

氏名	真 杉 文 紀 ま すぎ ふみ のり
学位の種類	工 学 博 士
学位記番号	工 博 第 327 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>Some Investigations on vitamin B<sub>6</sub> Enzymes: Relationship between Coenzyme-Apoenzyme Binding and Enzyme Activity</b> (ビタミンB <sub>6</sub> 酵素における2, 3の研究: 補酵素-アポ酵素結合と酵素活性発現との関係)
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

本論文は生体内で各種アミノ酸の代謝に最も重要な働きをしているビタミン B<sub>6</sub> 酵素の補酵素であるピリドキサル・リン酸 (PLP) の各官能基がアポ酵素との結合に果す役割及び酵素活性発現に際しての補酵素-アポ酵素間相互作用について研究したもので、4編からなっている。

第一編では PLP の2位メチル基をヒドロキシメチル基に変えた  $\omega$ -ヒドロキシ PLP とアポ酵素との相互作用を分光学的及び酵素反応速度論的に研究した。 $\omega$ -ヒドロキシ PLP はブタ心筋可溶性分画及びミトコンドリア分画のアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (GOTs 及び GOTm) において補酵素活性を示すことが認められた。その Kco 値は PLP のそれとほぼ同等であったが、 $\omega$ -ヒドロキシ PLP の結合したホロ酵素の最大活性 (Vmax) は PLP 酵素のそれより大きかった。天然の補酵素よりも活性の高い補酵素類似体が存在することは興味深い。しかし GOT 定量液内にリン酸イオンが存在すると  $\omega$ -ヒドロキシ PLP の親和性は非常に低下した。この場合、リン酸イオンは  $\omega$ -ヒドロキシ PLP とアポ GOT との結合を拮抗的に強く阻害することが証明された。一方大腸菌トリプトファナーゼでは  $\omega$ -ヒドロキシ PLP はリン酸イオンの有無にかかわらず PLP に比し親和性も補酵素活性も低かった。これらの事実から GOT とトリプトファナーゼでは、アポ酵素にたいする補酵素の2位メチル型の相互作用の、両者の結合および生成したホロ酵素の活性発現に及ぼす効果が異なることが明らかにされた。

第二編では PLP のピリジンNに酸素を導入した PLP N-オキシドの補酵素作用を速度論的及び分光学的に研究した。調べた全てのビタミン B<sub>6</sub> 酵素において、PLP N-オキシドの親和性は PLP とほとんど差がなかったが、PLP N-オキシドの結合した酵素の Vmax 値は PLP 結合酵素より小さかった。これらの結果から PLP のピリジンNが酵素活性発現に大きい役割を演じていることは明らかであるが、モデル反応でピリジニウムNの電子吸引性が重要な役割を果していることが明らかとなっているアミノ酸の  $\alpha$  水素脱離段階までをトリプトファナーゼ及び GOT 系でそれぞれの基質類縁体を用いて詳細に研究した。 $\alpha$  水素脱離までの速度は PLP N-オキシドの結合したトリプトファナーゼでは PLP 酵素の約 $\frac{1}{2}$ に減少

していたが、GOT 系ではそのような差は認められなかった。しかし GOT においてはピリドキサミン・リン酸型からピリドキサル・リン酸型への転換が PLP N-オキシド酵素では非常に遅かった。これらの結果は PLP のピリジン N が酵素活性発現に重要であるが、酵素によって反応の異なる段階で働いていることを示している。GOT の場合基質アミノ酸の  $\alpha$ -水素脱離は酵素の活性部位にある塩基性アミノ酸残基の攻撃により進行することが示唆された。又 PLP N-オキシドは GOTs のアロステリック部位のリジン残基と結合して酵素を活性化することが認められた。

第三編では過剰の PLP が B<sub>6</sub> 酵素に及ぼす影響及び非活性部位への PLP の結合について研究した。PLP は GOTs やトリプトファンナーゼの非活性部位のリジン残基とシッフ塩基を形成し、その結果酵素活性の低下を来すことが認められた。GOTs において活性部位のリジン残基への PLP の結合は特異的に起こるがピリドキサルの結合は非特異的であることが分光学的に認められた。一方トリプトファンナーゼでは活性部位リジン残基への PLP の結合が特異的に起こるということは分光学的及び反応動力学的方法により認められなかった。これらの結果及び第一編の結果などから PLP の 5' 位リン酸基が GOT では活性部位の識別により重要であり、トリプトファンナーゼでは酵素活性発現により重要であることが考えられた。

第四編はアルブミンと PLP がモル比 1 対 1 の特異的な複合体を形成し、この複合体中の PLP が直接アポ GOT に転移されることを研究したものである。この転移は GOT の基質の一つである  $\alpha$ -ケトグルタル酸により阻害されること、又複合体へのアポ GOT 添加前後の吸収スペクトルには変化が認められないが、複合体の吸収極大波長で励起した蛍光スペクトルが著しく変化することなどから、GOT の活性部位とアルブミン-PLP 複合体の PLP 結合部分との相互作用を介して PLP の転移が進行することを支持する証拠を示した。

## 論文審査の結果の要旨

ビタミン B<sub>6</sub> は補酵素型のピリドキサル・リン酸 (PLP) がアミノ酸の脱炭酸、ラセミ化、アルキル脱離、アミノ基転移などの生化学反応に関与することにより生体内でのアミノ酸代謝に重要な役割を演じている。PLP の接触作用はアポ酵素が存在しない場合にも認められるが、アポ酵素と結合しホロ酵素を形成することにより、基質及び反応形式にたいする特異性が決定され、触媒活性も著しく増大する。本論文は PLP と各種のビタミン B<sub>6</sub> 関与酵素のアポ酵素との結合及び生成したホロ酵素の活性発現において、PLP とアポ酵素の構造が果たす役割を新たに調製した PLP 類似体を用いて研究し、さらに血清アルブミン・PLP 結合体から PLP がビタミン B<sub>6</sub> 酵素の代表的なアスパラギン酸アミノ酸基転移酵素 (GOT) のアポ蛋白へ転移しホロ酵素を生じる事実を証明したものである。得られた成果の主なものは次の通りである。

(1) PLP の 2 位メチル基をヒドロキシメチル基に変えた  $\omega$ -ヒドロキシ PLP を用いることにより、各種のビタミン B<sub>6</sub> 酵素を、補酵素の 2 位メチル基とアポ酵素間の立体的相互作用あるいは疎水的結合が、両者の結合ならびに生成したホロ酵素の触媒活性に適当な立体構造の構成に重要である群と重要でない群とに大別できることを示した。前者の例としてトリプトファンナーゼ、後者の例として GOT、D-セリン脱水酵素があげられたが、GOT において補酵素 PLP の 2 位メチル基とアポ酵素間の疎水結合が酵素作用

の発現に必要であることを提唱したソ連学派の仮説に否定的な結果を与えたものである。

(2) PLP のピリジンNに酸素原子を導入した PLP N-オキンドを用いて、GOT はピリジンNはアポ酵素との結合、生成したホロ酵素の最適な立体構造の維持に重要な役割を果すことを示した。一方、トリプトファンゼではピリジンNに酸素を導入した影響はアポ蛋白と補酵素との親和性にたいしてはほとんど認められなかった。次に、これらの酵素反応の初期の重要な段階である基質アミノ酸の  $\alpha$ -プロトン脱離までの経過をフロー法を用いて反応動力学的及び分光学的方法で解析し、GOT ではアポ酵素の塩基性アミノ酸残基の寄与が  $\alpha$ -プロトン脱離に重要であり、トリプトファンゼでは非酵素モデル反応の場合と同様にアポ蛋白と結合した PLP のピリジニウムNの電子吸引性の寄与が大きいことを示唆する成績を得て、ビタミン B<sub>6</sub> 酵素の構造と作用機構の関係に興味深い情報を与えた。

(3) PLP がアポ酵素の活性中心と非活性部位のリジン残基とを区別してシッフ塩基を形成する過程を GOT とトリプトファンゼを用いて調べた。GOT の場合、PLP の 5'-リン酸基が活性中心のリジン残基に選択的に結合するのに役割を演じており、一方トリプトファンゼでは結合には寄与しないことを示した。また非活性部位への過剰の PLP の結合は各種のビタミン B<sub>6</sub> 酵素の活性を低下させることを発見した。

(4) PLP は血清アルブミンと1対1の割合で複合体を形成し、この複合体から PLP は解離しにくい、アポ GOT を共存させると PLP は容易に転移してホロ GOT が生成することを認めた。この現象はアルブミンが PLP と複合体を形成して輸送にあずかり、必要に応じてビタミン B<sub>6</sub> 酵素のアポ蛋白の活性中心に PLP を与える役割を演じることを強く示唆するものであり、上述の過剰の PLP による各種 B<sub>6</sub> 酵素の阻害及び最近観察されている種々の非ビタミン B<sub>6</sub> 酵素の PLP による阻害が生体内で起こりにくくなっていることに説明を与えるものである。

以上を要するに本論文はアミノ酸の代謝に必須である種々のビタミン B<sub>6</sub> 酵素におけるアポ酵素の結合様式ならびに生成したホロ酵素の構造と触媒作用に関して、いくつかの興味深い事実を明らかにしたものであり、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。