

氏名	杉本悦郎 すぎもと えつ ろう
学位の種類	農学博士
学位記番号	論農博第17号
学位授与の日付	昭和38年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Studies on Crystalline Yeast Phosphoglyceric Acid Mutase (結晶酵母りんグリセリン酸ムターゼに関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 満田久輝 教授 小野寺幸之進 教授 緒方浩一

論文内容の要旨

本論文は、解糖の主経路に位置する酵素であるりんグリセリン酸ムターゼ (PGA mutase) の結晶標品を用いてその作用機作を速度論的に究明し、異性化酵素としての特性を明らかにするとともに、タンパク質化学の観点からも深く研究を行ない多くの知見を得たものであって7章にまとめられている。

第1章の緒論においては、本研究の目的、意義ならびに研究の経過などについて記述している。

第2章では、パン酵母からの本酵素結晶調製法についてのべ、さらに酵素活度の直接測定法である旋光度法を駆使して本酵素の基本的性質、すなわち pH optimum, 平衡恒数, $E_{1cm}^{1\%}$ (280m μ), $E_{280m\mu}/E_{260m\mu}$ などを求めた結果について記述している。

第3章では、本酵素の反応機構について論述している。本酵素反応は反応の進行と同時に助酵素が再生されるという特異的な反応であり、基質の種類に応じて助酵素から基質へ移るりん酸の位置が定まるのであって、このような反応が起こるのは酵素(E)上の異なった結合点に基質(S)と助酵素(C)とが同時に結合して ESC tenary complex を生ずる場合のみであることを明確にしている。またこの場合基質と助酵素の構造がきわめて類似しているため、常に基質阻害が起こるが、その機構を検討した結果、酵素表面において助酵素の結合点に基質が結合して助酵素・酵素間の結合を妨げること、すなわち基質阻害の原因は基質の助酵素に対する拮抗的阻害によるものであることを実証している。

第4章では、種々の金属イオン、SH 阻害剤、キレート剤および特殊な阻害様式を示す fluoride などによる阻害について詳述され、本酵素の特性が明らかにされている。

第5章では、本酵素の電気泳動的各 component の分離結晶化およびその性質について述べられている。本結晶酵素は超遠心的には均一で分子量112,000であるが、電気泳動的には五つの component (I, II, III, IV, V) から成っている。Amylose-starch-hyflo Super Cel を支持体とする horizontal zone electrophoresis により各 component を分離した結果、component I~V すべてが PGA mutase タンパクであることが判明したが、各 component の比活度は最も泳動のおそい component I が最大であり、泳動の速い

ものほど順次比活度が低い。

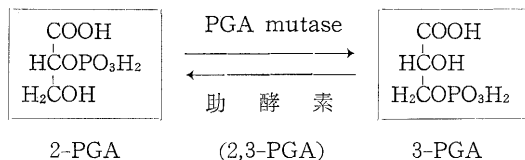
さらに各 component 間の差を明確にするためには各 component を多量に単離することが必要である。そのために多量の試料を長時間泳動できるように工夫した特殊な vertical zone electrophoresis 装置を製作し、この装置を用いて各 component を量的に分離し、さらに結晶化することにも成功している。その結晶形はいずれも原結晶と同じ菱形板状を呈し、また各 component の酵素化学的諸性質や吸収スペクトルなども、すべて原結晶と同じである。その上 PGA mutase の原結晶およびそれを構成する各 component は 2,3-PGA phosphatase-like activity を有し、しかもその比活度は全く同じである (PGA mutase 活度はそれぞれ異なる) ことから本酵素が両面活性をもつものであることを明らかにしている。各 component 間の PGA mutase 活性と易動度が相異なるのみであって本質的には差異がないことを実証している。

第6章では、PGA mutase タンパクが酵母細胞中において元来数個の component として存在しているか否かについて、また各 component 間の関係について検討している。すなわち結晶調製の初期段階である自己消化の時間のみを変え、以後の操作を同様にこなうときは、いずれも菱形板状の結晶が得られる。その各結晶の活度および電気泳動的挙動から PGA mutase は酵母中では component I の形で存在し、これが自己消化中に共存する PGA mutase-modifying enzyme の作用を受けていることを明らかにしている。また酵母抽出液より得た modifying enzyme 標品を多量の結晶 PGA mutase に作用せしめて modified crystal (component V) に変えることにも成功し直接証明を行なっている。一方各 component 間の易動度差の原因を知るために modifying enzyme の作用機作を追求している。

第7章では、PGA mutase 本来の存在形態である component I のアミノ酸分析を Dowex 50W×8 を用いたイオン交換クロマトグラフ法により行なって、そのアミノ酸組成を完全に決定している。

論文審査の結果の要旨

PGA mutase は 2-phosphoglyceric acid と 3-phosphoglyceric acid の間の転換を触媒する重要な酵素であるが、解糖酵素の中で比較的研究のおくれたものであった。



助酵素この主な理由は純粋な標品が得られなかったこと、また PGA mutase が異性化酵素として酵素反応上特殊な地位を占めているため、その触媒機構の正確な把握が困難であったことによる。最近パン酵母から本酵素が結晶化されるにおよび、研究が進展し始めたが、enolase のごとき他酵素との共役反応を利用した間接活度測定法に立脚して研究されてきたため、本酵素反応の本質的解明に近づき得なかったのである。

本研究ではまず旋光度法により直接活度を測定し、本酵素の基本的性質を解明している。

つぎに多量の結晶酵素を調製して基質阻害の原因機作を理論的に説明している。大型の特殊な vertical zone electrophoresis 装置を考案製作し、易動度差の小さい 5 component を長時間の泳動で、量的に完全に分離し結晶化に成功した業績は賞讃に価するものである。

酵母細胞中では最高の比活度をもつ component I のみの形で PGA mutase が存在することを確証し、ついで自己消化中に PGA mutase-modifying enzyme によって他の component が二次的に生成されることを完全に実証している外、酵素化学の進展に貢献するところきわめて大きい。

よって本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。