

氏 名	森 川 實 もり かわ みのる
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 458 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 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	大腸菌の Phosphoenolpyruvate Carboxylase のアロステリックエフェクターの突然変異法による脱感作と結合部位の異同に関する研究

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

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、PEPに炭酸を固定しオキサロ酢酸を与える反応を触媒する酵素である。トリカルボン酸サイクルの作動を左右する重要な機能をもっているため、本酵素の活性はアセチルコエンチームA、フルクトース1, 6—二リン酸、脂肪酸などによって活性化され、L—アスパラギン酸などによって阻害される複雑なアロステリック酵素である。これらのエフェクターが酵素蛋白に結合する部位に関し、全部が異なるかもしくは一部が共通であるかということは、調節機構を明らかにする上に極めて重要な問題である。申請者は、研究手段として、突然変異を利用したエフェクターの脱感作に着目して、この問題を解明しようとした。まず、PEPカルボキシラーゼ活性をもたない変異株を突然変異誘起剤で処理し、再び酵素活性をもつに至った活性復帰株を多く単離した。このような株について無細胞抽出液を調製し、各エフェクター存在下に、8mM PEPに放射性炭酸を加えて行なうトレーサー法によって活性を測定した。このようにして得られた各エフェクターに対する感受性を野生株の感受性と比較検討した。変異株の酵素の感受性は様々に変化していたが、複数のエフェクターが特定の組み合わせを作って脱感作するような現象は見出されなかった。いいかえれば、各エフェクターの感受性変化はいずれも独立に起ることが示唆された。このことは、これらの結合部位がいずれも異なることを推測させるものである。しかしながら、変異酵素のPEPに対する K_m 値およびその他の性質も同時に変化していた。したがって、一つの可能性として、さきのトレーサー実験で見られた脱感作は、実は真の脱感作ではなく、PEPの K_m の変化ならびにPEPとエフェクターとのヘテロトロピック効果が増加したために、見掛け上エフェクターに対する脱感作が観察されたのではないかという懸念が生じる。この問題を検討するためにPEP濃度を1 mMに固定した「標準法」と、PEPに対する K_m 変化を考慮し同一活性飽和度を与えるようなPEP濃度を用いた「基質等価法」とを用いて、活性測定を行なうことにした。両者の長短は理論的に考察され、エフェクターに関する速度定数をその他の定数から分離して観察できる条件が検討された。申請者は活性復帰株

の代表として、ER 1—70株を選び、PEPカルボキシラーゼを部分精製し、その性質を野性株の酵素の場合と比較した。まず、熱安定性について調べたが、ER 1—70株の酵素は野性株の酵素にくらべて安定性が低く、エフェクターの保護効果の程度も異っていたが、電気泳動によっては両者を区別することができなかった。ついで、エフェクターのアロステリックな性質を標準法により検討したが、各アクチベーターの最大活性化率の50%を与える濃度 ($A_{0.5}$) は変化していたが、インヒビターの最大阻害率の50%を与える濃度 ($I_{0.5}$) は変らなかった。また、PEPに対する $S_{0.5}$ 値はER 1—70株の場合は3.3 mMを示し、野性株では16 mMであった。次に上記の性質は基質等価法を用いて同様に検討された。すなわち、両酵素に対し活性が25%飽和になるようにPEP濃度が選ばれ (ER 1—70酵素では1.9mM、野性株酵素では6.0 mM) 測定が行なわれた。この方法によると、ER 1—70酵素の感受性は、脂肪酸に対してのみ半減しており、その他のエフェクターに対しては変化を生じていなかった。この結果は標準法による結果とは異っており、トレーサー法の結果とは合致していた。他の変異酵素についても、粗酵素標品を用いて、その主な性質が検討された。以上の結果を総合した結果、エフェクターに対する感受性の変化を比較するには基質等価法が優れていることは明らかであるが、本酵素の場合には、トレーサーによる結果が、特定のPEP濃度で測定はしているものの、許容範囲内に入っていることがわかり、その結果は信頼できることが明らかにされた。したがって、トレーサー法によって測定した活性復帰株の変異酵素の脱感作の実験から、少くとも上記4つのエフェクターの結合部位はそれぞれ独立していると考えてよいことが明らかになった。

参考論文1は、大腸菌PEPカルボキシラーゼが脂肪酸またはその CoA チオエステルによって活性化されること、ならびにその活性化機構、その結合部位および活性化の生理的意義を扱った論文である。参考論文3は、主論文の内容をも含めて、本酵素の活性調節機構・速度論的研究その他について述べた総合論文である。参考論文2は、細胞内の代謝中間体のプールの大きさ、濃度、濃度分布および存在状態を論じた論文である。

論文審査の結果の要旨

生細胞の酵素活性調節機構を解明する上に、アロステリック酵素の研究は大きな部分を占める。アロステリック酵素の多くは少数のエフェクターによって調節されるが、大腸菌のホスホエノールピルビン酸 (PEP) カルボキシラーゼのように、多数のエフェクターにより複雑な調節を受ける酵素も知られている。後者の酵素の場合、多種類のエフェクターの酵素蛋白への結合部位が全て異なるのか、あるいは一部が共通であるのかという問題は、調節機構の分子的解明ならびに細胞内の酵素活性レベルを推測する上に極めて重要な問題である。それにもかかわらず、このような研究は、本酵素はいうまでもなく他の酵素についても、ほとんどなされていなかった。本酵素について各エフェクターの結合部位を決定するには、結合実験を行なうことが望ましい。しかしながら、この方法の適用が可能なのはアセチルコエンチーム A および L—アスパラギン酸のみであり、他のエフェクターに適用することは事実上困難である。したがって、申請者は上述の問題の解決に突然変異法を用いることにして、エフェクターに対する感受性が様々に変った酵素をもった変異株を多数単離した。PEP濃度を8 mMに固定して活性測

定を行ない、各エフェクターに対する変異酵素の感受性変化を検討した結果、個々のエフェクターに対する感受性は独立に変化すること、いいかえれば各エフェクターの結合部位は互いに異なること、を示唆する結果を得た。しかし、最終的に結論を下すためには、PEPに対する K_m 値の変化およびエフェクターとのヘテロトロピック効果の変化をも考慮する必要がある。申請者はこの点を理論的に考察し、基質等価法という活性測定法の必要性を提案した。この方法ならびに従来用いた標準法の両方を用いて変異酵素の検討を行った結果、両者を用いて得られた実験結果がかなり異なる場合があることがわかった。これに反して、最初に用いたトレーサー法では基質濃度が許容範囲内にあるため、この方法を用いて得られた結果は基質等価法による結果とほとんど等しいことがわかった。したがって、トレーサー法を用いて得られた上記4つのエフェクターの結合部位の独立性に関する推論は正しいことが裏づけられた。これまで酵素を種々の方法で修飾もしくは変異させ、エフェクターに対する感受性の変化を取り扱った研究は数多いが、上述のような考慮が払われた研究は非常に少い。また、多種類のエフェクターをもつアロステリック酵素についてその結合部位の区別を取り扱った研究もほとんど見当たらない。このような意味において、本研究によって得られた結論は極めて興味深く、本論文の寄与するところは大きなものがある。また、参考論文3において、これらのエフェクターが単独または種々の組み合わせで本酵素に結合するに当たり、多くの場合、それぞれ異なるコンホメーションをとり、種々の程度の活性化または阻害をもたらすことも、本研究の結果と併せ考えてよく理解できる。したがって、特定条件下における生細胞内における酵素量や基質・エフェクターのレベルを測定して、その活性レベルを推測しようとする場合においても、申請者の行なった研究の価値は非常に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。