

氏名	寺岡弘文
	てら おか ひろ ぶみ
学位の種類	理学博士
学位記番号	理博第267号
学位授与の日付	昭和47年11月24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	理学研究科化学専攻
学位論文題目	アロステリック酵素・PEP carboxylase の構造と機能に関する研究
	(主査)
論文調査委員	教授 香月裕彦 教授 波多野博行 教授 大西俊一

### 論文内容の要旨

Phosphoenolpyruvate(=PEP) carboxylase は、解糖によって生じた PEP に炭酸を固定し、オキサロ酢酸を生成する反応を触媒し、TCA サイクルの生合成機能を保持する重要な酵素である。大腸菌の本酵素は分子量約36万の4量体であり、アスパラギン酸(=Asp)によって阻害を受け、フルクトース-1,6-ジリン酸(=FDP)、アセチル CoA、脂肪酸によって活性化を受けるアロステリック酵素である。

申請者は大腸菌の本酵素がこのように多くのエフェクターによって調節を受ける点に関心をいだき、エフェクターとの結合によって酵素蛋白のコンフォーメーションがどのように変化するかという点について研究を行った。

まず、本酵素はサブユニット当り8個のSH基をもつが、そのうち2個は反応性に富み、5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(=DTNB)と容易に反応する。しかし、この状態では、酵素の活性ならびにアロステリックな性質は全く変化を受けなかった。これ以上、残りの6個のSH基をDTNBと反応させるためには、酵素をsodium dodecyl sulfateによって変性させる必要があった。DTNBの代りにN-ethylmaleimide(=NEM)を用いると、酵素はみかけ上一次反応的に失活した。この場合、PEPのアナログであるフォスフォ乳酸を加えておくと、NEMによる失活は保護された。したがって、NEMとの反応にあずかったSH基の一部は活性中心に存在するものと推定された。<sup>14</sup>C-NEMを用いて、NEMがサブユニット当り何個のSH基と反応するかを調べた結果、4個のSH基が反応していることが分った。

次に本酵素のNEMによる失活速度に及ぼすエフェクターの効果が調べられた。その結果、Aspは強い保護作用を、アセチル CoAは弱い保護作用を示した。これに反して、EDPは影響を与えず、ラウリン酸は失活を促進した。これらのエフェクターの影響の違いは、エフェクターがそれぞれ独自のアロステリック部位に結合することにより、酵素のコンフォーメーションを変え、活性中心に存在するSH基に影響を及ぼし、その結果NEMとの反応性に多様な変化を与えたと考えられた。この事実から、4種のエフェクターとの結合によって4種の異なるコンフォーメーションをとること、これに何もエフェクターを

結合していない状態を加えて、活性調節と関連して、本酵素は少なくとも5種のコンフォメーションの状態をとることが推測された。

酵素修飾の別の手段として光酸化法が採用された。この処理により恐らくヒスチジン残基が修飾され、酵素はみかけ上一次反応的に失活した。この場合には、フォスフォ乳酸も4種のエフェクターもこの失格に対し影響を与えなかった。

光酸化により部分的に失活させた酵素についてエフェクターの影響を調べると、Asp および FDP に対して感受性を失っていることが分かった。このことから、Asp と FDP のアロステリック部位は、それぞれ他のエフェクターの結合部位とは異なり、互いに独立していることが示唆された。その他、酵素活性の最大速度の半分を与えるに必要な PEP 濃度も減少し、PEP の協同作用性も消失していた。これに反して、NEM 修飾によって部分的に失活させた酵素では、エフェクターに対する脱感作は観察されなかったが、エフェクターによる最大活性化率の変化が認められた。

参考論文(1)は大腸菌の PEP carboxylase の調節酵素としての役割や性質を明らかにしたものであり、同(2)は同上酵素ならびに PEP carboxykinase について、菌を種々の炭素源で培養した時の酵素レベルを調べ、酵素量の調節を明らかにしたものである。

### 論文審査の結果の要旨

アロステリック酵素が、その活性の調節と関連して、どのようなコンフォメーションをとるかという問題は、代謝の制御機構の解明において重要な問題である。これについて有名な Monod らのモデルおよび Koshland らのモデルがあるが、これまでに報告されたアロステリック転移を説明するには十分でない。とくに、多種類のエフェクターによって調節されるアロステリック酵素では不明の点が多く、エフェクターと結合する際に、その結合部位は互いに異なるのかまたはあるものは同じであるのか、明確にされたものは少ない。また、その際、酵素は何種類のコンフォメーションをとりうるのかという問題もあまり研究されていない。これは代謝調節において各エフェクターの生理的効果の独立性の有無という点で重要な問題である。

申請者は大腸菌の Phosphoenolpyruvate (=PEP) carboxylase の調節酵素としての諸性質(参考論文(1)や酵素量の調節(参考論文2))を研究した後、上記の問題をとりあげた。

本酵素は、エフェクターの結合により物理的性質には著しい変化をもたらさなかった。したがって、申請者は、まず、N-ethylmaleimide により酵素の SH 基を化学修飾し、その際の酵素の失活速度に及ぼすエフェクターの効果を調べ、各エフェクターがそれぞれ全く異なる影響を及ぼすことを見出した。この事実から、各エフェクターは酵素に結合することにより、それぞれ異なったコンフォメーションを与えると推論した。また、これらの実験から、酵素のサブユニットに存在する8個のSH基の存在状態や反応性がそれぞれ異なること、そのうち1~2個は活性部位に存在することを推測した。

申請者はまた、酵素のヒスチジン残基を修飾するための光酸化を行ったが、この処理により部分失活した酵素は、エフェクターのうちアスパラギン酸とフルクトース-1,6-ジリン酸に対し脱感作を起していることを見出した。

上記の事実および、その他の知見を考慮して、申請者は、大腸菌の PEP carboxylase の 4 種のエフェクターの結合部位が互いに異なり独立していること、エフェクターとの結合によって生じる酵素のコンフォメーションが互いに異なるものと考えた。また、これらの実験から、本酵素は少なくとも 5 種類の異ったコンフォメーションをとりうることを主張した。

前述したように、本酵素はエフェクターと結合しても、そのコンフォメーションの変化を物理的手段で検知することは困難であり、したがって、上記 5 種類のコンフォメーションを物理的性質の上から実体と対応させることには成功してはいない。この問題は今後に残された大きな問題であるが、申請者の研究は、酵素の化学修飾という手段でエフェクターの結合部位およびアロステリック酵素のコンフォメーションの多様性に関する知見を大きく前進させた点で高い価値をもつ。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。