

氏 名	仁 平 卓 也 に ひら たく や
学位の種類	工 学 博 士
学位記番号	工 博 第 654 号
学位授与の日付	昭 和 55 年 3 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	工 学 研 究 科 工 業 化 学 専 攻
学位論文題目	Functional and Structural Aspects of Active Sites in Tryptophanase and β -Tyrosinase (トリプトファナーゼ及び β -チロシナーゼの活性中心の機能的、構 造的側面)
論文調査委員	(主 査) 教 授 福 井 三 郎 教 授 田 伏 岩 夫 教 授 伊 勢 典 夫

論 文 内 容 の 要 旨

補酵素型ビタミン B₆ (Pyridoxal 5'-phosphate, 略称 PLP) を補酵素とするいわゆるビタミン B₆ 酵素群には、種々のアミノ酸を基質として、アミノ基転移、脱炭酸、ラセミ化、各種の脱離・置換反応を触媒する酵素群が属し、唯一種の補酵素を用いるにも拘わらず、反応特異性という点に関して、極めて異質の性格を示している。中でも、 α 、 β -脱離反応を触媒する酵素群は、その活性発現に K⁺ などの無機一価陽イオン (略称 M⁺) を必要とする点で際立った特徴を有する。B₆ 酵素の一般的な反応機構に関しては、すでに充分な解明がなされているが、上記のような特異性発現の機構は、現在、未解決である。

本論文は、 α 、 β -脱離反応を触媒するビタミン B₆ 酵素、トリプトファナーゼと β -チロシナーゼについて、特異性発現の機構と密接に関連している、酵素の活性中心の微少な構造変化に関する研究をまとめたものである。内容は、4 部から成る。

第 I 部では、ゲルろ過法などにより、両酵素における M⁺ の役割を検討した。その結果、両酵素が、その活性発現に、K⁺ などの適当なイオン半径を持つ M⁺ を必須に要求することを見出した。更に、ホロ酵素の解離・会合におよぼす M⁺ の効果から、活性な M⁺ は、強固なアポ酵素-補酵素結合を生成・維持する能力、及び、アポ酵素と補酵素間でのシッフ塩基結合のみによって形成された不活性な複合体の高次構造の変化により、活性なホロ酵素に変換する能力を有することを明らかにした。これら 2 つの能力は、M⁺ の作用を各々異なった側面より解析したものであり、両者の根底にある M⁺ の役割は、酵素の活性中心に構造変化を生じさせ、触媒的に活性な微細環境を形成せしめることにあることが判明した。

第 II 部では、ホロ・トリプトファナーゼの光失活において、PLP が光増感剤としても作用する事を明らかにし、この現象を利用してヒスチジン残基の光修飾を行い、トリプトファナーゼの活性中心に活性発現に必須のヒスチジン残基が、活性中心当り 1 個存在し、この残基の修飾により酵素が失活することを証明した。その際、活性な M⁺ (K⁺, NH₄⁺, Rb⁺) は、ホロ酵素の失活を著しく促進するが、補因子として有効性の低い M⁺ (Li⁺, Na⁺, Cs⁺) は、失活促進作用がなく、触媒的に活性なホロ酵素においてヒス

チジン残基が光修飾されやすくなる事を示した。この結果より、ヒスチジン残基が、酵素反応に関与している事、並びに、この残基の反応性を指標として活性中心の構造変化を研究できる事を実証した。なお、このヒスチジン残基が、酵素反応中、基質の α -水素を引抜く役割を担っていることが、ホロ酵素の光失活速度に及ぼす種々の基質の効果から推定される。

第Ⅲ部では、チロシン残基を特異的に修飾する化学修飾剤 tetranitromethane, 略称 TNM) を用い、トリプトファナーゼの活性中心に必須チロシン残基が1~2個存在する事を明らかにした。TNM による酵素の修飾は、活性な M^+ (K^+ , NH_4^+ , Rb^+) が存在する場合にのみ、補酵素 PLP で保護された。この事実は、ヒスチジン残基の場合と同様、活性なホロ酵素に変換された構造変化の結果、PLP が修飾を受けるチロシン残基と近接し、これを保護する事を示すものであり、チロシン残基の反応性が、活性中心の構造変化のよい指標となる事を明らかにした。

第Ⅳ部では、不溶性担体に固定化した3種類の PLP 誘導体を用いたアフィニティ・クロマトグラフィーにより、 M^+ 、基質類縁体によるトリプトファナーゼの活性中心の構造変化を検討した。6位、3-0位、N位で固定化した PLP 誘導体のうち、N位の誘導体を親和性担体として用いた場合には、酵素の特異的な吸着はみられず、N位への置換基の導入は補酵素の結合を妨害する事を明らかにした。最も有効なのは、6位誘導体であり、この場合、トリプトファナーゼの特異的な溶出には、 M^+ を含まず、かつ基質類縁体(L-アラニン)を含む溶出液が必要である事から、PLP と L-アラニン間のアルドイミン転移が、アポ酵素と補酵素の結合を弱める事、及び K^+ 不在下という不活性な状態でも、酵素の活性中心は、PLP を保持する能力をある程度残している事を示した。又、粗酵素液を6位誘導体に負荷し、19倍の精製率が得られたことにより、この親和性担体が、トリプトファナーゼの分離・精製に有効な手段となり得る事をも明らかにした。

論文審査の結果の要旨

補酵素型ビタミン B_6 (Pyridoxal 5'-phosphate, 略称 PLP) を共通の補酵素とするいわゆるビタミン B_6 酵素群には、種々のアミノ酸のアミノ基転移、脱炭酸、ラセミ化、各種の脱離・置換反応を触媒する多様な酵素群が含まれる。これらの酵素における基質特異性がアポたんぱく質により規定されることは他の酵素の場合と同様と考えられるが、反応の型の決定は PLP と結合したホロ酵素の活性中心における PLP とそれに接近する複数個のアミノ酸残基により形成される微細環境により支配されるものと推定され、ビタミン B_6 酵素の重要な特徴として学問的興味の対象となっている。また、アミノ酸の生合成、生分解に関与するこれらの酵素の実用的重要性についても広く認められているところである。

本論文は L-トリプトファン の α 、 β -開裂による分解、あるいはその逆方向の合成反応または β 置換反応による L-トリプトファン及び類縁体の合成を触媒するトリプトファナーゼと、同様の作用機作で L-チロシンに働く β -チロシナーゼの活性中心に関し重要な情報を与えた次のような研究成果を記述している。

(1) トリプトファナーゼ、 β -チロシナーゼとも、その活性発現に K^+ イオンなどの適当なイオン半径を持つ1価陽イオンを必須に要求することを証明し、補酵素 PLP とアポ酵素との間のシッフ塩基結合の

みにより形成された不活性な補酵素・アポ酵素複合体が、有効な 1 価陽イオンの存在下で活性中心における高次構造の微妙な変化により酵素活性を持つホロ酵素になることを示した。

(2) ホロ・トリプトファナーゼが活性中心に結合した補酵素 PLP を光増減剤とする光失活を受けることを見出し、活性中心当り 1 個のヒスチジン残基の光修飾により酵素活性が完全に失われることを認めた。この光失活現象を種々の手法で解析し、有効な 1 価陽イオン存在下で生成するホロ酵素の活性中心で、PLP の近傍にヒスチジン残基が位置し、PLP と Schiff 塩基を形成した基質より α -水素を引抜き、酵素反応を進行せしめるのに重要な役割を演じることを強く示唆する結果を得た。

(3) チロシン残基の特異的化学修飾によるトリプトファナーゼの失活現象を調べて、本酵素の活性中心に必須チロシン残基 1～2 個が存在し、ホロ酵素ではチロシン残基が PLP に接近した位置を取ることを示した。

(4) 不溶性担体に相異なる部位を介して固定化した 3 種類の PLP 誘導体を用いるアフィニティ、クロマトグラフィーにより、1 価陽イオン、基質類縁体の共存下でのトリプトファナーゼの活性中心の構造変化に伴う PLP との親和性の変化、PLP 分子の修飾とアポ酵素との結合性の関係を調べた。またアフィニティ・クロマトグラフィーによるトリプトファナーゼの分離・精製のための新しい方式を設定した。

以上のように、本論文は学術的にも実用的にも重要な PLP 依存酵素トリプトファナーゼとその類縁酵素 β -チロシナーゼを対象として、活性中心の構造と機能に関する情報を与えるとともに、固定化 PLP を用いるアフィニティ・クロマトグラフィーによる分離・精製の新方法を樹立した成果を取扱っており、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。