

Title	コブラ毒ホスホリパーゼA2の活性部位の構造
Author(s)	手島, 圭三
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33261
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【9】

氏名・(本籍)	て 手	しま 島	けい 圭	ぞう 三
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	5589	号	
学位授与の日付	昭和57年3月25日			
学位授与の要件	理学研究科 生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	コブラ毒ホスホリパーゼA ₂ の活性部位の構造			
論文審査委員	(主査) 教授	浜口 浩三		
	教授	京極 好正	教授	福井 俊郎

論 文 内 容 の 要 旨

ホスホリパーゼA₂[EC 3. 1. 1. 4]はジアシル-sn-ホスホグリセリドの2位の脂肪酸エステル結合を加水分解する酵素である。本酵素の触媒機構および基質認識機構は、基質の存在状態が複雑であるためによくわかっていない。そこで、まず、活性部位にあるAsp 49, His 48, α-アミノ基のイオン化状態を明らかにするために、3種類のコブラ(*N. naja siamensis*, *N. naja kaouthia*, *N. naja atra*) 毒酵素に対する、触媒作用に必須であるCa²⁺の結合定数のpH依存性およびHis48の選択的修飾試薬p-プロモフェナシルブロミドの反応のpH依存性を調べた。マムシ毒およびブタ酵素の結果と比較する事によって、Asp49を含むCa²⁺の結合部位の構造は3者で非常によく似ているが、それ以外の活性部位の構造は異なっている事が示唆された。

化学的に安定で単一ミセルを形成するn-アルキルホスホリルコリン(リゾレシチンのアナグロ)を用いて酵素と単分散状およびミセル状基質との相互作用を調べた。活性部位のAsp49, His48およびα-アミノ基は単分散状基質の結合にほとんど関与しなかった。これは、Asp49およびα-アミノ基の関与を示すマムシ毒酵素の場合とかなり異なっている。単分散状基質の結合定数におよぼす基質のアルキル鎖長の効果から、コブラ毒およびブタ酵素への結合にはアルキル鎖の疎水性が重要であるが、マムシ毒酵素の場合は前二者ほど重要でない事がわかった。哺乳類の膵臓酵素のpro酵素は、プロテアーゼによりN末端7残基を切除されると、ミセル状基質に対して著しい活性の増大を示す。そして、ミセルとの結合にα-アミノ基のイオン化状態が非常に重要な役割をはたすようになるといわれている。そこで、一定数の脂質分子より構成される互いに独立な結合部位がミセル表面にあるとして、コブラ毒酵素とn-ヘキサデシルホスホリルコリンのミセルとの相互作用を調べた。コブラ毒酵素の場合、α-

アミノ基のイオン化はミセルとの結合に関与しなかった。しかし、CNBr 処理により N 末端 8 残基を除去すると、結合定数は著しく減少したので、コブラ毒酵素においても、N 末端周辺部分の構造は界面認識部位として重要であると考えられる。

論文の審査結果の要旨

手島君はホスホリパーゼA₂の活性部位の構造を明らかにするため、3種のコブラ (*N. naja siamensis*, *N. naja kaouthia*, *N. naja atra*) 毒のホスホリパーゼA₂について、活性発現に必須なカルシウムイオンの結合、基質アナググである *n*-alkyl-phosphorylcholine の単分散およびミセル状態での結合様式を詳細に調べた。まず、Ca²⁺の結合のpH依存性を調べ、活性部位にある Asp 49のpK 値を 5.4, His 48のpK 値を 7.55 と決定した。また、His 48の選択的修飾試薬 *p*-bromophenacyl bromide との反応の pH 依存性を調べ、ここに推定した His 48のpK 値を確定した。また N 末端側 8 残基を欠く酵素とこの試薬との反応性の比較から、 α -アミノ基のpK 値を 8.55 と決定した。次に、種々の鎖長の単分散状基質アナログの結合定数を決定し、コブラ毒酵素への結合にはホスホリルコリン部分よりもアルキル鎖の疎水性部分の重要であることを明らかにした。また、単分散状基質との結合には活性部位の Asp 49, His 48はほとんど関与しないこともわかった。第三に、ミセル状基質との相互作用を調べ、10~13個の脂質分子から成る結合部位あたり 1 分子の酵素が結合することを示した。また N 末端側 8 残基を除去した酵素との相互作用も調べて、N 末端周辺部分の構造がミセル界面認識部位として重要であることを明らかにした。

このように、手島君の研究はホスホリパーゼA₂の触媒機構を解明するための基礎となる活性部位の構造を詳細に調べたものであり、理学博士の学位論文として十分価値あると認める。