The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Substrate Recognition and Catalytic Mechanism of Phenylalanine Deyhydrogenase
Author(s)	片岡, 邦重
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3081509
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 32 】

氏　　名	片　岡　邦　重（かた　おか　くに　しげ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　11613　号
学位授与年月日	平成6年12月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Substrate Recognition and Catalytic Mechanism of Phenylalanine Deyhydrogenase （フェニルアラニン脱水素酵素の基質認識と触媒反応機構）
論文審査委員	（主査） 教授　福井　俊郎 （副査） 教授　倉光　成紀　　教授　崎山　文夫　　助教授　谷澤　克行

論文内容の要旨

フェニルアラニン脱水素酵素は，フェニルアラニン等の芳香族アミノ酸と対応するケト酸の間の可逆的な脱アミノ反応を触媒するNAD^+酵素である。本酵素は，芳香族アミノ酸の酵素的合成など応用的にも重要であると同時に，他のアミノ酸脱水素酵素との比較による基質認識機構の解明にも好適な研究対象である。本研究では，好熱性放線菌 *Thermoactinomyces intermedius* 由来のフェニルアラニン脱水素酵素の機能変換を最終的な目標として，化学修飾法と部位特異的変異導入法を組み合わせて触媒残基の同定を行うとともに，本酵素と基質特異性が異なるが一次構造上の相同性の高い *Bacillus stearothermophilus* 由来のロイシン脱水素酵素とのキメラ酵素の作製などにより基質認識機構を解析した。

フェニルアラニン脱水素酵素をメチルアセチルリン酸（MAP）により修飾すると，MAPの濃度および反応時間に依存して酵素活性が消失した。失活に関与するリジン残基を同定するため，保存性の高い5個のリジン残基（Lys-69, 81, 89, 90, 173）を部位特異的にアラニンに置換した変異型酵素を作製し，MAPによる修飾を試みた。5種類の変異型酵素は野生型酵素と同様に容易に失活したが，Lys-69とLys-81両方を同時にアラニンに置換した変異型酵素は失活に対して抵抗性を示した。従って，本酵素はこれら2つのリジン残基の一方または両方が修飾を受けて失活すると考えられた。変異型酵素の反応速度定数の解析の結果，Lys-81は一般酸塩基触媒基として作用し，Lys-69は基質結合に関与することが明らかになった。

フェニルアラニン脱水素酵素の基質認識機構を明らかにするため，本酵素の基質結合ドメインと，ロイシン脱水素酵素のNAD^+結合ドメインを持つキメラ酵素を作製した。キメラ酵素の活性はフェニルアラニン脱水素酵素の6％にまで低下したが，各ドメインは安定な3次構造をとると推定された。キメラ酵素は脂肪族基質に対してフェニルアラニン脱水素酵素より高い活性を示し，もとの両酵素の中間の基質特異性を示したことから，基質特異性の決定には基質結合ドメインだけではなく，NAD^+結合ドメインとの相互作用も重要であることが示唆された。

続いて，フェニルアラニン脱水素酵素の基質結合ドメイン中の連続した6残基（^{124}F-V-H-A-A-^{129}R）をロイシン脱水素酵素の相当部分に置換した変異型酵素を作製し，その性質を検討した。変異型酵素の脂肪族基質に対する触媒活性（$k$cat／Km）は，野生型酵素の0.5～2％の値を示したが，本来の基質であるフェニルアラニンおよびフェニルピル

酸に対する値はそれぞれ0.008％および0.035％と極端に低下した。従って，上記の6残基を含む領域は，フェニルアラニン型基質の認識に重要な役割を担うものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

片岡邦重君の論文は，フェニルアラニン脱水素酵素の基質認識と触媒反応の機構を明らかにすることを目的として，化学修飾と部位特異的変異導入の組み合わせによる触媒基の探索，ロイシン脱水素酵素とのドメイン交換によるキメラ酵素の作製，特定アミノ酸残基の置換による変異型酵素の作製などについての成果を記述したものであり，博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認められる。