

氏 名	牛 尾 一 利 うし お かず とし
学位の種類	工 学 博 士
学位記番号	工 博 第 702 号
学位授与の日付	昭 和 56 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	工 学 研 究 科 工 業 化 学 専 攻
学位論文題目	STUDIES ON THE ROLE OF ADENOSYL LIGAND OF COENZYME B ₁₂ IN DIOL DEHYDRATASE (ジオール脱水酵素におけるB ₁₂ 補酵素のアデノシル配位子の役割り に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 福 井 三 郎 教 授 河 西 三 省 教 授 田 伏 岩 夫

論 文 内 容 の 要 旨

ビタミン B₁₂ は、我々人間を含め広く動物、微生物が生命現象を営むための不可欠因子として自然界に存在する。その欠乏は、悪性貧血や神経系の変質退化などの深刻な疾患をもたらすが、その理由は未だ完全には解明されていない。天然の有機金属錯体である B₁₂ 補酵素は、生物学的に活性な B₁₂ の型の一つとして有名であるが、この分子量 1,600 余の複雑な分子は、生体内において約10種類の生化学反応の補酵素として働いており、その作用機構の秘密はコリン核の中心原子のコバルトと上方ヌクレオシド（天然界ではアデノシル基）をつなぐ自然界では希有のコバルト—炭素結合にあることが知られている。本補酵素の発見以来、今日まで、ほぼ20年間にわたってその生化学的役割や反応の機構について幾多の研究がなされてきたにもかかわらず、補酵素がアポ酵素との結合によりそのコバルト—炭素結合がいかにして活性化され酵素反応の経過で開裂と再結合とを繰り返すことが可能となるのかは、未解決のままである。本論文は、この B₁₂ 補酵素の構造と機能の関係を明らかにするため、コバルト—炭素結合の形成に直接与り補酵素作用の発現に重要な役割を演じていることが推定される上方ヌクレオシド配位子の構造アナログを用いて検討した研究成果をまとめたもので、緒論、及び本論3編からなっている。

緒論では、B₁₂ 研究の背景を述べ、本研究を行うに至った動機と目的とを述べている。

本論第1編及び第2編では、あらゆる B₁₂ 補酵素関与反応において最も重要な役割を演じるヌクレオシド配位子における21種の構造アナログについて、その理化学的並びに生化学的性質を、動力学的、また電子スペクトル等の手段を用いて調べ、補酵素—アポ酵素の結合及び引き続くコバルト—炭素結合活性化におけるこの上方配位子の構造と機能との関係について以下の知見を得ている。すなわち、酵素に対する結合性や補酵素としての有効性等から、これら種々のアナログを、特徴的な次の4つの型に分類している。

①活性型：リボースの基本的構造（リボースとその 2' 位エピマー体、カーボサイクリック型）を有し、アデニン環構造（アデニン、プリン、N⁶-メチルアデニン）を有するもの。この場合、リボース部位に修飾を受けたアナログは正常の補酵素に比し反応に伴って失活し易くなっているが、アデニン部アナログ

ではそのような失活頻度の増加はない。②不活性弱阻害型：リボース部は不変であるが、アデニンが他の塩基に置換されたもの（ヒポキサンチン、ベンツイミダゾール、シトシン、 ϵ -シトシン、 N^1 -メチルアデニン、 N^6 -エチルアデニン、 ϵ -アデニン等）。これらのアナログはいずれもアポ酵素に対する結合が可逆で、アポ酵素とアナログの複合体を解離させてアポ酵素を再活性化することは容易である。またそのコバルト-炭素結合がアポ酵素の作用を受けて開裂する現象は全く検出出来ない。③不活性強力阻害型Ⅰ：完全なアデニン環と相当に変化したリボース部（各種アルキル鎖やリボシルエチル等）を有するもの。この種のアナログは補酵素活性を示さないが、非常に強力にアポ酵素に結合したままとなり、それらを解離させることは事実上不可能である。④不活性強力阻害型Ⅱ：アデニン部、リボース部とも有さず比較的小さな上方配位子（ $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_3$ 等）を有するもの。これらのアナログも酵素を強力に阻害し、不可逆的な結合を示す。以上のように上方配位子中、アデニン環部分への要求はかなり厳格なもので、この部位によってアポ酵素との強い結合がもたらされ得ることが明らかにされた。さらに上記のリボース部位の改変によってもたらされた成績から、リボース部はアデニン環を適切な方向へ保持し、またアデニン部位でのアポ酵素との相互作用によってもたらされるであろう張力を損うことなくコバルト-炭素結合へ伝達出来ればコバルト-炭素結合の活性化が起こり得ることが強く示唆されている。

第3編は、 B_{12} 補酵素依存のジオール脱水酵素、グリセロール脱水酵素が、基質のグリセロールにより不活性化される現象において、不活性化された酵素の生体内での再活性化の機構を取り扱ったものである。一般に B_{12} 酵素はその反応の性質上、反応の過程で一定の確率で、補酵素のコバルト-炭素結合が不可逆的に開裂してゆくことが多いが、特にグリセロール脱水酵素が *in vitro* でその生理的正常基質であるグリセロールそのものにより、急速な自殺的失活を被ることが注目されている。この種の不活性化に生体がいかに対処しているかは重要かつ興味ある問題であるが、*in vitro* の温和な条件下での再活性化の試みはことごとく失敗に終わって来た。本編は最近 ATP と2価カチオンで生理的条件下の再活性化が可能であることが判明した *in situ* の系において、補酵素 B_{12} の構造アナログを用い、この *in situ* の再活性化の機構が、不活性化された B_{12} と、完全型補酵素との構造選択的交換によっていることを明らかにしたものである。この分子識別において重要な役割を果たすのは上方配位子中のアデニン部位であり、生体中では先に述べた④型と①あるいは③型との間にアポ酵素との結合において決定的な一線が画されていることが示された。

論文審査の結果の要旨

B_{12} 補酵素（アデノシルコバラミン）は、約10種類の生化学反応の補酵素として働く重要な生理活性物質であるとともに、天然物質として類例のないコバルト-炭素結合を持つ有機コバルト化合物として、その構造と補酵素作用の関係について深い関心を集めている。本酵素の作用としては現在のところ、アポ酵素と結合することにより活性化されたコバルト-炭素結合が基質の接近により開裂し、上方配位子から生じた5'-デオキシアデノシル-ラジカルが基質の水素を引き抜く作用点となり、水素を失った基質分子内で基転位や炭素骨格の組換が起こり、このようにして生じた中間生成物に水素化された補酵素から水素が戻されることにより異性化、脱離のような反応が完結し、補酵素のコバルト-炭素結合は再生成し、次

の反応を再び触媒するものと考えられている。しかしながら、本補酵素がアポ酵素と結合することによって可能となるコバルト-炭素結合の活性化と酵素反応中に繰り返し起こるコバルト-炭素結合の開裂と再生成の機構については未解決のままである。

本論文は B_{12} 補酵素が代表的な同補酵素依存酵素であるジオール脱水酵素にたいし、上述のような補酵素活性を現わすための構造上の特性を、その最も重要な上方ヌクレオシド配位子に着目して詳細に研究したものであり、以下のような成果を得ている。

(1) B_{12} 補酵素のヌクレオシド配位子を変化させた21種の構造アナログを用いて、補酵素とアポ酵素の結合及びコバルト-炭素結合の活性化にはじまる酵素作用の発現を理化学的並びに生化学的に研究した結果、同補酵素の上方アデノシル配位子の構造中アデニン環はアポ酵素との適確な結合に必要であり、リボース部はアデニン環を適切な方向に保持し、アデニン部位でのアポ酵素との相互作用によってもたらされ则认为られる張力をコバルト-炭素結合へ伝える機能を果していることを支持する成績を得た。

(2) B_{12} 補酵素依存のジオール脱水酵素、グリセロール脱水酵素は、試験管内 (in vitro) で基質のグリセロールにより短時間内で不可逆的に失活せしめられる。この現象は補酵素のコバルト-炭素結合が酵素反応の進行中に開裂と再生成を繰り返すうちに起こる不可逆的開裂の確率がグリセロールを基質とする場合に特に大きいと考えられる。生体内では不活化された酵素を修復し再生する現象が起こっていることが認められたが、この再活性化の機構がコバルト-炭素結合の不可逆的開裂により不活性化された状態でアポ酵素に結合している B_{12} 体が完全な補酵素により交換されて起こることを証明し、この交換における分子識別において重要な役割を演じるのが上方配位子のアデニン部位であることを各種の構造アナログを用いた実験結果から結論した。

以上を要約すれば、本論文は複雑な構造を持ち生化学反応に重要な役割を演じる B_{12} 補酵素がアポ酵素と結合し触媒活性を発現するための構造と機能の関係を、その最も重要な上方配位子の構造の面から詳細に研究して、いくつかの有益な知見を得たものであり、学問上ならびに實際上寄与するところが少なくない。

よって、本論文を工学博士の学位論文として価値あるものと認める。