

氏名	虎谷哲夫 とら や てつ お
学位の種類	工学博士
学位記番号	工博第326号
学位授与の日付	昭和48年3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	工学研究科工業化学専攻
学位論文題目	<b>Studies on Coenzyme B<sub>12</sub> Dependent Diol Dehydrase System</b> (B <sub>12</sub> 補酵素関与ジオール脱水酵素系に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 福井三郎 教授 野崎 一 教授 倉田道夫

### 論文内容の要旨

本論文は B<sub>12</sub> 補酵素関与ジオール脱水酵素に関する研究と題し、緒論および本論四編から成っている。緒論では本研究の歴史的背景、動機、目的および研究成果の概要が述べられている。ビタミン B<sub>12</sub> は単離されて以来、広く生化学、有機化学、錯体化学、医学、薬学などの分野の研究者により注目研究されてきた。特にその補酵素型の発見は B<sub>12</sub> の生化学に画期的な進展を促し、B<sub>12</sub> の関与する酵素反応が次々と見いだされてきている。著者は B<sub>12</sub> 補酵素関与酵素の一つとしてジオール脱水酵素を研究対象に取りあげ、新しい角度から B<sub>12</sub> 酵素の一般的性質を追求し、B<sub>12</sub> の補酵素作用の解明に資そうとしたものである。

第1編ではジオール脱水酵素系における一価陽イオンの役割について述べている。本酵素系に必須の因子として要求される K<sup>+</sup> がアポ酵素と B<sub>12</sub> 補酵素あるいはその類縁体との結合に本質的な役割を果たしていることを証明した。K<sup>+</sup> 以外の一価陽イオンには補因子として活性なものと、阻害的に作用するものがあり、前者は K<sup>+</sup> と同様にアポ酵素-補酵素複合体の形成および維持に有効であるが、後者は無効である。また活性な陽イオンの補因子としての有効性はそのイオン半径と密接な関係にあり、K<sup>+</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 両イオンがほぼ至適な大きさであることを認めた。このような一価陽イオンの効果を利用して、これまで不可能とされていた温和な条件下でホロ酵素をアポ酵素と B<sub>12</sub> 補酵素に分割することに成功している。この方法によれば、活性を保有したアポ酵素を定量的に回収することが可能であり、本酵素における最も優れた分割法を認定した。

第2編は B<sub>12</sub> とアポ酵素の結合の性質およびその結果生成する複合体の性質に関するものである。補酵素類縁体のうち、シアノ B<sub>12</sub>、メチル B<sub>12</sub> は B<sub>12</sub> 補酵素と同様の様式でアポ酵素に結合し、結合には一価陽イオンとアポ酵素の SH 基が関与していることを認めた。また本酵素は1モルあたり1モルの B<sub>12</sub> 補酵素あるいはその類縁体を結合するが、ヒドロキソ B<sub>12</sub> のみはアポ蛋白と非特異的にも結合することを示した。さらに種々の B<sub>12</sub> とアポ酵素の強固な複合体を温和な条件下で分割して活性なアポ酵素を得る方法を開発し、この分割法を利用してこれらの複合体の性質を検討している。その結果、アポ酵素が B<sub>12</sub> 補

酵素類縁体を結合することによって、熱や pH 変化に対して著しく安定化されることを明らかにした。アポ酵素と補酵素類縁体の複合体は、酵素によって極めて失活しやすいホロ酵素の安定なモデルとして適当であると考えられる。

第3編では基質あるいはその類似体とアポ酵素およびホロ酵素との相互作用を調べている。本酵素系において、基質類似体例えば 1, 2-ブタンジオール、スチレングリコール等を基質の代わりに用いると、アポ酵素-補酵素-基質類似体三者複合体が形成されるが、脱水反応は起こらない。この三者複合体の系に、真の基質である 1, 2-プロパンジオールを過剰に加えると、酵素に対する親和性の差によって類似体が基質により置換され、正常にジオール脱水反応が進行することを見出した。また三者複合体の性質を詳細に検討しており、特に光照射に対する挙動が反応中のホロ酵素と同じであることから、補酵素部分のコバルト-炭素結合は活性化された状態にあることを推定している。この三者複合体は反応の中間複合体のモデルとして適当であると思われるが、一方 SH 阻害剤に対する感受性や補酵素の解離の起こり易さから三者複合体はホロ酵素に比べて若干ひずんでいることを認めた。このひずみは基質類似体の大きな側鎖によってもたらされ、これら類似体が基質活性を持たないことと密接に関連していると推察している。

第4編では第1—3編で扱っている酵素と他の因子間の相互作用と深いかわりを持つアポ酵素の性質として、本酵素のサブユニット構造について研究している。本酵素は DEAE-セルロースクロマトグラフィーにより2つの相異なる蛋白に解離し、各蛋白単独では不活性だが、両者を混合することにより酵素活性が発現することを見出した。基質に両蛋白の会合を促進する効果を認めた。補酵素の活性中心であるコバルト-炭素結合の活性化は各蛋白単独では起こらず、また B<sub>12</sub> 補酵素およびその類縁体の結合にも両者の共存を必要とすることを証明している。さらに両蛋白の性質について検討し、片方が SH 蛋白であることを示した。この両者の会合、解離は酵素活性および生体内 B<sub>12</sub> の濃度を調節するのに有利であると考察している。

### 論文審査の結果の要旨

B<sub>12</sub> 補酵素は自然界ではじめて発見された複雑な構造を持つ有機コバルト化合物であり、その構造と性質について注目をひいている。本論文は B<sub>12</sub> 補酵素関与の重要な酵素の1つであるジオール脱水酵素を用いて、B<sub>12</sub> 補酵素がアポ酵素と結合してホロ酵素を形成し、B<sub>12</sub> 補酵素の特徴であるコバルト-炭素結合が活性化される機構を研究したものである。得られた成果の主なものは次の通りである。

(1) B<sub>12</sub> 補酵素とアポ・ジオール脱水酵素とが結合し活性なホロ酵素が形成されるためには K<sup>+</sup> イオン又はこれとイオン半径が類似した1価カチオンが必須であり、基質の存在が二次的に必要であることを証明した。この事実に基づいて、ゲル濾過法によりホロ酵素から活性を維持したアポ酵素の回収法を設定した。

(2) B<sub>12</sub> 補酵素類縁体としてシアノ B<sub>12</sub>、メチル B<sub>12</sub> とアポ酵素との間に K<sup>+</sup> イオン存在下で熱、pH 変化に安定な複合体を形成せしめ、ホロ酵素と性質を対比することにより、ジオール脱水酵素の性質に関する情報を得た。また、此の複合体の安定な性質を利用して他の蛋白から分離し、前記のゲル濾過法で活性なアポ酵素を回収することに成功し、有効な精製法を確立した。一方、ヒドロキソ B<sub>12</sub> はアポ酵素に対し1価カチオンに依存しない異なった様式で活性中心以外にも結合することを証明し、ヒドロキソ B<sub>12</sub>・

アポ酵素複合体を  $B_{12}$  部とアポ酵素に分離する方法を考案した。ホロ・ジオール脱水酵素は基質が存在しない状態で酸素により不活化されてアポ酵素に結合したヒドロキソ  $B_{12}$  を与えるので、此の方法により酵素反応後のアポ酵素の性質を知る有力な手がかりが得られる。またアポ・ジオール脱水酵素の精製法としてヒドロキソ  $B_{12}$ ・アポ酵素複合体を経由する方式も設定した。

(3) アポ酵素に存在する SH 残基が  $B_{12}$  補酵素との結合に重要な役割を果していることを証明した。次にアポ酵素をイオン交換クロマトグラフ法で2つの異なる蛋白に分離し、その1つが SH 蛋白であることを確認した。 $B_{12}$  補酵素と結合して触媒活性を持つホロ酵素を形成するためには、両方の蛋白が共存することが必要であることを証明し、ジオール脱水酵素のみならず  $B_{12}$  補酵素依存の酵素全般にたいする重要な情報を与えた。

(4) 基質類似体として 1, 2-ブタンジオール、スチレングリコールを用いることにより、酵素反応の解析に有用なアポ酵素・補酵素・基質類似体の3者複合体（いわゆる dead-end complex）を形成せしめた。此の複合体は酵素反応の進行している間のアポ酵素・補酵素・基質複合体（Michaelis complex）の性質を研究するための有効な模型となるものであり、またアポ酵素の精製にも適用される。

以上を要するに、本論文は  $B_{12}$  補酵素に依存する酵素群のうち代表的なジオール脱水酵素をとり上げて、アポ酵素と  $B_{12}$  補酵素が結合してホロ酵素が形成し、 $B_{12}$  補酵素のコバルト-炭素  $\sigma$  結合が不安定化されて酵素活性が発現するための酵素蛋白の性質を調べ、アポ酵素、 $B_{12}$  補酵素、基質及び補因子としての1価カチオン間の相互関係について、いくつかの興味深く重要な知見を得たものである。学術上ならびに実用上寄与するところが少なくない。

よって、本論文は工学博士の学位論文として価値あるものと認める。