

氏 名	亀 下 勇 かめ した いさむ
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 582 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 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの触媒機能および 制御機能に關与するアルギニン残基

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

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼは、ホスホエノールピルビン酸に炭酸を固定し、トリカルボン酸サイクルの中間体であるオキザロ酢酸を供給する酵素である。本酵素は典型的なアロステリック酵素の一つであり、多くのエフェクターにより活性の調節を受けることが知られている。大腸菌W株の本酵素は、L-アスパラギン酸により阻害を受け、アセチル CoA, フルクトース 1, 6-二リン酸, GTP などのグアニンスクレオチドならびに長鎖脂肪酸により活性化を受ける。

申請者の研究室においては、これまで、大腸菌の本酵素の活性および制御の機能発現に必要なアミノ酸残基の検索を行ってきた。申請者は、これらの研究の一環として、アルギニン残基に着目し、酵素を 2, 3-ブタンジオンで修飾し、活性および制御の機能発現に及ぼす影響を調べた。

本酵素をブタンジオンとホウ酸緩衝液存在下に反応させると、擬一次的に失活した。ブタンジオンの濃度を種々に変え、失活速度定数を調べた結果、本酵素に対しサブユニット当たり1分子のブタンジオンが反応することにより、完全失活が起こることが示唆された。また、修飾に際して、本酵素の基質であるホスホエノールピルビン酸の類縁体であるDL-ホスホ乳酸を添加しておくと、失活は著しく保護された。この結果は、ブタンジオンにより修飾されるアミノ酸残基が触媒部位またはその近傍に位置することを示唆するものである。

次に修飾された酵素のアロステリックな性質を調べるため、残存活性20%の修飾酵素に及ぼす種々のエフェクターの効果を調べた。その結果、修飾酵素はフルクトース 1, 6-二リン酸と GTP に対する感受性を全く失っており、他のエフェクターの感受性はほとんど変化していないことがわかった。ホスホ乳酸存在下における修飾に際しても、これらの両エフェクターに対する脱感作は同様に観察されたので、触媒部位における修飾とは独立に両エフェクターによる制御部位にも修飾が起こっていることが示唆された。さらに、修飾酵素の性質について調べた結果、ホスホエノールピルビン酸に対する Km 値, Hill 係数および活性の至適 pH は原酵素のものと変らなかった。この結果から、修飾酵素のエフェクターに対する感受

性低下が脱感作によるものであり、基質に対する半飽和濃度の変化によるものでないことが明らかになった。また、修飾酵素の Sepharose 6 B カラムクロマトグラフィーおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動その他の実験から、修飾により分子量の変化や分子の解離・会合は起っていないことが推測された。また、興味あることに、観察された失活や脱感作はホウ酸を除くことにより失われ、ほぼ、原酵素の活性と感受性と同程度にまで、それぞれ恢復した。次に、ブタンジオンによる修飾に際し、種々のエフェクターを添加しておき、それらの失活に及ぼす効果を調べた。L-アスパラギン酸は全く保護効果を示さず、ラウリン酸とアセチル CoA は弱い保護効果を示した。フルクトース二リン酸は単独でも強い保護効果を示したが、アセチル CoA と共存すると、失活は完全に抑えられた。このことは、特定のエフェクターの結合により、酵素の触媒部位またはその近傍にコンホメーション変化を生じたことを推測させるものである。

以上の実験において修飾されたアミノ酸残基の同定ならびに定量を行う目的でアミノ酸分析を行った結果、酵素の完全失活に伴い、サブユニット当り 7 個のアルギニン残基が修飾されることがわかった。ホスホ乳酸もしくは、フルクトース二リン酸存在下に修飾を行った実験と合わせ考慮した結果、触媒部位に 1 個の、フルクトース二リン酸の結合部位に 1~2 個の、アルギニン残基が、それぞれの活性に必須であることが示唆された。

以上の実験結果から、リン酸基やカルボキシル基をもつ基質およびエフェクターが、これらの基を介して酵素と結合するに際し、アルギニン残基が関与していることが示唆された。

参考論文も本酵素を種々のプロテアーゼで処理して活性及びエフェクター感受性に及ぼす影響を調べたものである。

論文審査の結果の要旨

本酵素は多数のエフェクターによって活性の制御を受ける数少ない酵素の一つとして有名である。各エフェクターは酵素に結合し、酵素の解離・会合を起こし、またはコンホメーション変化を起こすことによって、その制御機能を発揮するものと考えられている。しかし、各エフェクターの結合部位の独立性、これらの各部位および触媒部位の空間的位置関係、各部位のペプチド構造、についてなされた研究はきわめて僅かである。申請者の研究室においては、上述の諸問題の解明をめざして研究が進められてきた。

申請者はアルギニン残基に注目し、ブタンジオンを用いて、酵素の修飾実験を行った。その結果、触媒部位に 1 個の、制御部位に 1~2 個のアルギニン残基が存在し、これらが両機能の発現に重要な役割を果たしていることを示唆する知見を得た。これは、単に本酵素に関する研究のみならず、アロステリック酵素の構造と機能に関する研究の進歩にとり貴重な知見であるといえる。本酵素にとっても、フルクトース二リン酸の結合部位と GTP の結合部位の異同が問題とされてきたが、申請者の研究により、ほぼ、この問題が解決されるに至った。すなわち、両エフェクターは、いずれも分子内にリン酸を含み、その結合部位のアルギニン残基と結合すると考えれば、多くの場合、両エフェクターの脱感作が同時に起こることは不思議ではない。しかし、両部位が完全に同一であるか否かという問題は、今後の研究に待たなければならない。

次に、申請者の研究成果のうち注目に値するものは、エフェクターに対する脱感作の可逆性の証明であろう。これまで、多くのアロステリック酵素について観察された脱感作に関する報告は多いが、一旦、脱感作させた酵素を再び最初の感受性をもった酵素に再生させた研究は数少ない。申請者の行ったこの実験の結果は、別の角度からみれば、本酵素がブタンジオン処理により修飾以外の二次的影響を受けていなかったことを示すものである。

参考論文においては、本酵素は種々のプロテアーゼとくにズブチリシンにより恐らく複数箇所においてペプチド鎖の切断を受けるが、ホスホ乳酸もしくはエフェクター存在下に修飾を行うと、他の部位における切断は起るが、触媒活性もしくは制御活性が、それぞれ、保持されることが示された。本酵素に二つの論文で示された手法を合わせ適用することにより、今後、飛躍的な研究の進展が期待される。

よって、本論文は理学博士授与に値するものであると認める。