

Title	Kinetic Basis for Artificially Designing Enzymes
Author(s)	四方, 哲也
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3085214">https://doi.org/10.11501/3085214</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	四	方	哲	也
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	9726	号	
学位授与の日付	平成3年3月26日			
学位授与の要件	工学研究科 醗酵工学専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	Kinetic Basis for Artificially Designing Enzymes (人工酵素設計のための反応速度論的基礎)			
論文審査委員	(主査) 教授 山田 靖宙	教授 大嶋 泰治	教授 高野 光男	
	教授 菅 健一	教授 吉田 敏臣	教授 今中 忠行	
	教授 二井 将光			

### 論文内容の要旨

本論文は人工活性基と天然酵素と補酵素を結合することによって、天然酵素の特徴を生かした人工酵素を作成し、その反応速度論的解析を行い、人工酵素に於けるいくつかの反応増幅効果を定量的に解明し、それらを定式化して人工酵素設計の基礎を提案したもので、序論と総括を除いて、4章から構成されている。

序論では、従来の補酵素と脱水素酵素あるいは、人工活性基と補酵素の結合により作成された人工酵素の特性を概説し、新たな人工酵素の作成とその速度論的解析の必要性を述べている。また、本論文を構成する主な内容を述べている。

第1章では、グルタミン酸脱水素酵素と合成したエチルフェナジン誘導体(E<sub>P</sub>)を連結した人工酵素を合成し、グルタミン酸脱水素酵素がNADH結合部位として、E<sub>P</sub>が人工活性基として働くことによって、この人工酵素がNADH酸化酵素として機能することを示している。又、基質結合部位近傍に人工活性基が存在することの活性に対する効果を定量的に示している。

第2章では、E<sub>P</sub>とグルコース脱水素酵素とNADを連結した人工酵素の合成について述べ、この系がグルコース酸化酵素として機能していることを指摘している。さらに、人工活性基と天然酵素部位の反応が一つの分子上で共役していることによる速度増幅効果を明らかにしている。

第3章では、E<sub>P</sub>と乳酸脱水素酵素とNADを連結した人工酵素の合成について述べ、この系が乳酸酸化酵素として機能することを指摘している。その活性には、人工活性基と天然活性基の分子内共役反応の中間体であるNADの状態が重要であることを明らかにし、本論文で開発した方法で、異なった性質の脱水素酵素でも酸化酵素に機能変換できることを示している。

第4章では、上記の人工酵素の解析により示されたいくつかの反応増幅効果について定式化することにより、その一般的性質について解析している。その結果、一つの活性基を持つ人工酵素をつくるには、結合部位中の基質と人工活性基との分子内反応を増幅するために、適当な長さの柔軟性のある連結体を使用することと基質に高い親和性のある結合部位を使用することが望ましく、複数の異なった活性基を持つ人工酵素を作るには、それぞれの活性基の反応を分子内共役させ、その中間体を結合部位より多く人工酵素に固定することが必要であることを指摘している。

総括では、本論文で得た主な結論を総括的にまとめている。

### 論文審査の結果の要旨

酵素を分析、合成、医薬品へ応用する研究開発は盛んに行われつつあり、それらの成果は酵素工学分野の興味的である。酵素反応の応用面を拡大していくための一つ的手段として人工的に酵素の機能を改変し、より経済的、能率的な人工酵素の創製が考えられる。

本論文はこのような背景のもとに天然酵素に人工活性基を、あるいは人工活性基と補酵素とともに連結し、新たな機能をもつ人工酵素に改変して、その反応速度論的基礎を定量的に考察したものであり、人工酵素設計の一般論を提案している。その主要な点は次の通りである。

- 1) グルタミン酸脱水素酵素と合成エチルフェナジン誘導体 (EP) を連結した人工酵素を合成し、この分子上ではグルタミン酸脱水素酵素がNADH結合部位として、EPが人工活性基として働くNADH酸化酵素として機能するという新知見を得ている。
- 2) 上記の人工酵素において基質結合部位近傍に人工活性基が存在することの活性に対する効果を定量化する方法を考案している。
- 3) EPとグルコース脱水素酵素とNADを連結した人工酵素を合成し、この系がグルコース酸化酵素として機能することを見いだしている。
- 4) 上記の人工酵素分子上で人工活性基と天然酵素部位の反応が共役して反応速度増幅効果が生まれることを示した。
- 5) EPと乳酸脱水素酵素とNADを連結した人工酵素を合成し、この系が乳酸酸化酵素として機能していることを示している。
- 6) 上記の人工酵素の活性には人工活性基と天然活性基の分子内共役反応の中間体であるNADの状態が重要であることを明らかにしている。
- 7) 上記の人工酵素の解析で示された反応増幅効果について定式化を行い、一般的性質を解析し、人工酵素設計に於て基礎となる方法論を提案している。

以上のように、本論文は、新しい機能の人工酵素を合成し、その反応速度論的基礎を詳細に解析した結果、その設計に役立つ多くの新知見を得ており、酵素工学上貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。