



Title	D-アミノ酸酸化酵素の四次構造に関する研究
Author(s)	東城, 博雅
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34977
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

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	とう	じょう	ひろ	まさ
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6950	号	
学位授与の日付	昭和	60	年	7月4日
学位授与の要件	学位規則	第5条第2項該当		
学位論文題目	D-アミノ酸酸化酵素の四次構造に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教 授	田川 邦夫		
	(副査) 教 授	中馬 一郎	教 授	坂本 幸哉

論文内容の要旨

(目的)

蛋白質間の相互作用は、生物機能あるいは形態形成を分子レベルで理解する上で本質的に重要なものの一つである。オリゴマー酵素の補酵素、基質、エフェクターの結合による四次構造変化は、その酵素の機能発現および制御に重要な意味を持ち、最近、解糖系酵素などでその重要性が再認識されている。本研究の目的は、ペルオキシソームに局在するD-アミノ酸酸化酵素の水溶液中での四次構造を明らかにすることおよび補酵素FADの結合による四次構造変化の機構を熱力学的および速度論的に詳細に解析することにある。

(方法ならびに成績)

D-アミノ酸酸化酵素は、豚腎臓から精製した。

1. 単量体分子量の決定——6M塩酸グアニジン存在下に、単量体分子量を低角レーザー光散乱法($Mr = 39,600 \pm 1,700$)および沈降平衡法($Mr = 38,000 \pm 1,200$)により決定した。この際、透析平衡の条件下での屈折率濃度勾配(0.126 $m\ell/g$)とみかけの比容(0.723 $m\ell/g$)を実測し、これらの値を用いた。6M塩酸グアニジン溶液中での塩酸グアニジンと本酵素の相互作用パラメータは、0.11 g/g of proteinであった。
2. D-アミノ酸酸化酵素の四次構造——本酵素アポおよびホロ酵素溶液(0.1Mピロリン酸ナトリウム, pH8.3, 25°C)の低角レーザー光散乱測定から得たみかけの重量平均分子量の酵素濃度依存性に関するデータを、溶液の非理想性を考慮した種々の解離会合系モデルに関して、本研究で新たに開発した非線形最小二乗法プログラムを用いて定量的に解析した。その際に、1.で決定した単量体分子量を用い

た。アボ酵素の場合、単量体 (P_1) が i 量体 (P_i) ($i = 1, 2, \dots$) とランダムに会合するモデル ($2P_1 \xrightleftharpoons{K} P_2, P_1 + P_2 \xrightleftharpoons{K} P_3, \dots, P_{i-1} + P_i \xrightleftharpoons{K} P_i, \dots, K$ は結合定数 $K = 1.84 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) でデータをよく説明し得た。一方、ホロ酵素の場合には、2量体が会合のユニットとなってランダムに会合するモデル ($2P_1 \xrightleftharpoons{K_2} P_2, 2P_2 \xrightleftharpoons{K'} P_4, \dots, P_{2(i-1)} + P_{2i} \xrightleftharpoons{K'} P_{2i}, \dots, K_2 = 2.42 \times 10^5 \text{ M}^{-1}, K' = 1.30 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) が、データと best-fit した。これらの最適モデルの妥当性をさらに確かめるために、沈降速度法から得られる沈降界面と、上記のそれぞれのモデルを用いて Gilbert の方法で算出した沈降界面の形状を比較した。その結果、アボ酵素およびホロ酵素どちらの場合でも、最適モデルによって、沈降界面の形の特徴を説明できることが明らかとなった。広い酵素濃度範囲にわたって、ゲル濾過法から決まるみかけのストークス半径の酵素濃度依存性を調べた結果も、定性的に上記の会合モデルの妥当性を支持する。これらの結果から、これまで未解決であった会合機構に関するゲル濾過法と熱力学的測定法の間の矛盾点を解明することができた。

以上のように、アボ酵素とホロ酵素で会合機構が異なることがわかったが、さらにこの会合機構の変化に関して詳しく検討するために、FADとアボ酵素溶液混合後の散乱強度の変化を速度論的に解析した。その結果、この会合状態の変化の律速過程は、FADの結合により誘起される酵素タンパクのコンホーメーション変化の段階であることがわかった。

また、FADの結合にともなうサブユニット間界面での安定化のエネルギーは、2量体化の過程では、 -2.2 kcal/mol 、2量体より高次の会合体に2量体が結合する過程では、 -0.5 kcal/mol であった。このような比較的小さなエネルギー変化は、FADの結合にともなう酵素タンパクのわずかな構造変化によって十分説明しうる。また、このコンホーメーション変化がホロ酵素の会合様式を決める最も重要な因子であることがわかった。

(総括)

1. 本酵素の単量体分子量を熱力学的方法を用いて精密に決定した。
2. サブユニットの会合様式を決定するために、複雑な解離会合系にも一般的に適用できる解析方法を確立した。
3. 本酵素サブユニットの会合機構を低角レーザー光散乱法、ゲル濾過法、沈降速度法を用いて詳細に検討し、ホロ酵素とアボ酵素の会合様式を決定した。そして両酵素で会合機構が異なることを明らかにした。
4. 本酵素の会合機構に関して従来より未解決であった、ゲル濾過法と光散乱法の結果の間の矛盾を解決した。
5. FADのアボ酵素への結合による会合状態の変化を速度論的に解析し、この反応の律速過程は、FADの結合により誘起される酵素のコンホーメーション変化であることを明らかにした。
6. FADのアボ酵素への結合にともなう、サブユニット間相互作用エネルギーを決定した。
7. 本研究により、酵素濃度に依存する本酵素の多くの性質を統一的に理解することができるようになった。また、本研究は、in vivo での本酵素の高次構造に関する研究の基礎データを与える。

論文の審査結果の要旨

本研究は、D-アミノ酸酸化酵素の自己会合系の会合様式を定量的に決定し、また補酵素のアポ酵素への結合により誘起される会合過程を速度論的およびエネルギー論的に詳細に解析したものである。本酵素の作用機作およびその反応制御機構を解明する上で、基本的に重要な本酵素の物性を明らかにしたこと、および、自己会合系の会合様式の定量的解析に一般的に適用できる方法を開発した点で、本研究は、医学博士論文として十分価値あるものと認める。