

| | |
|---------|---|
| 氏名 | 中澤淳 なかざわあつし |
| 学位の種類 | 医学博士 |
| 学位記番号 | 医博第266号 |
| 学位授与の日付 | 昭和41年6月21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 | 医学研究科生理系専攻 |
| 学位論文題目 | On the Mechanism of Activation of L-Threonine Deaminase from <i>Clostridium tetanomorphum</i> by Adenosine Diphosphate (<i>Clostridium tetanomorphum</i> から分画されたスレオニン脱アミノ 酵素の ADP による活性化機構について) (主査) |
| 論文調査委員 | 教授 早石 修 教授 山田 肇 教授 島本暉朗 |

論 文 内 容 の 要 旨

スレオニン脱アミノ酵素は、L-スレオニンを α -ケト酪酸とアンモニアに分解する反応を触媒する酵素である。最近当教室において、*Clostridium tetanomorphum* から部分精製された本酵素に、反応とは直接関係のない ADP が結合し、特異的にその活性を上昇させることが発見され、さらにこの現象の生理的意義が明らかにされた。この様にある特定の低分子物質によって酵素活性が促進あるいは阻害をうけるという現象は、「アロステリック効果」と呼ばれているが、最近その例が数多く報告され、細胞内での代謝調節の新しい機構として注目を集めている。しかし、今日までの研究は、大部分が細胞抽出液などの粗酵素標品を用いたもので、しかも酵素活性の変化を現象論的に記載したものが多く、従って、その作用機序は明らかではなかった。著者は、本酵素を上記嫌気性菌の音波破碎抽出液より約700倍精製純化し、酵素反応速度論的解析及び ^{14}C -ADP と酵素蛋白との結合実験などから、ADP の作用機序に関して従来の学説とは異なる新知見をえた。

まず、種々の基質濃度を用いて酵素活性を測定した場合、基質濃度—活性曲線はS字状となり、見かけの K_m は $3.7 \times 10^{-2} \text{ M}$ である。一方、 10^{-3} M ADP の存在下では、通常の酵素反応の様に双曲線が得られ、その際最大速度は1.2倍に増加する程度であるが、 K_m は $3.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ と約10分の1に大きく減少する。このS字状曲線を、Lineweaver-Burk プロットやその他のプロットを用いて解析した結果、通常の酵素とは異って、本酵素には基質の結合部位が2か所存在することが示唆された。

次に、 ^{14}C -ADP の酵素蛋白との結合をゲル濾過法を用いて観察したところ、ADP の結合定数(解離定数)は $1.2 \times 10^{-5} \text{ M}$ となり、反応速度論的に求めた ADP の活性化定数 $2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ とよく一致した。さらに、ADP の結合部位と基質の結合部位の異同を明かにするため、基質と同じ部位に結合すると考えられる D-スレオニン、PCMB、ヒドロキシルアミン、セミカルバジド等の物質を共存させて ^{14}C -ADP の酵素との結合能を検討したところ、これらはいずれも ADP の結合を阻害しなかった。この他に反応速度論的解析、PCMB の阻害実験及び活性化エネルギーの測定などから、ADP と基質とは酵素蛋白分子の

全く異なる部位を占めているものと推論した。

以上の実験結果及び酵素反応速度論的解析から本酵素には、L-スレオニンの分解を司る「触媒部位」の他に、「基質、L-スレオニンによる活性化部位」と「活性化因子、ADPによる活性化部位」の2種類の「制御部位」が存在することが結論された。即ち「触媒部位」に基質が結合しただけでは、酵素は不活性の状態であるが、それぞれの「制御部位」に基質又はADPが結合すると、おそらく蛋白の微細構造が変化して「触媒部位」の機能が完全なものとなり、酵素活性が発現するという機構が考えられる。

従来、アロステリック効果、とくに活性化においては、活性化因子が酵素蛋白の基質親和性を高めるために、見かけの K_m が減少するのであらうと考えられてきた。しかし、以上にのべた実験事実から、基質に対する見かけの K_m の変化は、むしろ2種類の「制御部位」が存在するという本酵素のもつ独特の性質に由来すると解釈した方が妥当であると思われる。即ち、本酵素においては、ADPは「触媒部位」の触媒能率（酵素-基質複合体から生成物への分解速度定数）に影響を及ぼして、酵素活性を制御しているという、活性化因子の作用機序に関して全く新しい機構が提起されたわけである。

論文審査の結果の要旨

細胞内の代謝調節機構の解明は医学的に、かつ生物学的にきわめて重要な課題のひとつである。中沢は最近代謝調節に関連して急速に注目を集めている「アロステリック酵素」における酵素活性の制御機構を *Clostridium tetanomorphum* のスレオニン脱アミノ酵素を材料として研究し、本酵素には、基質濃度-活性曲線の異常性、および活性化因子による見かけの K_m の減少などを認めた。そこで本酵素を約700倍精製し、精製酵素を用いて反応速度論的解析および ^{14}C -ADP と酵素との結合実験を行なった。その結果、このような「アロステリック酵素」としての代表的な性質は酵素蛋白分子の表面に「触媒部位」以外に「基質による活性化部位」と「活性化因子による活性化部位」の2種類の「制御部位」が存在するというモデルが考えられることを証明した。

本研究は酵素作用の調節機構に関する新しい解釈であり、このような基礎的な研究が将来物質代謝の異常を伴う疾患の病因をきわめ、治療法を確立するのに役立つことがじゅうぶん考えられる。

よって本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認定する。