

Title	アスパラギン酸アミノ基転移酵素アイザイムの化学修飾による活性中心の検索
Author(s)	棚瀬, 純男
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/31585">https://hdl.handle.net/11094/31585</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名・(本籍)	棚 瀬 純 男
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 3884 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アイザイムの化学修飾による活性中心の検索
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 ピリドキサルリン酸を補酵素とするいわゆるピリドキサル酵素群は、種々の基質特異性と反応様式を有することが知られている。このようなピリドキサル酵素群の触媒機構を明らかにする為に、化学修飾による酵素活性中心の検索を行なった。

アスパラギン酸アミノ基転移酵素(GOT)にはミトコンドリア局在のm-GOTと細胞質局在S-GOTの2種のアイソザイムが存在する。これらは同一反応を触媒するにもかかわらず、動力学的定数、抗原性等の物理化学的性質を異にしている。2種のアイソザイムに対し、 $\gamma$ 位に三重結合を持つアミノ酸誘導体、L-プロパルギルグリシン(L-PG),による親和標識と、光酸化による化学修飾を行い、酵素活性発現にかかわるアミノ酸残基の同定を試みた。

方法 ブタ心筋より、S-GOT, m-GOTを精製し実験に用いた。L-プロパルギルグリシン(L-PG)はGershonとJansenの方法で合成した。 $\beta$ -クロロ-L-アラニン( $\beta$ -CA)はFisherの方法により合成した。光照射は光源として150Wのタングステンランプを装着したプロジェクターを用いた。レンズから5cmの距離に反応液を置き、マグネチックスターラーによる攪拌下で行なった。酵素濃度10~15mg/ml, メチレンブルー 0.0005%, 50mMピロリン酸カリウム緩衝液pH 7.5を含む反応液は、照射中10℃に保持した。

結果 (A), L-PGによるGOTの不活性化。①, L-PGのみとGOTを反応させると、ピリドキサル型酵素からピリドキサミン型酵素への転換が起こるが、不活性化反応は起こらない。②, L-PGとPyruvate等のケト酸基質を共存させると不活性化が進行する。さらに高濃度のギ酸イオンを共存させると著しく不活性化速度は増大する。③, 不活性化の至適pHは8.0付近にあり、正常なアミノ基転

移反応におけるそれとよく一致する。又、不活性化反応はping-pong BiBi反応過程で起っている。以上のことから、不活性化反応はL-PGとケト酸基質間でのアミノ酸転移反応過程で起っていると考えられる。④、不活性化されたGOT標品の吸収、円二色性スペクトルから、補酵素ピリドキサルリン酸の存在状態が著しく変化していることが結論される。⑤、不活性化したGOTには、放射活性を有するL-PGが酵素モノマーあたり約一分子が結合している。⑥、不活性化標品をTPCK-トリプシンで分解後、放射活性で標識されたペプタイドの分離精製を行い、2種のペプタイドが修飾されていることがわかった。一方は本来ピリドキサルリン酸を結合しているLys残基258番が修飾されていた。もう一方は、アルカリ条件で分解しやすい結合をしているため精製は困難であった。⑦、不活性化の際に共存させるギ酸イオン濃度により修飾される2種のペプタイドの量比が変化した。

(B)、光酸化によるHis残基の化学修飾。

L-PGあるいは $\beta$ -CAによるGOTの不活性化反応や、アラニンを基質としたアミノ基転移反応が、ギ酸イオンの共存により促進されるが、これは酵素の基質結合部位に存在するHis残基とギ酸イオンの相互作用によるものと考えられる。以上のことを明らかにするため、光酸化を試みた。

①、光酸化と共に、アスパラギン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸間のアミノ基転移反応は低下するがアラニンのアミノ基転移反応や $\beta$ -CAの $\alpha, \beta$ 離脱反応はむしろ増大する。しかし、ギ酸イオンによる促進効果は光酸化と共に減少する。②、10%残存活性を有する光酸化されたs-GOTモノマーあたり2個のHis残基の減少を観察した。m-GOTでは5His残基が減少していた。③、光酸化標品となまs-GOTをBrCNで切断し、得られたペプタイド分画を比較し精製した結果、His317番とHis405番が光酸化されていることが示された。

総括 L-PGによってs,m-GOT両アイソザイム共に不活性化される。不活性化は、L-PGとケト酸基質間でのアミノ基転移反応の過程で進行し、結果として酵素活性中心が親和標識される。修飾されるアミノ酸残基の一つはLys258番であり、これは正常な酵素反応過程では基質アミノ酸の $\alpha$ 位水素の離脱を触媒していると考えられる。修飾されるもう一つのアミノ酸残基は未同定であるが、 $\beta$ 位水素の引き抜きに関与していると推定される。

ギ酸イオンのアラニンのアミノ基転移反応と $\beta$ -CAの $\alpha, \beta$ 離脱反応における促進効果は、ギ酸イオンがジカルボン酸構造を持つ正常な基質の $w$ 位のCOOH部位と同様の効果により、Lys258番の求核性を高める結果であると、提唱したい。光酸化によるHis残基の破壊により、ギ酸イオンによる促進効果が消失する事実は、酵素反応におけるHis残基の役割が $\alpha$ 位水素の引き抜きでないことを示し、上記の仮説を支持する。

## 論文の審査結果の要旨

本論文は、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(GOT)アイソザイムの活性中心の検索を化学修飾を手段として行なったものである。

$\gamma$ 位に三重結合をもつアミノ酸, L-propargyl-L-glycineが本酵素に対する親和標識試薬となることを明らかにし, またHistidine残基の修飾を目標に光酸化反応を行い反応過程で関与するアミノ酸残基の同定を行った。

本研究の結果, 本来補酵素ピリドキサルリン酸を結合しているLysine残基がアミノ酸基質の $\alpha$ 位水素の離脱反応を触媒しており, 特定のHistidine残基が本酵素の基質特異性を支配する一要因となっていることが明らかにされた。

本研究は, 酵素触媒機作と活性中心構造との関係を理解する上で有用な資料となり, 学位論文として価値があると認められる。