text{cm}^2/\text{sec}$ ), 拡散定数 ( $5.20 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{sec}$ ), 偏比容 ( $0.738 \text{ml/g}$ ) から約 147,000 と推定される知見と合わせて考えると、本酵素 1 分子に約 4 個のピリドキサルリン酸が結合していることを示すものである。

次に本酵素は結晶化に際してアロステリック因子である AMP の存在が不可欠であった。このことは得られた結晶標品が酵素蛋白と AMP との複合体から成っていることを示唆している。これを確認する為に平衡透析法によって AMP の結合部位数を調べると、酵素 1 分子につき 3.7 個の AMP が結合し、その解離恒数は  $5.2 \times 10^{-5} \text{M}$  であった。この恒数は反応速度論的に求めた本酵素の AMP による活性化定数  $7 \times 10^{-5} \text{M}$  とよく一致している。すなわち本酵素に 4 個の AMP が結合した時、酵素が活性化され同時にその蛋白構造が安定化されて結晶化が可能となるものと考えられる。

以上の如く本論文は、大腸菌から精製したスレオニン脱アミノ酵素をアロステリック因子 AMP との複合体として結晶化し、その主要な基礎的性質を解明したものであり、今後のアロステリック効果の研究、ひいては物質代謝調節機構の研究に大いに役立つものと思われる。

#### 論文審査の結果の要旨

アロステリック酵素は物質代謝の調節に重要な役割を果している。著者はアロステリック酵素の一つである大腸菌スレオニン脱アミノ酵素の AMP による活性化の機構を究明するため、本酵素を純粋な結晶状に単離する特殊な方法を確立した。すなわち、大腸菌を L-スレオニンと L-セリンに適応させ、全精製過程を通じ AMP とメルカプトエタノールを共存させることにより結晶酵素を得た。この酵素標品について平衡透析法などの方法を用い検索した結果、酵素一分子につき 4 個の AMP 分子が結合し、その際酵素の活性化と同時にその蛋白構造が安定化されるという結論に達した。

以上のごとく本論文は大腸菌スレオニン脱アミノ酵素をアロステリック因子である AMP との複合体として結晶化し、その主要な基礎的性質を明らかにしたものであり、アロステリックな代謝調節の機構の解明に貢献するところ大である。

よって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。