

氏 名	吉 永 侃 夫 よし なが たけ お
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	論 理 博 第 566 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 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on Phosphoenolpyruvate Carboxylase of Escherichia coli—Multiple Conformational States Elicited by the Allosteric Effectors and Structural Specificity of the Allosteric Inhibitor— (大腸菌ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの活性に対応 するコンホーメーションの多様性と阻害因子の構造特異性について) (主 査) 論文調査委員 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

大腸菌のホスホエノールピルビン酸 (PEP) カルボキシラーゼは、解糖系の代謝中間体である PEP に炭酸を固定して、トリカルボン酸サイクルにオキサロ酢酸 (OAA) を供給する役割を担っており、代謝調節の上から重要な酵素である。このことを反映して、本酵素は多種類のアロステリックエフェクターによって、その活性の調節を受けることが知られている。申請者は、本酵素の活性調節機構の研究に従事し、これまでに酵素を高度精製し (参考論文 1)、その分子的性質を明らかにした (参考論文 4)。また、申請者の属していた研究室においては、突然変異法や化学修飾法などの手段により、上記エフェクターの大部分が本酵素に対し、それぞれ別個の部位に結合して、コンホーメーション変化をもたらし、活性制御を行っていることが明らかにされた。しかし、その大部分の研究は酵素活性の変化を解析することによってなされた研究であった。

申請者は、主論文 1 において、これと異った方法を用い、活性変化に対応するコンホーメーション変化を蛍光ラベル法を用いて解析した。すなわち、1-アニリノナフタレン-8-スルホン酸 (ANS) を酵素に作用させ、結合実験及び酵素-ANS 複合体の蛍光強度の測定を行ない、次の事実を明らかにした。1)、本酵素のサブユニット当り、約 2 分子の ANS が結合し、その結合場所は活性部位及び調節部位と異なる。2)、種々の濃度の各エフェクターを加え、最大蛍光強度 (I_{max}) および、最大蛍光変化の 50% を示すに要する ANS の濃度 (K_f) を測定した結果、エフェクターに特有な効果が認められた。3)、このような蛍光変化は、エフェクターの代りにその構造類似体を用いた場合、ならびに、本酵素の代りにアルブミンを用いた場合、には見られなかったので、上記の効果はアロステリック効果に関係するものと推測された。4)、しかも、エフェクターの濃度増加に伴って変化する I_{max} および K_f の変化量の 50% を示すに必要なエフェクターの濃度は最大酵素活性変化の 50% を示すに必要なエフェクター濃度とよく一致した。したがって、蛍光変化に見られるエフェクターの効果はヘテロトロピック効果を反映していると見てよい。5)、二種のアクチベーターの間 (アセチルコエンチーム A とフルクトース-1, 6-ビスリン酸) も

しくはインヒビターとアクチベーターの間（アスパラギン酸と上述のいずれかのアクチベーター）は互いに他の蛍光変化に影響を及ぼし合ったが、これはヘテロトロピック効果によるものと推定された。これらの知見を総合した結果、蛍光ラベル法による解析から、種々の組み合わせのエフェクター添加により、活性変化に対応したコンホメーション変化として、少なくとも4種の型を区別し得ることを明らかにした。

主論文2は本酵素のインヒビターの構造特異性を明らかにし、その結合部位を推測したものである。天然のインヒビターとしてはL-アスパラギン酸およびL-リンゴ酸が知られているが、これまでその構造特異性は明らかにされていなかった。申請者は両化合物の構造類縁体として約20種の化合物の阻害度を調べ、阻害に必要な構造特異性を明らかにした。しかし、両化合物とも、反応生成物であるOAAに構造が類似しているため、活性部位にも結合する可能性が考えられた。一連の化合物の結合部位について知見を得るために、次のような実験を行なった。申請者のグループの業績として、酵素の活性部位を保護しておき光照射すると、酵素活性は保たれているが、アスパラギン酸に対する感受性が失われることが知られていた。申請者はこれを利用して、光照射した酵素についても、上記化合物の阻害度を調べた。光照射前の酵素に対してはアスパラギン酸、リンゴ酸が強い阻害を示し、OAAの効果は弱かった。これに反して、処理後の酵素に対しては、全体として阻害度は弱まったが、OAAが最も強く阻害し、アスパラギン酸の阻害は弱かった。また、詳しい阻害実験を行なった結果、OAA、リンゴ酸はその濃度を増すと完全阻害を与えることが示唆されたのに反し、アスパラギン酸の阻害は部分阻害を示した。これらの結果から、アスパラギン酸は阻害部位のみに結合すること、OAAは主として活性部位に、一部は阻害部位に結合すること、これに対しリンゴ酸は両部位に結合することによって、阻害を示すことが示唆された。

その他の業績として、本酵素が長鎖脂肪酸またはそのCoA誘導体によって活性化されることを発見し（参考論文2）、その調節機構を総合的に論じた（同、3）。これらの他に、 δ -アミノレブリン酸脱水酵素の活性発現にヒスチジン残基の関与を明らかにした研究もある（同、5）。

論文審査の結果の要旨

アロステリック酵素の活性変化に対応するコンホメーション変化およびその転移を説明するために出されたモデルとして、Monodらの“two-states model”とKoshlandらの“multi-states model”が有名である。しかし、その実験的裏づけは不十分であり、多くの研究の蓄積が要望されている。申請者が取り上げたホスホエノールピルビン酸（PEP）カルボキシラーゼは、多種類のエフェクターをもつ点において大きな特徴をもつので、活性変化に対応するコンホメーションとして何種類のものが区別できるか、このことが活性調節機構を解明する上にどのような意義をもつかという問題が注目されていた。これまで申請者のグループにおいてなされた研究は、化学修飾、熱失活、圧失活および酵素による修飾などの方法が用いられたが、いずれも酵素の活性変化を指標にしたものである。

申請者は、主論文1において、蛍光ラベル法を用い、活性部位および調節部位以外の部位の構造変化に注目し、エフェクターの結合により起るコンホメーション変化が同様に認められることを発見した。この知見は他の方法では得難いものであり、本酵素の調節機構を解明する上に価値の高いものである。さら

に、この光変化とアロステリック効果との関係について必要な条件を設定し、これらが満たされることを美事に証明した。また、2種以上のアクチベーターが共存する場合には、それぞれ単独の場合とは異なるコンホーメーションをとること、さらにアクチベーターとインヒビターが共存する時にヘテロトロピック効果が見られることを酵素活性以外の面において証明したことは、本酵素以外ではほとんど研究されていないことであり、酵素活性調節機構を解明する上に貢献するところ大である。以上の研究は先に述べた2つのモデル中で Koshland らのモデルを支持するものであり、この意味からいっても価値の高いものである。

第2部はインヒビターの構造特異性を明らかにし、その結合部位に関し有力な知見を与えられたものである。多くの構造類縁体について阻害度を測定し、その結果を機械的に解析することはそれ程困難なことではない。しかし、本酵素の場合、インヒビターが反応生成物であるオキサロ酢酸とも構造が類似しているため、その解析は新たな障害に直面した。しかし、申請者は光照射前後の酵素に対する阻害度の比較および阻害形式の解析によって、2つの天然のインヒビターであるアスパラギン酸とリンゴ酸、および反応生成物であるオキサロ酢酸の結合部位について興味ある知見を得ることができた。さらに、この知見に基づきネイティブな酵素について得られた化合物の阻害度は、アロステリックインヒビターの構造特異性を示していると考えて差し支えないことを指摘した。この推論を導き出す上に用いた手法は鮮やかであり、申請者の高い研究能力を示している。

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。