

氏名	称 宜 太 兵 衛 ね き た へ え
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	薬 博 第 84 号
学位授与の日付	昭 和 46 年 9 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	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学位論文題目	酵 母 の 無 機 ピ ロ フ ォ ス フ ァ タ ー ゼ に 関 す る 研 究
論文調査委員	(主 査) 教 授 富 田 謙 吉 教 授 山 科 郁 男 教 授 高 木 博 司

論 文 内 容 の 要 旨

無機ピロフォスファターゼ (PPiase) はピロリン酸を加水分解し、オルトリン酸を生成する反応を触媒する酵素であり、微生物より高等動物にわたって広く分布している。ピロリン酸は種々の生合成反応、例えば核酸合成の際に生じ、これを分解する PPiase は生体において重要な役割を持っていると考えられる。

したがって本酵素の触媒作用機構と構造との関係を解明することは、生体における本酵素の役割をより明確にすると共に、生体の重要な反応の一つであるリン酸エステル加水分解機構の解明のモデルとなるものと考えられる。しかしながら従来 PPiase に関するこの方面の研究はほとんど行なわれていなかった。

本実験には最もよく精製されているパン酵母を用いた。

〔酵素の精製〕

パン酵母の PPiase は Kunitz (J. Gen. Physiol 35 423 (1952), および Heppel 等 (J. Biol. Chem. 192 87 (1951)) により精製されているが、その精製法は結晶化の反復、C_r ゲル法などかなりの技術と時間を必要とし、再現性も乏しい場合が多かった。今回、収量の安定化と簡略化に主眼を置き精製法を再検討した。

パン酵母を自己消化、硫酸分画、アルコール分画を行った後、SephadexG-100, DEAE セルロースカラムクロマトにより従来の方法で得られた標品とほぼ同一活性を有し、ディスク電気泳動、超遠心分析的に単一な標品を得ることができた。

〔酵素の諸性質〕

この PPiase の化学構造は NH₂- 末端にはアラニン、COOH- 末端にはセリンを 1 個有し、NH₂ 末端セリンの PTH セリンとしての回収率は 93% であった。また変性剤例えば 8M 尿素、6M グアニジン塩酸、の存在下においても分子量の減少は無く、酵素中のシステイン残基は全て還元型で存在していること等から PPiase は 63000 という分子量を有し、サブユニット構造は持たない一本鎖タンパク質と考えら

れる。

〔構造と酵素活性との関連〕

(システイン残基) PPIase の構造と機能に関しては従来よりほとんど研究がなされておらず、Eifler 等 (Acta biol. med. germ. 17 716 (1966) が 3 個のシステイン残基のうち 1 個が SH 試薬と反応し不活性化を受けることを示しているのみである。著者は PPIase の構造と機能の解明の第一歩として先ずシステイン残基の役割と存在状態について検討を試みた。PPIase の 3 個のシステイン残基中 1 個は水溶液中で容易に各種の SH 試薬と反応するが、残りの 2 個に変性剤濃度に依存してそれぞれ異った反応性を示す。しかしながら 3 個のシステイン残基が修飾を受けた PPIase も約 70% の活性を保持しており、Eifler 等の結論と異なりシステイン残基は直接活性の発現には関係していないと考えられる。

(トリプトファン、チロジン残基)

PPIase の旋光分散曲線は 233m μ に谷を示す典型的な α -helix 含有蛋白質であり、旋光分散曲線から求めた α -helix 含量は約 20% であった。此の旋光分散曲線には 280m μ ~300m μ 附近に芳香族アミノ酸の不斉性に由来すると考えられるコットン効果を示す。このコットン効果は拮抗阻害剤である methylene diphosphonate (PCP, $\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}-\text{OH}$) の存在下に増強される。したがって拮抗阻害剤はこの領域に吸収帯を持つトリプトファン、チロジン残基の不斉性の度合を変化させることが明らかになった。

次に PPIase 中のトリプトファン又はチロジン残基の活性に対する寄与を検討した。PPIase と PPIase-PCP 複合体の差スペクトルは 300m μ に負の吸収を示した。したがって拮抗阻害剤の結合で主としてトリプトファンが変化を受けたと考えられる。又、トリプトファン残基は PPIase 中に 11 個あるが、pH 6~6.5 で NBS (N-Bromo Succinic imide) 酸化すると約 1 分子のトリプトファンが消失した点でほぼ完全な生活を見た。NBS 酸化による生活化酵素はもはや 280m μ ~300m μ のコットン効果や阻害剤との差スペクトルも示さなかった。

PPIase を 295m μ の光で励起した場合の蛍光スペクトルは pH 6.5~7.5 附近でもっとも短波長に極大を有し、此の pH 附近において PPIase 中のトリプトファンは殆ど hydrophobic な領域に存在していると思われる。このことは Solvent perturbation 法によっても、分子表面に露出している芳香族アミノ酸は約 10 分子のチロジンと 3 分子のトリプトファン残基であるという結果とも一致する。そしてまた、PCP との結合でトリプトファンの 1 残基とチロジンの 5 残基が分子内部に埋没することも上記の方法より明らかになった。此等の実験結果から PPIase の分子表面には 3 残基のトリプトファンが存在し、その 1 残基が活性に密接な関係を有していることが明らかになった。

PPIase 中には 23 分子のチロジン残基が存在するが Tetranitromethane によるチロジン残基のニトロ化は pH 6~7 では約 2 モル進行し、殆ど活性の低下を見なかった。更に高い pH においてニトロ化を行うと、pH の上昇と共にニトロ化は進行し活性も比例して低下した。しかしトリプトファンの場合に見られる様な特定のチロジン残基が活性に関与しているという結論は得られなかった。したがってニトロ化による失活は、多くのチロジン残基のニトロ化による 2 次的な影響によるものと考えられる。

阻害剤である Mg-リン酸などは PPIase との結合により 280m μ と 290m μ に正のチロジン変化に由

来する差スペクトルの吸収のみを与える。この事実は Mg-リン酸の結合によって酵素は MgPCP の結合した場合と異った構造を取ることを示唆している。

〔ヨード酢酸アミドの作用〕

SH 試薬によって PPiase 中のシステイン残基をふさぎ、大量のヨード酢酸又はヨード酢酸アミドを作用させると SH 基以外のアミノ酸残基に置換が起るため失活化する。此の修飾反応をヨード酢酸アミドを用いて各種の pH で行った所、失活化は pH 5.5 において1つのピークを示した。pH がアルカリ性になるにしたがって再び大きくなった。pH 8.0 での修飾による失活は MgATP や Mg^{2+} , MgPCP などで抑制される。

したがってこの pH で修飾を受けたアミノ酸残基は活性中心と密接な関係を持つものと考えられる。 ^{14}C -ヨード酢酸アミドを用いて化学修飾を行うと、3分子の ^{14}C -Carboxamide 基の導入により失活する。この試薬による修飾はシステイン、メチオニンおよびリジン残基に各々ほぼ1分子ずつ起っていた。システイン残基は活性に関与しないのでメチオニン又はリジンが活性に重要な因子と考えられる。

本研究において行った PPiase の化学的、物理化学的諸性質の検討、化学修飾による活性中心の検討はまた緒についたばかりであるが、現在までの知見は将来の本酵素の触媒作用研究の基礎を与えるものと考ええる。

論文審査の結果の要旨

無機ピロリン酸 (PPi) は、光合成細菌における一種の高エネルギー化合物として生産さたる可能性があり、高等動物では、骨の代謝に関連している。PPi は生体の各種ピロフォスファターゼによる反応において生成さた、こたが無機ピロフォスファターゼ (PPiase) によって分解されることが、代謝調節の一環をなしていると考えられているが、PPiase 自体の酵素学的検討は、今日まで以外にも、十分行われていない。祢宜は、パン酵母の PPiase を材料として、その作用機序と活性中心の性状について、今日、応用し得るあらゆる手法を用い、研究を行って来た。

即ち、先づ(1)従来の2つの PPiase 精製法を改良して再現性よく高純度の製品を比較的容易に得ることが出来るようにした。(2)ついて NH_2 末端はアラニン、 $COOH$ 末端はセリンを各一個有し、変性剤 (8M 尿素等) で分子量の低下の見られぬこと、システイン残基はすべて還元型で存在すること等から、この PPiase は分子量 63000、サブユニットを持たない一本鎖タンパク質と考えられると推論した。(3)構造と活性との関係については、旋光分散測定により、この PPiase が α -helix 含量約20%で、その旋光分散曲線が、280~300m μ に芳香族アミノ酸残基の不整性による思われるコットン効果を示すことを認め、自ら酸残基の酵素活性との関連の検討に移っていった。

(a) 従来、パン酵母 PPiase については、Eifler らによるシステイン残基と活性との関連が報告されていたが祢宜は次の結果からこれを否定した。即ち、3つのシステイン残基のうち1個は水溶液中、各種の SH 試薬と反応するが活性は100%保持されている。6M グアニジン塩酸中で、3個とも修飾されても活性は70%残る。

(b) トリプトファン、チロシン残基については、修飾と光化学的測定を応用して、先づトリプトファン

11個の中、PH6~6.5 で N-Bromo-succinimide (NBS) 酸化により、1個消失すると活性も完全になくなること、また、NBS 酸化により失活した酵素は α -helix 含量は殆ど変化はないが、PPiase-Methylene diphosphonate-PPiase 複合体が示す 300m μ の負の吸収は消失すること等から、分子表面に出ている 1.5~3 個のトリプトファン残基中 1 個が活性に重要な役割をもつと考えている。

チロシン23基中、約10個が分子表面にあって、種々の試薬で修飾をうけるが、例えばテトラニトロメタンでは PH 6~7 で 2 個修飾されても活性が低下しないので直接活性との関連はうすいものと考えている。またヨード醋酸アミドによる修飾によって、リジンまたはメチオニンと活性との関連も予測している。以上の研究は、極めて精力的に行われ、精度も高く、PPiase について、これまで不明であった活性中心の問題を深く掘り下げた業績は高く評価されるべきものである。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。