

氏 名	唄 安 夫 ばい やす お
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 216 号
学位授与の日付	昭 和 50 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	農 学 研 究 科 農 芸 化 学 専 攻
学位論文題目	Studies on Mechanism and Active Site of Carboxypeptidase Y (カルボキシペプチダーゼYの反応機作と活性中心に関する研究)

論文調査委員 (主 査)
教 授 秦 忠 夫 教 授 廣海啓太郎 教 授 山 田 秀 明

論 文 内 容 の 要 旨

パン酵母から単離されたカルボキシペプチダーゼY (CPase Y) は、ペプチドやタン白質のカルボキシ末端からアミノ酸を逐次遊離させるエキソペプチダーゼであり、特にその基質特異性の広いこと、およびエステラーゼならびにアミダーゼの活性をも合わせもつことなど興味深い酵素として注目され、その本態の究明がまたれている。

本論文は、この酵素の反応機作ならびに活性中心構造を明らかにするための詳細な研究結果をまとめたもので、その内容は大きく2つに分けられる。

I 反応速度論的研究

著者は自身で、約50種以上のアシルジペプチド ($P_1-R_2-R_3$)、あるいはアシルアミノ酸エステルおよびアミドを系統的に合成し、これを基質にしたときの分解作用を Michaelis-Menten 式に基づき解析して、それらに対する動力学的定数 (k_{cat} , K_m および k_{cat}/K_m) のそれぞれを比較検討した。その結果、ペプチダーゼの基質としての特異性は、 R_1 , R_2 および R_3 の変化の仕方がアミノ酸の性質に特徴的であること、あるいはエステラーゼの基質としては、アルコール部分の相異により変化することを明らかにした。

さらに代表的な基質に関して、動力学的定数の各々に与える pH の影響をしらべて、各種の反応に関与する酵素のそれぞれの解離基の pK を推定した。また塩類、有機溶媒の影響をも明らかにした。

また、加水分解反応に及ぼす重水効果や、ヒドロキシルアミノリシスも研究し、キモトリプシンの場合と比較している。さらに、基質あるいは反応生成物の類縁化合物による可逆的な阻害効果などについても詳細に検討を加えた。

II 活性中心に関する研究

DFP やフェニルメタンスルホニルフルオリドなどのセリン修飾試薬と本酵素の反応を詳しくしらべ、本酵素が活性セリンを1個有することを確認するとともに、精密な金属分析を行って、亜鉛などの金属を含有しないことを確認した。

また、活性中心指向性試薬であるカルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンのクロロメチルケトン誘導体、特にその ^{14}C でラベルしたものをも合成して、酵素と反応させ、ヒスチジン残基が触媒活性に関与することを明らかにして、キモトリプシンなどで推定されている His-Ser の電荷リレー系の存在を示唆した。

さらに、各種水銀剤などの SH 試薬を本酵素と反応させて酵素作用の影響を詳細に検討して、SH 基が 1 個存在し、基質との相互作用に関与していることを明らかにした。

また、アルギニン残基の化学修飾を行い、本酵素は CPase A や B の場合と異なり、アルギニンは直接酵素作用には関与していないことを実証した。

以上の研究結果から、本酵素は従来の CPase とは異なり、活性中心には金属を必要とせず、キモトリプシンのようにセリンとヒスチジンを含む電荷リレー系が形成されていること、および近傍に 1 個のシステイン残基があって基質との相互関係に関係していることが明らかとなり、さらにはそれらの活性中心が疎水的環境にあって、基質に対して許容性の広い構造を有していることが推定された。

論文審査の結果の要旨

パン酵母から単離された CPase Y は、ペプチドあるいはタン白質のカルボキシ末端から、中性アミノ酸はもとよりプロリンをも遊離し得る、特異性の広いエキソペプチダーゼであり、さらにアシルアミノ酸エステルおよびアミドをも水解できるので、生化学的にも、また応用の面でも注目され、その本態の究明が期待されている。

著者は、自ら 50 種以上のアシルジペプチドあるいはアシルアミノ酸エステルおよびアミドを系統的に合成して、これらを基質にしたときの分解作用を明らかにした。

すなわち、Michaelis-Menten 式に基づく解析を行うとともに、代表的な基質について動力学的定数に与える水素イオン濃度、塩類の種類および濃度、あるいは有機溶媒の影響をしらべ、さらには重水効果やヒドロキシルアミノリシスについても検討した。そしてこの酵素の反応の特徴を明らかにするとともに、酵素の活性部位が疎水的環境にあり、基質に対して許容性の広い構造を有していることを推定した。

著者はまた、本酵素の活性中心について、まず精密な金属分析を行って、本酵素が脾臓の CPase A や B とは異なり、亜鉛などの金属を含まないことを確認するとともに、各種化学修飾法を駆使して、活性に関係するアミノ酸残基をしらべた。その結果、本酵素はキモトリプシンやトリプシンのようにセリンとヒスチジンを触媒性残基として含み、それがペプチダーゼおよびエステラーゼ両作用を担っていることを明らかにし、これにもとづきキモトリプシンについて提唱されている電荷リレー系の存在を示唆した。

また活性中心には 1 個のシステイン残基があり、基質との相互作用に関与していることを推定した。

このように本論文は、酵素反応の詳細な動力学的考察と、精密な活性中心の研究により、CPase Y の本態の究明に大きな手掛かりを与えたもので、生化学特にタン白質生化学、ならびに酵素学に寄与するところが多い。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。