

Title	ピリドキサルリン酸依存性ヒスチジン脱炭酸酵素の親和標識
Author(s)	林, 秀行
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/35240
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	はやし 林	ひで 秀	ゆき 行
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	7 2 2 2	号
学位授与の日付	昭和 61 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	ピリドキサルリン酸依存性ヒスチジン脱炭酸酵素の親和標識		
論文審査委員	(主査) 教授 和田 博 (副査) 教授 坂本 幸哉 教授 田川 邦夫		

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

酵素自殺基質は一種の親和標識試薬であり、それ自体は不活性であるが、酵素の触媒作用によって活性化され、その酵素を修飾して失活させるものである。このため、その高い選択性を利用して酵素の生理機能の解明に用いられるほか、酵素の反応機構や活性部位の構造の研究にも役立っている。

本研究ではヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の作用機作の解明を目的として、哺乳類及び比較的多量に得られる細菌のHDCの α -フルオロメチルヒスチジン (FMH) による失活反応を解析し、あわせて両酵素の性質の比較検討を行った。

(方法及び成績)

1. HDCはウイスター系ラット胎児肝臓及び *Morganella morganii* AM-15より精製した。最終比活性は各々 1 IU/mg及び70 IU/mgであった。
2. 種々の濃度のFMHの存在下失活は擬一次反応的に進行した。FMHのHDCに対する解離定数 K_i 及び失活の速度定数 k_{inact} は、ラットHDCでは 0.01 mM, 0.25 min⁻¹, *Morganella* HDCでは 0.1 mM, 32.2 min⁻¹であった。
3. 失活反応は両酵素とも至適pH領域 (pH 6.5 ~ 7.0) において最もよく進行し、またアポ酵素は両者ともにFMHによって失活を受けなかった。
4. 両酵素を [³H]-FMHによって失活させると、放射活性が酵素蛋白質にとりこまれ、HDCがFMHによって修飾されることが示された。修飾酵素を熱または尿素で変性させると標識が遊離されるが、これは修飾酵素をあらかじめNaBH₄で還元することによって安定化された。

5. *Morganella*の酵素について分光学的変化を追跡すると、失活に伴ってHDCのピリドキサルリン酸に由来する416 nmの吸収は大幅に減少し、かわって333 nmに新しい吸収が出現した。またHDCを $[^3\text{H}]$ -FMHで滴定した結果、1分子のFMHが1分子のピリドキサルリン酸とともに1分子のHDCのサブユニットに結合することが示された。

6. 修飾酵素の熱変性によって遊離する物質はB₆誘導体に特有の吸収スペクトルを示したが、ピリドキサルリン酸、ピリドキサミンリン酸のスペクトルとは一致せず、Schnackerz複合体と呼ばれているもののスペクトルに極めて類似していた。

7. $[^3\text{H}]$ -FMHによって修飾したHDCをNaBH₄で還元して標識を安定化したのち、還元カルボキシメチル化、トリプシン分解、セファデックスG-50ゲル透過、逆相系HPLCを行い、標識ペプチドを単離した。未修飾酵素からの対応するペプチドと共に一次構造解析を行った結果、ペプチドのN末端から2番目のセリン残基が修飾を受けていることが明らかとなった。

(総括)

1. 速度論的解析により、ラット及び*Morganella*のHDCはFMHにより自殺的不活性化を受けることが示された。*Morganella*のHDCがラットのHDCよりも速かに不活性化されるのは両者の比活性の差に起因すると思われる。

2. 修飾酵素の蛋白質化学的解析により、特定の1つのセリン残基がFMHによって特異的に修飾を受けていることを明らかとした。また、失活反応の機構として、FMHがHDCによって活性化されてSchnackerz複合体様の化合物となり、これに対して上記のセリン残基がMichael付加を行うという経路が考えられる。

3. 以上よりFMHによるHDCの失活は、Schnackerz複合体を通して失活が起こるアスパラギン酸アミノ基転移酵素と β -置換アラニンの反応に一部類似しているが、リシンではなくてセリンが修飾されるという点で新しい型の自殺基質反応であることが明らかとなった。またラットと*Morganella*のHDCはFMHによる失活に際して同じような挙動を示しており、他の酵素学的性質と合わせ、これら二種のHDCが非常に似かよったものであることが示された。

論文の審査結果の要旨

α -フルオロメチルヒスチジンはヒスチジン脱炭酸酵素の特異的阻害剤として広く用いられているが、その阻害機構については不明の点が多い。本研究ではまずラットの酵素について α -フルオロメチルヒスチジンが化学的に活性化されたあと活性部位を標識する、いわゆる自殺基質であることを示し、更にその過程で見出だされた標識の不安定性を追求することにより従来のものとは異なる親和標識機構を提出した。つづいて蛋白質化学的に十分量得られる*Morganella*の酵素についてその機構の妥当性を検証し、あわせて量子化学的方法による理論的裏付けを行なった。

以上の研究はヒスチジン脱炭酸酵素の反応機構や活性部位の構造に関して重要な知見を与えるもので

あり、同時に一般のピリドキサル酵素の自殺基質反応についての新しい型の反応機構を示したものとして学位論文に値するものと思われる。