

氏名 Dyah Iswantini  
 学位(専攻分野) 博士 (農学)  
 学位記番号 農博第1120号  
 学位授与の日付 平成12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 農学研究科応用生命科学専攻  
 学位論文題目 KINETICS AND THERMODYNAMICS OF *IN VIVO* HOLOENZYME FORMATION AND CATALYSIS OF QUINOPROTEIN GLUCOSE DEHYDROGENASE IN *E. COLI* CELLS  
 (大腸菌内キノプロテイングルコース脱水素酵素のホロ酵素形成速度とアポ型—ホロ型平衡および触媒活性)

論文調査委員 (主査) 教授 池田篤治 教授 廣瀬正明 教授 井上國世

### 論文内容の要旨

大腸菌は細胞膜にキノプロテイングルコース脱水素酵素 (mGDH) を持っている。しかし、この酵素はアポ型で存在する(補欠分子属であるピロキノリンキノン (PQQ) を欠いている) ため触媒活性を示さず、その生理機能は不明である。単離精製した mGDH は、酵素液に PQQ と  $Mg^{2+}$  を添加すると活性型 (ホロ型) になることが知られているが、大腸菌の菌体内でのアポ型からホロ型への変換と酵素活性発現についての研究は見られない。その主な理由はこのような系に適した実験方法が確立されていないことによる。本研究では、電気化学法の適切な利用によって、菌体内での mGDH のアポ型—ホロ型変換とグルコース酸化触媒活性を測定し、結果を定量的に解析した。その結果、得られた反応パラメータの意味を明らかにし、菌体一個当たりに含まれる酵素の平均分子数ならびに菌体内での酵素触媒反応の触媒定数を初めて求めた。また、PQQ と  $Mg^{2+}$  の菌体内取り込みに伴うホロ酵素形成過程について、その速度定数ならびにアポ型—ホロ型平衡定数を求めた。さらに、活性化された菌体内 mGDH の、エチレンジアミン 4 酢酸塩 (EDTA) による完全不活性化とその再活性化、緩衝液中での自発的不活性化過程についても測定を行い、その結果に基づいて PQQ と  $Mg^{2+}$  の菌体内 mGDH への結合状態について考察した。

1. 大腸菌懸濁液に  $1\mu M$  の PQQ と  $5mM$  の  $Mg^{2+}$  を加えて室温で 15 分放置すると菌体内 mGDH が活性型に変換されることを電気化学法で明らかにした。即ち、懸濁液にグルコースを加え、電子受容体 (2, 3-ジメトキ-5-メチル-1, 4-ベンゾキノン ( $Q_0$ ), ヘキサシアノ鉄酸 (III) イオン, フェナジメトサルフェイト (PMS), ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP),  $O_2$  など) を加えると、電子受容体が還元される。この還元速度をグルコース濃度、電子受容体濃度を様々に変化させて電気化学法で測定した。結果はミカエリス—メンテン型の速度式で解析でき、基質と電子受容体に対するミカエリス定数 ( $K_s$  および  $K_M$ ) と細胞触媒定数 ( $zk_{cat}$ ) によって、大腸菌の酵素触媒能が評価できることを明らかにした。 $K_s$  および  $K_M$  は其質、電子受容体の細胞壁透過速度の影響を含む見かけの値である。一個の細胞内に含まれる mGDH の平均分子数  $z$  が  $3.0 \times 10^3$  個であり、細胞内 mGDH の触媒定数  $k_{cat}$  が  $2.2 \times 10^3 s^{-1}$  と求められた。この細胞内 mGDH の  $k_{cat}$  は、精製 mGDH の触媒定数より 5 倍以上大きいことを明らかにした。

2. 炭素電極の表面に大腸菌を半透性膜でトラップして、グルコースと電子受容体  $Q_0$  を含む溶液に入れる。さらに、PQQ と  $Mg^{2+}$  をこの溶液に添加するとトラップされた大腸菌内の mGDH が徐々にホロ化され、細胞の酵素触媒活性が大きくなる。この電極は酵素触媒反応の速度を電流として検出できるので、ホロ型酵素の形成に伴う触媒反応速度の増加を電流の時間に依存した増大として観察できる。このことを検証するとともに、この電極で溶液内 PQQ の pM レベルの定量ができることを明らかにした。

3. グルコースと電子受容体  $Q_0$  を大過剰に含む溶液に大腸菌トラップ電極を入れ、5 mM の  $Mg^{2+}$  存在下 nM レベルの PQQ を添加すると徐々に電流が上昇し、その上昇速度は添加する PQQ 濃度に比例した。この結果を擬一次不均一反応の速度式で解析し、PQQ の細胞内アポ型 mGDH への結合速度定数を  $3.8 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$  と求めた。また、最初に大腸菌トラップ電極を 5 mM  $Mg^{2+}$  存在下 pM から nM オーダーの PQQ を含む溶液に入れ、17 時間以上室温放置し十分平衡化した後に、グルコースと  $Q_0$  を加えると時間に依存しない定常電流が得られた。電流の PQQ 濃度依存性から、アポ mGDH-PQQ 結合の解離定数  $K_{d,PQQ}$  を 0.82 nM と求めた。同様な方法で  $Mg^{2+}$  の細胞内アポ mGDH への結合速度定数を  $4.3 M^{-1}s^{-1}$  と求め、また、アポ mGDH- $Mg^{2+}$  結合の解離定数  $K_{d,Mg}$  を  $1.4 \times 10^{-4} M$  と求めた。 $Mg^{2+}$  の代わりに  $Ca^{2+}$  を用いた場合にも触媒活性が発現し、解離定数  $K_{d,ca}$  は  $4.2 \times 10^{-5} M$  と  $Mg^{2+}$  より小さな値となった。一旦ホロ化した細胞内 mGDH は EDTA 溶液中で完全に触媒活性を失ったが、グルコースと  $Q_0$  を含む液に入れて後、 $Mg^{2+}$  を加えるだけで触媒活性が 7 割程度回復した。その他の実験結果をあわせて、EDTA 処理では PQQ はかなりの部分が細胞内に留まっていること、 $Mg^{2+}$  (または  $Ca^{2+}$ ) が触媒活性に必須であることを明らかにした。ホロ mGDH が緩衝液中では徐々にアポ化して行くことも示した。

### 論文審査の結果の要旨

大腸菌は細胞膜にキノプロテイングルコース脱水素酵素 (mGDH) を持っているが、補欠分子属であるピロロキノリンキノン (PQQ) を欠いておりアポ型で存在するために触媒活性を示さず、その生理機能は不明である。このような背景の下、本論文では、電気化学法によって、大腸菌内での mGDH のアポ型-ホロ型変換とグルコース酸化触媒活性の測定を行っている。ホロ化させた細胞内 mGDH による触媒反応の定量的解析を行なうとともに、得られた反応パラメータの物理的意味を明らかにしている。また、PQQ と  $Mg^{2+}$  の大腸菌内取り込みに伴うホロ酵素形成過程について、その速度定数ならびにアポ型-ホロ型変換の平衡定数を求め、物理化学的視点から詳細な解析を行っている。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. 細胞内で起こる酵素触媒反応がミカエリス-メンテン型の速度式で解析できることを示し、解析で得られるミカエリス定数が細胞壁透過速度の影響を含む見かけの値であること、触媒定数が細胞一個当りのターンオーバー数に相当することなど、反応パラメータの持つ意味を明確にしている。

さらに、この触媒定数が、細胞内酵素の分子数  $z$  と細胞内酵素触媒定数  $k_{cat}$  の積であらわされることを示し、細胞内アポ mGDH を PQQ で滴定するという独創的手法により、 $z$  と  $k_{cat}$  の値の測定に成功していることは特筆に値する。細胞内酵素の触媒定数が単離精製したホロ酵素の触媒定数より 5 倍以上大きいという大変興味深い結果を得ている。

2. 電極表面に半透性膜でトラップされた大腸菌は、PQQ と  $Mg^{2+}$  を取り込んで大腸菌内のアポ mGDH がホロ型に変化していく。本論文は、この過程が電極に流れる電流の時間変化として追跡できることを示している。この方法の特色は電流が酵素反応速度に比例し、従ってホロ型 mGDH 量に比例するという点にあり、これまでに見られない全く新しい方法である。

3. 大腸菌トラップ電極を用いて、PQQ および  $Mg^{2+}$  取り込みによる大腸菌内ホロ mGDH 形成の速度定数を求め、アポ mGDH-PQQ 結合ならびにアポ mGDH- $Mg^{2+}$  結合の解離定数を求めている。ホロ mGDH の EDTA によるアポ化、緩衝液中での自発的アポ化についても検討を進め、アポ型-ホロ型変換について、速度論的および熱力学的視点からその詳細を論じている。

以上のように、本論文は、キノプロテイングルコース脱水素酵素の大腸菌内アポ型-ホロ型変換ならびに触媒活性について、電気化学的手法を用いて定量的に明らかにしており、機能生物学、酵素化学ならびに生物電気化学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 12 年 2 月 10 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。