

氏 名	山 口 睦 夫
	やま ぐち むつ お
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	論 理 博 第 658 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on Regulatory Functions of Malic Enzymes IV. Effects of Sulfhydryl Group Modification on the Catalytic Function of NAD-linked Malic Enzyme from <u>Escherichia</u> <u>coli</u>
	(リンゴ酸酵素の調節機能に関する研究 IV. 大腸菌 NAD 要求性リ ンゴ酸酵素のシステイン残基の化学修飾による触媒機能の転換)

(主 査)
論文調査委員 教 授 香 月 裕 彦 教 授 川 出 由 己 教 授 波 多 野 博 行

論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌の NAD 要求性リンゴ酸酵素は Mn^{2+} 存在下に L-リンゴ酸を NAD によって脱水素してピルビン酸と二酸化炭素を与える反応を触媒する酵素である。申請者は本酵素が上記主反応の他に、オキサロ酢酸の脱炭酸反応（反応Ⅰ）、オキサロ酢酸の脱水素反応（反応Ⅱ）及びピルビン酸の脱水素反応（反応Ⅲ）をも触媒することを見出した。これらの反応には金属イオンが必要であり、また、反応の化学量論性を証明することができたので、これらは単一の酵素により触媒される反応であると結論した。すでに SH 基が主反応に必須であることを報告していたが（参考論文 1）、反応Ⅱ及びⅢにおける関与の仕方を明らかにするために次の実験を行った。まず、N-エチルマレイミド（NEM）で酵素を修飾すると、主反応及び反応Ⅰは失活するが、これと平行して反応Ⅱ及びⅢが約10倍にまで活性化することを見出した。主反応の失活速度に対する種々の化合物の影響を調べたところ、 Mn^{2+} は約 2 倍に促進し、基質アナログであるオキシロマン酸及び NAD は弱い保護効果を示した。 Mn^{2+} 及びオキシロマン酸共存下では失活は強く抑えられ、三者が共存すると失活はほとんど認められなかった。以上の結果から、SH 基が酵素の活性部位またはその周辺に存在することが示唆された。次に ^{14}C -NEM を用いて修飾を行うと、サブユニット当たり 1 個の SH が修飾されることにより、主反応及び反応Ⅰは約80%失活し、反応Ⅱ及びⅢが約10倍に活性化された。さらに、修飾が進み 2 個の SH 基が修飾されると、前者の二反応は完全に失活し、後者の二反応は僅かに活性化された。以上の結果から、NEM 修飾による酵素反応の変化は、最も反応性の高い 1 個の SH 基の修飾によることが示唆された。 Mn^{2+} 、NAD 及びオキシロマン酸共存下では、 ^{14}C -NEM は酵素と結合せず、0.3%ドデシル硫酸ナトリウム存在下においては、サブユニット当たり 4 個まで SH 基が修飾された。

NEM 修飾酵素と原酵素の性質が比較検討された結果、基質や補酵素に対する K_m 値は修飾により変化していなかった。このことは、修飾による主反応及び反応Ⅰの失活は、 K_m 値の変化によるものではなく、 V_{max} の低下によるものであることを示唆するものである。また、酵素の沈降係数や DEAX-Sephadex ク

ロマトグラフィーを行ったが、修飾酵素は原酵素とほとんど同じ挙動を示した。したがって、修飾により、酵素の会合、サブユニットへの解離及び荷電の変化などはほとんど起っていないことが推測された。

種々の SH 試薬を用いて修飾を行ったが、その反応性は試薬の構造により、若干の差異が認められた。p-マーキュリ安息香酸あるいは 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) による修飾は、2-メルカプトエタノールあるいはジチオトレイトールなどの SH 化合物の添加によりほぼ元の活性にまで回復させることができた。また、後者の試薬で修飾した酵素を KCN で処理すると酵素のチオシアノ誘導体を生じるが、この標品はほぼ元の活性をとりもどしているため、活性部位における SH 基に直接触媒反応に関与するのではなく、活性部位の構造維持に与ることが推測された。

参考論文 1 は、本酵素の精製及び一般的性質を調べたものであり、2 は本酵素の部分反応と NEM による酵素の修飾を、3 は本酵素のエフェクターによる調節機能を扱ったものである。同 4-6 は *Pseudomonas arvilla* C-1 の安息香酸水酸化酵素に関する研究であり、4 及び 6 において、これが二成分からなり、その一つがチトクロム C 還元酵素であること、ならびにその性質を明らかにしたものであり、他は末端酸素添加酵素であることを明らかにしたものである。

論文審査の結果の要旨

一般に、酵素は、その触媒する反応において、高い基質特異性をもち、特定の反応のみを触媒する。これに対して、少数の酵素は、本来触媒する反応（主反応）以外に、関連する反応（部分反応または副反応とよばれている）をも触媒する能力をもつことがある。あるいは、酵素が 2 種類以上の主反応をもつ多機能酵素である場合もある。このような酵素について、これらの複数の反応の相互関係、各活性の活性部位の異同、ならびに酵素の修飾に伴う各活性の変化を研究することは、主反応の反応機構を解明し、活性部位の構造を明らかにする上に有力な知見を提供するものである。

申請者の扱った酵素は、異化的機能をもつことが最初に証明されたリンゴ酸酵素であり、申請者によって高度精製が可能となり、その一般的性質が明らかにされ（参考論文 1）、活性調節機構が明らかにされた（参考論文 3）。同化的機能の色彩をもつ動物の NADP 要求性リンゴ酸酵素については、部分反応についての研究が若干報告されているが、細菌の酵素とくに NAD 要求性酵素についての研究はほとんどなされていなかった。申請者は組織的に本酵素の研究にとりくみ、これまで問題とされていた部分反応の全活性を証明することができた。酵素のアミノ酸残基中、まずシステイン残基に注目し、これを化学修飾することにより、主反応及び反応Ⅰは失活するのに反し、反応Ⅱ及びⅢは約 10 倍にまで活性化されることを見出した。これは部分反応をもつ酵素に関する研究のうちでも極めて興味深い知見である。四酵素活性を指標にして修飾酵素の再活性化ならびに酵素学的性質が研究された結果、これらの反応の間に異った挙動をとるものは見出されなかった。

このことは、反応Ⅰ～Ⅲが主反応の部分反応であることを推測させるものである。

ついで DTNB 修飾酵素を KCN で処理し、チオシアノ酵素を調製したが、これが原酵素と同程度の活性をもつことがわかった。このことは、いいかえれば SH 基修飾酵素は活性をもたず、チオシアノ酵素は活性をもつことである。このことは、酵素反応に際し、SH 基が反応に直接関与するのではなく、SH 基

周辺の空間構造が反応に重要であることを示唆するものである。これまで、化学修飾法により酵素のアミノ酸残基を修飾し、その残基が活性発現に必要であるか否かを論じた研究は数多いが、直接反応に関与するのか、もしくは修飾により活性部位の構造に影響を与えるのかを明らかにした研究は少い。この意味において、申請者の得た知見は貴重なものであり、今後に興味のある問題を投げたものといえる。

酵素が結合し、またはサブユニットへ解離し、もしくはアミノ酸残基に酵素的修飾を受け、その機能の転換を来すことが知られている。本酵素について申請者の発見した機能転換の現象の生理的意義の有無の問題はとも角として、細胞内における酵素の機能転換の一形式を示唆するものとして極めて興味のある知見である。以上、申請者の主論文は、リンゴ酸酵素の研究を大きく前進させたことはいうまでもないが、酵素の反応機構及び構造と機能の関係を解明する上に貢献するところ大なるものがある。参考論文の研究をも考慮し、本論文は理学博士の学位を授与するに値するものであると認める。