

氏 名	花 井 一 光 はな い おず みつ
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 465 号
学位授与の日付	昭 和 52 年 5 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	理 学 研 究 科 物 理 学 第 一 専 攻
学 位 論 文 題 目	A Conformational Change in the Benzenboronic Acid-α-Chymotrypsin Complex — Evidence for a Conformational Change in a Tetrahedral Adduct of α -Chymotrypsin — (ベンゼンホウ酸- α -キモトリプシン複合体での構造変化- α -キモ トリプシン四面状態付加物での構造変化の証拠—)
論文調査委員	(主査) 教授 寺本 英 教授 浅井健次郎 教授 松原武生 教授 大井龍夫

論 文 内 容 の 要 旨

酵素反応の機構を解明する上で、酵素と基質の複合体での活性部位と基質の反応部位との相互作用に関する知見を得ることはきわめて重要である。ところが基質は速やかに反応してしまうために、じっさいの酵素・基質系でそれを検出することは至難なことである。そこで、申請者はこの問題を解析する手だてとして、酵素反応の遷移状態類似の安定な複合体を作る遷移状態類似阻害剤に着目し、これと酵素の相互作用を詳細に調べている。

とりあげた系は α -キモトリプシンと、その遷移状態類似阻害剤であるベンゼンホウ酸(BBA)であり、BBAはこの酵素と反応中間体である四面中間状態類似構造の四面状態付加物を作る。申請者は、この反応系での相互作用をプロトン滴定法による静的な側面からと、温度ジャンプ法による動的な側面の両面から解析している。まず、プロトン滴定法により、BBAが α -キモトリプシンと複合体を形成するときにプロトンが放出されることを見出しているが、BBAと α -キモトリプシンのいくつかの誘導体の間でのプロトン放出を検討することによって、三方構造のBBAが酵素の活性セリンと反応して四面体付加物を形成し、そのときにプロトンが放出されることを明らかにした。またプロトン放出量のpH依存性と温度依存性を詳細に検討して、BBAが三方構造から四面体構造に変換するときに放出されるプロトンが、荷電リレー系のHis 57に受容されることを推論している。

一方、相互作用の動的な側面からの知見を得るために、pH指示薬を利用した温度ジャンプ法によって反応過程の詳細な研究を行なっている。まず、キモトリプシンの不活性前駆体であるキモトリプシノーゲンとBBAの反応過程を調べ、その温度ジャンプによる化学緩和の2段階機構を解析して、中間体としてキモトリプシノーゲンと三方構造BBAの非共有結合による複合体と、BBAが共有結合によって活性セリンと四面体付加物を作っている複合体があることを明らかにしている。さらにこの反応過程における速度定数のpH依存性と重水効果を解析し、四面体付加物を作った状態で、His 57が強いプロトン受容器として機能していることを明らかにしている。BBAと α -キモトリプシンの系でも温度

ジャンプによる緩和が見られるが、この系ではBBAとキモトリプシノーゲンの系と違って、緩和時間の逆数が実験された範囲で濃度依存を示さなかった。この緩和機構を明らかにするため、申請者は種々の類似物質についての実験を系統的に行ない、速度論的解析を駆使して、 α -キモトリプシンの活性セリンと共有結合によって形成された四面体付加物複合体が2つの異った構造をとりうるという新しい事実を明らかにしている。この構造変化は、リガンド側の電気陰性度の高い2個の原子と酵素側のオキシアニオンホール、His 57との水素結合による相互作用に起因するものであるという結論を与えた。この四面体付加物の構造変化が、じっさいの触媒反応に対していかなる意味をもつかが議論されている。

このように、申請者は酵素反応の素過程とくに中間複合体での酵素の活性部位と基質の反応部位との相互作用を、静的ならびに動的側面から系統的な実験を行なって解析し、その微細な構造変化についてきわめて重要な知見を得ている。

論文審査の結果の要旨

酵素反応の素過程、とくに中間複合体での酵素の活性部位と基質の反応部位との相互作用ならびに構造変化に関しての知見を得ることはきわめて重要である。一般には基質が速かに反応してしまうためにじっさいの酵素と基質の系で、この中間状態の性質を調べることは非常に困難なことである。申請者はこの問題を解析する手段として、酵素反応の遷移状態類似の安定な複合体を作る遷移状態類似の阻害剤を用いて、これと酵素の相互作用を、静的ならびに動的側面から詳細に解析し極めて重要な結果を得ることに成功している。

とりあげた系は α -キモトリプシンと、その遷移状態類似阻害剤であるベンゼンホウ酸(BBA)の系であり、BBAはこの酵素と反応中間体として四面中間状態類似構造の四面体付加物を作る。まず、この反応系での相互作用をプロトン滴定法によって調べ、BBAが α -キモトリプシンと複合体を形成するときに放出するプロトンの量のpH依存性と温度依存性を検討して、BBAが三方構造から四面体構造に変換するときに放出されるプロトンが、荷電リレー系のHis 57に受容されることを明らかにしている。

一方、相互作用の動的な側面からの知見を得るために、pH指示薬を利用した温度ジャンプ法によって、反応過程の詳細な研究を行なっている。まず、キモトリプシノーゲンとBBAの系の化学緩和の2段階機構が、中間体としてのキモトリプシノーゲンと三方構造BBAの非共有結合による複合体と、BBAが共有結合によって活性セリンと四面体付加物を作っている複合体の形成に起因していることを明らかにしている。さらに速度定数のpH依存性と重水効果を解析して、四面体付加物を作った状態でHis 57が強いプロトン受容器として機能していることを明らかにした。さらに α -キモトリプシンとBBAの系での温度ジャンプによる化学緩和では、緩和時間の濃度依存性が見られないという事実に着目し、この機構を明らかにするために類似物質を用いた系統的な実験を行ない、速度論的な解析を駆使して、 α -キモトリプシンの活性セリンと共有結合によって形成された四面体付加物複合体が2つの異なった構造をとりうるという新しい事実を発見している。この構造変化に関係している相互作用機構を検討して、その触媒反応で果す役割について有意義な議論を与えている。

申請者が、ここで明らかにしている新しい多くの知見は、酵素反応の素過程に関する今後の研究に基礎的な知見を与えるものとして重要な寄与をするものといえる。また参考論文3編はいずれも酵素反応の速度論的な研究に関するもので、申請者がこの方面の研究者としてすぐれた能力を持つことを示している。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。