

氏名	巖倉正寛 いわくらまさひろ
学位の種類	理学博士
学位記番号	理博第 602 号
学位授与の日付	昭和 54 年 11 月 24 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	理学研究科化学専攻
学位論文題目	NADP 要求性リンゴ酸酵素における SH 基の反応性に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 香月裕彦 教授 波多野博行 教授 川出由己

### 論文内容の要旨

リンゴ酸酵素はL-リンゴ酸を、補酵素 NADP もしくは NAD の存在下に、酸化的に脱炭酸してピルビン酸を与える反応(反応1)を触媒する酵素である。近年ある種のリンゴ酸酵素が反応1の他に、オキサロ酢酸脱炭酸反応(反応2)および $\alpha$ -ケト酸還元反応3(反応3)をも触媒する多機能酵素であることが明らかにされている。最近、申請者の研究室において、大腸菌に存在する2種類のリンゴ酸酵素の一つ、NAD 要求性リンゴ酸酵素のシステイン残基の化学修飾を行うと、反応1および2の活性が消失するのに対し、反応3の活性が著しく増大するという現象が発見され、酵素活性の発現にSH基が重要な役割を演ずることが示唆された。申請者は、さらに、大腸菌のNADP 要求性リンゴ酸酵素の高度精製均一化を行い、分子的性質を調べ、本酵素が6個のサブユニットから成り、上記3反応を触媒し得ることを明らかにした(参考論文2)。申請者は本酵素のSH基の役割に注目し、N-エチルマレイミド(NEM)や、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)などの数種のSH試薬を用いて化学修飾を行った。修飾による失活は試薬の種類および濃度により異なるが、いずれも擬一次的に進行した。また失活した酵素をジチオトレイトールで処理すると、完全に活性を回復した。失活したSH基の数はサブユニット当たり2個であったが、塩酸グアニジン存在下に修飾すると、6~7個のSH基が反応した。本酵素にはジスルフィド結合は存在しないので、全SH基は6~7個であり、おそらく、そのうち2個が酵素表面に存在し、活性発現に関与するが、他は分子内部に埋れた状態にあるか、もしくは試薬と反応しにくい状態にあることが示唆された。NEMにより部分失活した酵素のL-リンゴ酸、NADP<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>に対するKm値は原酵素のものとはほぼ同じであり、電気泳動においても両酵素の泳動度は同じであったので、修飾により酵素の解離・会合は起っていないものと推測された。この失活に対し、NADP<sup>+</sup>は保護効果を示し、L-リンゴ酸は影響を与えなかったが、Mg<sup>2+</sup>は失活を促進した。次にSH基のDTNBによる修飾速度をストップフロー装置を用い分光学的に追跡したところ、反応曲線は二相性を示し、2個のSH基の一方は速く、他方は遅く反応することが示唆された。これをさらに追究した結果、速い反応と遅い反応の二次反応速度定

数は、それぞれ、 $200 \text{ sec}^{-1}\text{M}^{-1}$  および  $6 \text{ sec}^{-1}\text{M}^{-1}$  であることが示された。この修飾速度に及ぼす L-リノゴ酸、 $\text{NADP}^+$  および  $\text{Mg}^{2+}$  の効果を調べたが、失活速度に及ぼす影響の場合と異り、 $\text{Mg}^{2+}$  はほとんど影響を与えなかった。 $\text{Mg}^{2+}$  は  $\text{NADP}^+$  と共存すると、両反応に対し著しい保護効果を示した。DTNB および NEM による修飾において、修飾された残基数と残存活性をプロットすると、 $\text{Mg}^{2+}$  が存在しない場合には、両者は直線を示し、完全に失活した時点における修飾度はサブユニット当たり、1.1~1.3 であった。これに反して  $10 \text{ mM Mg}^{2+}$  が存在する場合には、下に凸な曲線となった。しかしながら完全失活の時点の修飾 SH 基数は変らなかった。以上の結果は、 $\text{Mg}^{2+}$  が存在しない場合にはサブユニット当たり約 1 個の SH 基が修飾されると完全に失活するが、 $\text{Mg}^{2+}$  が存在する場合には 1 残基以下の修飾によって失活が起ることを意味している。たとえば、一方のサブユニットの修飾がそれと接触している他方のサブユニットの失活をひきおこすことが考えられる。NEM による失活における  $\text{Mg}^{2+}$  の促進効果は  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度が増すにつれ Michaelis-Menten 型の双曲線を描いて増加し、高濃度で飽和する傾向を示した。同様の実験を種々の温度で行い、Arrhenius プロットをし、種々の熱力学的パラメーターを算出した。また、 $\text{Mg}^{2+}$  以外の二価金属イオンの NEM 失活および熱失活に及ぼす効果についても検討し、これらの結果に基づいて  $\text{Mg}^{2+}$  による失活促進効果について考察を行った。 $\text{NADP}^+$  の失活保護効果は、 $\text{Mg}^{2+}$  が存在すると強まるが、その  $\text{NADP}^+$  濃度依存性を検討した結果、 $\text{NADP}^+$  の酵素に対する結合度に依存することを示唆する結果が得られた。以上の結果は、本酵素の最も反応性の高い SH 基が補酵素の結合部位に存在すること、また  $\text{Mg}^{2+}$  が本酵素の高次構造変化をひき起していることを示唆している。このことを仮定し、反応しやすい SH 基と反応しにくい SH 基の凝一次修飾反応速度定数の比をいろいろに設定し、シミュレーションを行ったところ、理論曲線は実験によって得られた曲線とよく一致した。さらに、本酵素の紫外部吸収スペクトルは、 $\text{Mg}^{2+}$  の存在によって明らかに差異を示し、本酵素に何らかの高次構造変化が起っていることが示唆された。反応 2 および 3 についても SH 基修飾の効果を検討したが、修飾と共に反応 2 は完全に失活し、反応 3 は部分的にしか失活せず、NAD 要求性リノゴ酸酵素の場合と似た傾向を示した。

参考論文 2 についてはすでに述べたが、参考論文 1 は 16 種の細菌における 4 種のリノゴ酸酵素の分布と近縁性を明らかにしたものである。

### 論文審査の結果の要旨

リノゴ酸酵素は多機能酵素として、酵素の反応機構を解明する上に、注目されている酵素である。大腸菌には、NAD および NADP を要求し、異った生理的役割をもつ二つのリノゴ酸酵素が存在するが、前者は申請者の研究室において、すでに、かなりの研究がなされている。後者は申請者によってはじめて均一に精製され、その分子的性質が明らかにされた。これまで報告されている他の多くのリノゴ酸酵素と異り、これが 6 個のサブユニットから成るヘキサマーであるため、とくに関心がもたれている。本研究において申請者がとりあげた SH 基の酵素活性の発現における役割については、これまで数多くの研究がなされている。しかしながら、分子量の大きな酵素について、申請者のように、ストップフロー法、速度論的解析およびコンピューターを駆使して、深く追究した研究は非常に少い。とくに、 $\text{Mg}^{2+}$  の効果について申請者が得た知見は高い価値を有し、オリゴマー構造をもつ酵素の活性発現機構を解明する上に大きな

貢献をなしたものといえる。すなわち、たとえば、ある化学物質が活性部位に結合することにより失活が起る場合、全サブユニットと結合し終ると同時に完全失活すると考えられる場合は非常に多い。しかしながら、最近、一部のサブユニットに結合が起ると、他の未結合のサブユニットにコンホーメーション変化などをひきおこし、失活が促進される場合が報告されている。“half-of-the-sites reaction”はその典型的な例であり、申請者の得た知見もこれに属するものと考えられる。オリゴマー酵素の各サブユニット間相互作用の解明は極めて困難な問題であるので、申請者によってなされた貢献は極めて大きいものといえる。また別の観点から見れば、主論文および参考論文を通じて申請者によってなされた大腸菌の NADP 要求性リンゴ酸酵素の研究は、すでに解明されている NAD 要求性酵素の知見と相まって、生物における本酵素の存在意義を明らかにする上に寄与するところ大なるものがある。

よって、本論文は理学博士授与に値すると認める。