

氏 名	水 田 啓 子 みず た けい こ
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 452 号
学位授与の日付	昭 和 52 年 3 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	プロテアーゼによるアスパルターゼの活性化に関する研究

論文調査委員 (主 査) 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

アスパルターゼは L-アスパラギン酸を脱アミノしてフマル酸を生じる反応を可逆的に触媒する酵素であるが、他の脱アミノ反応を触媒する酵素と異なり、その活性中心にピリドキサルリン酸またはカルボニル基を含まないとされている。申請者は、まず、本酵素により触媒される反応の機構を調べるために、反応に SH 基が関与するか否かという問題について研究した。大腸菌 W 株から高度精製した本酵素の均一標品に N-エチルマレイイミド (NEM) その他の試薬をはたらかせ、SH 基の化学修飾を行った結果、サブユニット当り 9.5 個の SH 基が存在すること、そのうち 2 個が反応性に富むこと、さらに活性発現には 1 個が必須であることを明らかにした。NEM による修飾において、 $MgCl_2$ と共に基質 (アスパラギン酸、またはフマル酸とアンモニア) を加えて反応させると、これらの化合物は強い保護効果を示した。

次に、申請者は本酵素にトリプシンをはたらかせたところ、数分間以内にその活性は約 3 倍に上昇し、その後は次第に失活し、数時間後には完全に活性がなくなるという現象を発見した。この活性化ならびにその後の失活は、SH 基の修飾の場合と同様に、基質であるアスパラギン酸やフマル酸によって保護された。酵素が活性化された段階においてトリプシンインヒビターを添加すると、その後の失活は阻止され、上記の現象がトリプシンの酵素作用によるものであることがわかった。次に、トリプシンによって活性化された酵素を、上述の方法で反応を止め、どの程度の限定分解を受けているかということについて調べた。セファロース 6B カラムクロマトグラフィーや SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったが、活性化された酵素は 4 量体構造をそのまま維持し、かつ、ほとんど分子量に変化を生じていないことがわかった。したがって、ポリプチド鎖から微少な断片が切断されたものと推測された。しかしながら、活性化された酵素では 280 nm 付近に負の差吸収スペクトルが観察され、芳香族アミノ酸残基が露出されていることが示唆された。pH-プロファイルは原酵素とほとんど変らなかったが、アスパラギン酸の飽和曲線は著しく変化した。すなわち、pH 7.0 においては、活性化酵素は原酵素にくらべ 3 倍高い V_{max} を示し、pH 8.5 においては、7 倍も大きな $S_{0.5}$ 値を示した。また、基質 (L-アスパラギン酸) に関する Hill 係

数 n の値が pH 7.0 においては 0.3 から 0.7 へ、また pH 8.5 においては 1.5 から 2.1 へと増大しており、サブユニット間相互作用に変化を生じていることが示された。

原酵素は 4 M 塩酸グアニジンによってサブユニットへ解離し、さらに高次構造の破壊が起こるが、溶液を希釈することにより、高次構造と酵素活性が回復することが知られている。申請者はトリプシンについてそのインヒビターで処理することによって得られた活性化酵素を塩酸グアニジン処理した後希釈すると、原酵素の活性の 150% にまで活性が回復することを認めた。このことは活性化酵素が安定な分子種として存在することを意味する。

トリプシン以外のプロテアーゼの効果についても検討したところ、ズブチリシン BPN'、プロナーゼおよびエラスターゼも活性化効果をもつことが確かめられた。ズブチリシン BPN' によって活性化された標品について、その構造と酵素化学的性質を調べた結果、トリプシンによって活性化された標品の性質と非常に似ていることがわかった。したがってズブチリシン BPN' によって切断される位置は、トリプシンによって切断される位置と同じかもしくはその近傍であることが推測された。

参考論文その一は、アスパルターゼがグリセロールその他の多価アルコールによって活性化される現象ならびにその機構に関する研究を扱ったものであり、その二は、アスパルターゼを塩酸グアニジンによって変性させた後、希釈により起る酵素活性ならびに構造の回復を研究した論文である。

論文審査の結果の要旨

申請者は、アスパルターゼの構造に関する研究を始めるに当たり、まず、反応性の高い SH 基についての知見を得ておくために、種々の試薬を用いて SH 基の所在ならびに反応性に関して実験を行った。1 個のサブユニット当りの SH 基の数が少ないため、解析が容易であったが、1 個の SH 基が活性発現に必須であることを確認した。ついで、アスパルターゼをプロテアーゼによって限定分解をするため、トリプシンをはたらかせた。その結果、反応の初期に、一時的に 3 倍もの高い活性化が見られ、その後は次第に失活して行くことを発見した。一般に酵素蛋白分子を化学的にもしくは酵素により修飾もしくは切断すると、部分的もしくは完全な失活を伴うのが普通である。しかしながら、この場合には顕著な活性化が見られたことは、極めて異例のことであり、注目に値する現象である。この蛋白と原酵素とは、分子量の上からほとんど差異がないため、切断された部分は小さなペプチドであることを示唆し、この構造決定は今後の問題として残されている。活性化された酵素は基質飽和曲線において原酵素とは非常に異なり、また Hill 係数においてかなりの変化を生じていた。このことは、切断された部分は極めて小さいにもかかわらず、サブユニット間相互作用にはかなりの変化が起っていることを示している。将来、ペプチド部分の構造が決定されれば、一次構造と四次構造との関連について手懸りが得られるわけであり、この意味においても、本研究の寄与は大きなものがあるといえる。

また、本酵素は、参考論文にも見られるように、塩酸グアニジンにより変性させても、単にその溶液を希釈するのみで容易に原酵素の性質を回復するという顕著な特性を有する。申請者はこの可逆的な変性法を活性化された酵素に適用したところ、原酵素と同じように、最初の性質を回復することをほぼ確認している。このことは活性化された酵素の立体構造が相当に安定であり還元性の高いものであることを示唆して

いる。多くの生化学者は蛋白質がポリペプチド鎖形成後、その高次構造を完成して行く機構に関心をもっているが、申請者の用いた系はこの問題の解明に極めて興味ある研究対象であり、この問題を推進する上にも本研究の価値は頗る大きいといわねばならない。

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。