The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The Domain Movement of an Enzyme Molecule Induced by Substrate Binding
Author(s)	石嶋, 潤
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169135
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	石嶋　潤（いしじま　じゅん）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　15174　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	The Domain Movement of an Enzyme Molecule Induced by Substrate Binding （基質結合に伴う酵素分子のドメインの動き）
論文審査委員	（主査） 教　授　倉光　成紀 （副査） 教　授　福山　恵一　　教　授　谷澤　克行

論文内容の要旨

アスパラギン酸アミノ基転移酵素（AspAT）は、基質結合に伴って、立体構造変化を伴った基質認識（誘導適合）が起こることが示されている。この酵素の一連の疎水性基質［Cn基質：$(CH_3(CH_2)_{n-3}C_{(\alpha)}H(NH_3^+)COO^-$、n＝3～7］に対する活性（$\Delta G_f^{\ddagger}$：遷移状態（$ES^{\ddagger}$）と、結合前の基質と酵素（E＋S）との自由エネルギー差）は、C4を境に基質の炭素数によって、2つのグループに分かれる。C4以上の長さの基質に対する$\Delta G_f^{\ddagger}$の直線的な増加は、基質結合ポケットが非常に均一な空間によって構成されていることを示している。C4を境に$\Delta G_f^{\ddagger}$の直接関係が正から負に変わっていることから、この前後で基質結合ポケットの環境が親水性から疎水性に変わっていることが示唆された。

この基質結合ポケットの環境変化を調べる目的で、活性測定に用いた一連の疎水性基質アミノ酸に対して補酵素PLPを共有結合させたPLPアミノ酸（Cn－PLP、n＝3～6）を合成し、アポ化したAspATをホロ化させて、それらの立体構造をX線結晶構造解析により決定した。その結果、C4からC5へのCH_2 1個の付加によって、酵素のドメイン構造がopen型からclosed型へと大きく変化することが分かった。このことから、速度論的解析によって示された基質結合ポケットの環境の変化は、誘導適合によって起こることが示唆された。

Arg292は、酸性基質の側鎖カルボキシル基を基質結合ポケット内部に入り込んで認識し、塩橋によって基質の位置を固定する残基である。しかし、意外なことに疎水性基質を認識する場合にも、この正電荷を持ったアルギニン残基は基質結合ポケット内部へ入り込むことが分かった。また、これらのドメイン構造の変化は、Ile17、Leu18及びIle37と基質との相互作用によって引き起こされることが示された。このときIle37は、open型では、側鎖が基質から10Å以上離れているのに対し、closed型では、3.6Åまで接近した。

つぎに、誘導適合によって主鎖の構造を大きく変えるIle37の働きについて調べるために、Ile37を他のアミノ酸に置換した変異型酵素を作製し、X線結晶解析及び速度論的解析を行った。その結果、Ile37を体積の小さな疎水性アミノ酸に置換すればするほど反応性が低下し、特にIle37Glyの変異型酵素では誘導適合を起こさないことが分かった。これらの結果から、誘導適合に37番目の残基が重要であることが示唆された。

以上の結果と、速度論的解析の結果を基にして、熱力学的サイクルを考え、ドメインの動きに要するエネルギーを約2kcal／molと推定した。この値は、原子間力顕微鏡で観測された、他のタンパク質の結果とほぼ一致した。更に、同じアミノ基転移酵素でありながら基質特異性の異なる芳香族アミノ酸アミノ基転移酵素について、同様の結果が得

られたことからも今回の解析結果は支持された。

論文審査の結果の要旨

多くの酵素はドメイン間に挟み込むようにして基質を結合することが知られている。アミノ基転移酵素と一連の直鎖脂肪族アミノ酸基質との複合体のX線結晶構造解析を行い、酵素活性の結果と比較することによって、基質結合時に酵素のドメインが動くエネルギーを算出することが可能となった。よって、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。