



Title	アスパラギン酸アミノ基転移酵素の活性域構造に関する研究：とくに β -ハロゲンケト酸による親和標識について
Author(s)	アブダラ, モハメット オスマン
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31577
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【1】

氏名・(本籍) アブダラ・モハメット・オスマン
学位の種類 医学博士
学位記番号 第 3871 号
学位授与の日付 昭和52年3月25日
学位授与の要件 医学研究科 生理系
学位規則第5条第1項該当
学位論文題目 アスパラギン酸アミノ基転移酵素の活性域構造に関する研究
とくに β -ハロゲンケト酸による親和標識について
論文審査委員 (主査) 教授 山野 俊雄
(副査) 教授 坂本 幸哉 教授 和田 博

論文内容の要旨

(目的)

アスパラギン酸アミノ基転移酵素[L-Aspartate : 2-oxoglutarate Aminotransferase(EC. 2.6.1.1.)...GOTと略す]は、生物界に広く分布し、生理的に重要な役割を果している。酵素の活性中心の化学構造を研究するにあたって、もっとも直接的、かつ有効な方法の一つは、親和標識法であるが、本酵素にも、本法が適用され、活性中心の構造の一部が明らかにされた。すなわち、GOTは β -クロル-L-アラニンの α , β 離脱を触媒しつつ、その過程で、本来補酵素ピリドキサルリん酸を結合するリジン残基 ϵ -アミノ基が標識されることが判明し、本リジン残基が、補酵素を結合するのみならず、基質 α -水素をひきぬく触媒塩基であることが森野らによって提案された。

本研究では、上記 β -クロル-L-アラニンに対応する β -ハロゲン-ピルビン酸が、本酵素ピリドキサミン型と反応し、アミノ基転移- β -離脱反応の過程で、上述リジン残基以外のアミノ酸側鎖を親和標識する可能性を検討することを目的とした。

(方法ならびに成績)

可溶性分画局在のGOTをブタ心筋より精製して用いた。従来より、本酵素は、適当なアミノ酸基質の存在下に、ブロムピルビン酸(BP)によって不活性化することが知られており、その不活性化の機構として下記2つの説が提唱された。

すなわち、(a)[BP+L-システインスルフイノ酸]の系では、親和標識のために、不活性化がおこる。(b)[BP+L-グルタミン酸]の系ではsyncatalyticな化学修飾がCys-390(活性域には存在しない残基)であるが、その修飾により、酵素のコンホメーションが変化する結果、活性が低下することが知られ

ている)に起るために不可逆化がもたらされるという2つの相反する機構である。このくいちがいを明確にするため、実験を行い下記の成績を得た。

1. BPによる不活性化は、L-システインスルフィン酸、L-グルタミン酸、L-アラニン+3Mギ酸などのアミノ酸基質共存下にのみ起った。
2. クロルピルビン酸(CP)による不活性化は、L-アラニン+3Mギ酸存在下にのみ起り、L-システインスルフィン酸、L-グルタミン酸共存下には起らなかった。
3. 上記の各系で、Cys-390が修飾されるか否かを知るため次の方法を用いた。すなわち、本酵素の一次構造は既に知られているので、¹⁴C-ヨード酢酸で、すべてのCys残基(Cys-45, Cys-82, Cys-191, Cys-252, Cys-390)をカルボキシメチル化したあと、BrCN処理により得られるペチド断片(理論的に7個のペプチド断片が得られる)を、6M尿素+5%ギ酸の系でセファデックスG-75上で分画すると、放射活性を示す3つの画分が認められる。画分Iは、Cys-45, Cys-82, Cys-191の3つのCys残基、画分IIは、Cys-252、画分IIIはCys-390を含むので各Cysを同定することができる。この分析法により、下記の結果を得た。
(a)[BP+L-グルタミン酸]の系では、Cys-390の修飾が起る。
(b)[BP+L-システインスルフィン酸]および[BP+L-アラニン+ギ酸]の系では、Cys-390の修飾は起らない。
(c)[CP+L-アラニン+ギ酸]の系では、Cys-390の修飾は起らない。
(d) 上記の結果をさらに2-¹⁴C-BP, 2-¹⁴C-CPを用いて確認し、その結果(a)の系ではCys-390を含む画分IIIに、(b),(c)のいずれの系でも画分IIに放射活性が認められ、Cys-390を含む画分IIIには、まったく放射活性を認めなかった。しかも画分IIに含まれる放射活性は、アルカリに不安定であることから、GluあるいはAspのカルボキシル側鎖のアルキル化が推定された。

(総括)

1. BPとL-グルタミン酸との間のアミノ基転移反応の過程で起るGOTの不活性化は、Cys-390の修飾に起因する。したがって、この場合は、親和標識でなく、反応中の酵素のコンホーメーションの変化にともなって露出するCys-390の化学修飾の結果である。
 2. BPとL-システインスルフィン酸あるいは、ギ酸存在下でのL-アラニンとの間の反応で起るGOTの不活性化は、1.で述べたCys-390の修飾によるものではなく、活性域内のアミノ酸残基の修飾による親和標識の結果である。
 3. [CP+L-グルタミン酸]の系では不活性化は起らない。
- このようにアルキル化試薬としてBPより反応性の低いCPでは、ギ酸存在下のL-アラニンとの反応の過程でのみ不活性化が起るが、これは、Cys-390の修飾のためではなく親和標識の結果である。

論文の審査結果の要旨

アスパラギン酸アミノ基転移酵素[L-Aspartate : 2-Oxoglutarate Aminotransferase(EC 2, 6, 1, 1.)以下GOTと略す]は生物界に広く分布し生理的に重要な役割を果している。GOTの活性域の構造、とくに酵素の作用しつつある状態の構造を知ることは反応機作を解析する上で重要な意味をもつ、著者は β -ハロゲンピルビン酸を本酵素に作用させ酵素反応の回転過程の化学修飾に同時修飾と親和修飾とが存在することを明らかにした。また試薬作用後の酵素をBrcNで処理し7個のペプチド断片に分ってその各画分におけるハロゲンピルビン酸同位元素の所在をしらべ親和標識のアミノ酸残基を追求した。実験結果によれば比較的アルキレート作用の弱いクロールピルビン酸ではアミノ基転移反応においては不活性化は見られず、ギ酸存在下ではクロールピルビン酸の β 離脱反応がおこりそれに伴って親和標識が観察された。これに対し比較的アルキレート作用の強いブロームピルビン酸では、アミノ基転移反応においてCys-390のsyncatalyticな同時修飾が見られ、ギ酸存在下では、Cys-390の関与しない親和標識が観察された。これらの結果は活性域の構造とその機能の動的な状態についてのきわめて有用なインフォーメーションを提供したものとして価値が大きいと判断される。