

氏名	大和進 やまとすすむ
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第521号
学位授与の日付	昭和54年3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	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Dissociation and Association of Fumarase Subunits with Special Reference to the Formation of a Functional Tetramer (心筋フマラーゼの解離, 会合, 特に機能的四量体形成に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 佐野晴洋 教授 早石 修 教授 村地 孝

### 論文内容の要旨

オリゴマー酵素におけるサブユニットの解離会合と機能発現の関係についてはなお未解明の興味深い問題が残されている。著者はブタ心筋フマラーゼを用い、その解離会合に関する一連の研究を行った。

フマラーゼはフマル酸の水和によるL-リンゴ酸の生成を可逆的に触媒する酵素で、TCA サイクルの重要な酵素の1つである。ブタ心筋フマラーゼに関しては、尿素または塩酸グアニジン処理で分子量 $48,500 \pm 1,000$ の同一サブユニット4個に解離する四量体構造を有することは知られているが、一旦解離したサブユニットの再会合に成功した報告はない。

そこで著者は本酵素タンパク質のSH基に注目し、解離会合過程におけるSH基の保護を含む諸条件を検討した結果、以下に要約するとおり、完全活性を有する再会合四量体の取得に成功し、かつ、中間体としての二量体生成をも実証することができた。

1. 本酵素のサブユニット(不活性単量体)への完全解離には3~4M尿素(または0.5~1.0M塩酸グアニジン)の存在を必要とするが、単量体から完全活性四量体の再生成には、①透析によって尿素を除去する過程で溶媒中に10mMジチオスレイトール、0.1mMEDTA・2Na、10%グリセロールおよび200mMKClを保護剤として共存させること、および、②透析終了後の酵素溶液を25℃、2~3時間温置することが必須条件であることを知った。

2. 上記の諸条件下における本酵素タンパク質の構造と機能の変動を、物理的(蛍光スペクトル、円偏光二色性スペクトル、超遠心分析、分子量)、化学的(システインおよびチロシン残基滴定)および酵素学的(比活性、Km値、至適pH)測定により追跡した結果、完全に解離した不活性単量体と完全に活性を回復保持した再生四量体との中間に、酵素活性をもたないが二次三次構造上はほとんど区別しがたい二量体の存在を知った。

3. 尿素によって一旦単量体に解離した酵素タンパク質溶液から、保護剤存在下での透析によって尿素を除去した直後の標品を、4℃においてセファデックスG-200カラムクロマトグラフィーに供した結果、

この段階での標品は大部分不活性二量体であることが確認された。

4. ここに得られた不活性二量体は、ついで25℃、2～3時間温置することによって活性四量体に移行するが、この活性発現経過は、この間における酵素タンパク質のプロテアーゼ（トリプシン）感受性の経時的变化との間に、非常によい逆相関を示すことを見出した。この事実はまた、プロテアーゼが二量体・四量体間の構造変化を極めて鋭敏に識別しうるすぐれた試薬であることを明らかにしたものである。

以上の結果から、著者は(1)ブタ心筋フマラーゼの正常な触媒活性の発現には四量体形成が必須であることを明らかにするとともに、(2)四量体形成の意義の1つにはその強いプロテアーゼ抵抗性をもあげることができることを示唆した。

#### 論文審査の結果の要旨

オリゴマー酵素におけるサブユニットの解離会合と機能発現の関係を、ブタ心筋フマラーゼを材料として研究し、次の知見を得た。

1. 本酵素をサブユニット（不活性単量体）へ完全解離したのちに、これを再会合させて完全活性四量体を得る実験条件を確立した。

2. 解離会合過程における本酵素タンパク質の構造と機能の変動を、物理的・化学的・酵素学的測定により追跡した結果、不活性単量体から活性四量体への会合中間体として酵素活性をもたない二量体の存在することが明らかになった。

3. 不活性二量体は、緩やかな温度処理によって活性四量体に移行すること、および、この活性発現経過は、この間における酵素タンパク質のプロテアーゼ感受性の経時変化との間に非常によい逆相関を示すことを見出した。

以上の結果は、TCA サイクル上の重要酵素の1つであるフマラーゼの触媒活性発現機構の一端を明らかにするとともに、四量体形成の生物学的意義につき興味深い示唆を与えたもので、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。