

氏名	まつ お たか し 松 尾 貴 史
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2324 号
学位授与の日付	平 成 13 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	A Kinetic Study on Reaction Mechanism of Serine Proteases from the Viewpoint of Fluctuation of Enzyme (酵素分子の揺らぎを考慮したセリンプロテアーゼの反応機構についての速度論的研究)
論文調査委員	(主 査) 助教授 中 村 薫 教 授 大 須 賀 篤 弘 教 授 丸 岡 啓 二

論 文 内 容 の 要 旨

酵素による高効率な触媒機能は、酵素の活性中心に存在するアミノ酸残基の側鎖官能基の巧みな作用のみならず、触媒機構を担う官能基が最適な位置に再配列する等、反応過程中的酵素の配座変化という物理的要因が加わって達成されるものと考えられている。酵素の配座変化は、溶液中で酵素が揺らぐことによって誘起されるものであるが、このような観点から酵素反応機構を議論することは、ほとんどなされておらず漠然とした認識でしかない。

申請者は、酵素分子の揺らぎという観点から、酵素反応機構を解明するために、セリンプロテアーゼによる加水分解反応の反応速度に対する溶媒粘度効果を調べる方法により、酵素分子の揺らぎと触媒機構との関係を実験的に検証した。この方法は、酵素の触媒活性に関与する酵素の揺らぎは、ドメイン単位の遅い揺らぎであり、溶媒の粘性率に依存するという考察に基づいている。

まず、申請者は、粘媒体にグリセロール、シュークロースを用い、酢酸および *N*-保護アミノ酸の *p*-ニトロフェニルエステルの α -キモトリプシンによる加水分解について、アシル酵素を経由することを仮定した3段階機構に基づいて速度解析を行い、各段階における速度論パラメータの粘度依存性を調べた。そして、アシル酵素の生成段階と、基質のカルボン酸成分を放出する段階において、酵素の配座変化の効果が重要であるというデータを得た。

次に、申請者は、*N*-保護アミノ酸およびペプチドの *p*-ニトロアニリドについて、上記と同様の条件で反応速度に対する溶媒粘度効果を調べた。この場合、この段階の速度定数に対する溶媒粘度効果は小さく、エステルとは異なった傾向を示した。アシル酵素の生成時には、短寿命の四面体中間体を経由することが知られている。申請者は、エステルとアニリドの間で、粘度依存性が異なるのは、四面体中間体の生成には酵素の揺らぎの効果が存在するが、分解には、その効果はほとんど必要とされないからだ結論づけ、エステルとアニリド両方の測定結果を基に、酵素の揺らぎ(配座変化)を加味した反応スキームを提案した。

また、申請者は、 β -トリプシンおよびサブチリシンカールスバーグについても調べ、前者については、キモトリプシンと同様の結果が得られたが、後者については、*p*-ニトロアニリドの加水分解にも粘度依存性が観測された。

更に、申請者は、溶媒分子の揺らぎを考慮した反応速度論の実験的検証を目的として、キモトリプシンのアシル酵素生成段階の速度データについて、化学変化に先立って溶媒分子の再配列が起こることを仮定した2次元反応座標モデルによるデータの検討を試みた。速度定数(k)を粘度(η)に対してプロットした場合、温度効果はほとんどなかったことから、本反応系は、酵素の揺らぎのみに支配される系であることが確かめられた。しかし、速度定数の粘度依存性は、理論による予測($k \propto \eta^{-\alpha}$, $0 < \alpha \leq 1$)よりも強かった。これは、モデルが、均一系の反応を基にしたものであり、酵素反応に対しても成立するためには、 α の上限の撤回、あるいは酵素の構造変化等を加味した定式化が必要であることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

酵素による高効率な触媒機能は、酵素の活性中心に存在するアミノ酸残基の側鎖官能基の巧みな作用のみならず、反応過程での酵素の配座変化という物理的要因を考慮しないと説明ができない。酵素の配座変化は、溶液中で酵素分子が揺らいでいる中で、誘起されるものであるが、このような観点から酵素反応機構を議論することは、研究例の多いセリンプロテアーゼでさえ、ほとんどない。

申請者は、酵素の触媒活性に關与する酵素の揺らぎは、ドメイン単位の遅い揺らぎであり、溶媒の粘性率に依存するということを基に、セリンプロテアーゼによる加水分解反応について、反応速度に対する溶媒粘度効果を調べ、酵素分子の揺らぎと触媒機構との関係を実験的に検証した。

まず、申請者は、粘媒体にグリセロール、シュクロースを用い、酢酸および *N*-保護アミノ酸の *p*-ニトロフェニルエステルの α -キモトリプシンによる加水分解について、アシル酵素を経由することを仮定した3段階機構に基づいて速度解析を行い、各段階における速度論パラメータの粘度依存性を調べた。そして、アシル酵素の生成段階と、基質のカルボン酸成分を放出する段階において、酵素の配座変化の効果が重要であるというデータを得た。また、申請者は、種々の基質における結果から Induced-fit の存在を指摘している。

次に、申請者は、*N*-保護アミノ酸およびペプチドの *p*-ニトロアニリドについて、上記と同様の条件で反応速度に対する溶媒粘度効果を調べた。そして、この段階の速度定数に対する溶媒粘度効果は小さく、エステルとは異なった傾向を示すことを見出した。アシル酵素の生成時には、短寿命の四面体中間体を経由することが知られている。申請者は、エステルとアニリドの間で、粘度依存性が異なるのは、四面体中間体の生成には酵素の揺らぎの効果が存在するが、分解には、その効果はほとんど必要とされないからだとして結論し、酵素の揺らぎ（配座変化）を加味した反応スキームを提案した。

また、申請者は、本実験方法を、 β -トリプシンおよびサブチリシンカーカスバークに適用し、前者については、キモトリプシンと同様の結果が得られたが、後者については、*p*-ニトロアニリドの加水分解においても速度定数の粘度依存性を観測した。このことは、四面体中間体の分解過程においても、酵素の揺らぎの効果が存在することを示唆している。申請者は、たとえ同じ触媒機構を持つ酵素どうしても、揺らぎの効果は異なるケースがあると述べている。

更に、溶媒分子の揺らぎを考慮した反応速度論の実験的検証を目的として、キモトリプシンのアシル酵素生成段階の速度データについて、化学変化に先立って溶媒分子（本反応系では酵素分子）の再配列が起こることを仮定した2次元反応座標モデル（Sumi-Marcus 理論）によるデータの検討を試みた。

速度定数 (k) を粘度 (η) に対してプロットした場合、温度効果はほとんどなかったことから、本反応系は、酵素の揺らぎのみに支配される系であることが確かめられた。しかし、速度定数の粘度依存性は、理論による予測 ($k \propto \eta^{-\alpha}$, $0 < \alpha \leq 1$) よりも強かった。申請者は、モデルが、均一系の反応を基にしたものであり、酵素反応に対しても成立させるためには、 α の上限の撤回あるいは、酵素の構造変化等を加味した定式化が必要であると結論づけた。

本研究は、従来は漠然とした認識でしかなかった「酵素の揺らぎ」という要因を積極的に考慮し、その観点で酵素反応機構を実験的に検証しようとしたところに特徴がある。その結果、反応の各段階の速度定数の粘度依存性を調べるといった詳細な解析によって、「酵素分子の揺らぎを加味した反応スキーム」を提案しており、酵素化学の研究において新たな領域を開いたと考えられる。更に、遷移状態理論にとらわれない新しい反応速度理論に対して、実験的立場より考察を加えており、今後のこの方面の研究の進歩に大きな貢献をするものである。

なお、本申請論文に報告されている研究業績を中心として、関連した分野について試問した結果、合格と認めた。