

Title	トリプトファン合成酵素 α -サブユニットの49番目のアミノ酸位置で置換した13種の変異型の作製とそのタンパク質の機能と構造に関する研究
Author(s)	辻田, 忠弘
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35760
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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)	つじ	た	た	ひろ
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7892	号	
学位授与の日付	昭和62年10月13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	トリプトファン合成酵素 α -サブユニットの49番目のアミノ酸位置で置換した13種の変異型の作製とそのタンパク質の機能と構造に関する研究			
論文審査委員	(主査)	教授 松代 愛三		
	(副査)	教授 松原 謙一	教授 吉川 寛	

論文内容の要旨

[目的]

天然に存在する酵素タンパク質の酵素機能上重要な位置にある1つのアミノ酸残基を、任意に他のアミノ酸に置換し、その点突然変異タンパク質を作製し、これらの変異タンパク質の酵活性を野性型タンパク質のそれと比較することによって、酵素タンパク質の構造と機能との関係を明らかにする。

[方法ならびに成績]

実験には、遺伝子構造の研究および物理化学的研究が進んでいる大腸菌のトリプトファン合成酵素 α -サブユニットを使用した。

トリプトファン合成酵素は、L-トリプトファンを合成する生合成経路の最終段階を触媒する酵素であり、 $\alpha_2\beta_2$ の四量体から成る。 α -サブユニットは、268残基のアミノ酸から構成される1本鎖ポリペプチドであり、その分子量は29,000である。 α -サブユニットの49番目のアミノ酸(Glu)は、分光学的方法によって、分子内部に埋められていると推定されており、酵素活性上重要な位置にあると思われる。

この遺伝子では、既に紫外線処理法やアンバー変異株に抑制遺伝子を導入する方法で、49番目のアミノ酸(Glu)を置換した6種類の点突然変異が得られている。本実験では残り13種類の点突然変異(49番目のGluのAla, Arg, Asn, Asp, Gys, Gly, His, Ile, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, に置換)を合成オリゴヌクレオチドを用いるsite-directed mutagenesisの方法によって作製した。

大腸菌トリプトファン合成酵素 $\alpha_2\beta_2$ の酵素機能は、インドール-3グリセロリン酸からトリプトファンを合成する反応(反応I)と、インドールからトリプトファンを合成する反応(反応II)を触媒する。

反応Ⅱでは β_2 -サブユニットのみでも触媒反応を行うが、 $\alpha_2\beta_2$ では触媒反応を数十倍高めることが知られている。

本実験で作製した、13種類の α -サブユニット49位アミノ酸の点突然変異タンパク質の酵素活性は、既に報告されている6種類の結果と同様に、反応Ⅰに対して総ての変異に対して活性が認められず、反応Ⅱに対しては十分な活性が認められた。

[総括]

本実験によって、13種類の大腸菌トリプトファン合成酵素 α -サブユニットの49位アミノ酸点突然変異を作製することが出来た。

既に報告されている6種類を加えると、生体タンパク質に存在する20種類のアミノ酸を49番目に持つ総ての α -サブユニットが得られたことになる。これらの変異型 α -サブユニットは、トリプトファン合成酵素の今後の物理化学的研究に貢献できると考える。また、このことは、アミノ酸残基配列あるいはDNA塩基配列の解明されたタンパク質では、総てのアミノ酸残基に対する点突然変異の作製が可能であることを示すものである。

大腸菌トリプトファン合成酵素 $\alpha_2\beta_2$ 、及び α -サブユニット、 β_2 -サブユニットの構造と機能との関係については、次のことが分かった。

総ての変異において、反応Ⅰに寄与する α -サブユニットの機能が認められなかったことは、49番目のアミノ酸(Glu)がトリプトファン合成酵素 α -サブユニットに対して必須であることを示すとともに、活性中心部の構造の厳密性を示すものである。すなわち、49番目の野性型アミノ酸であるグルタミン酸($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}_-$)が、それに最も近い同じカルボキシル基を側鎖に持つアスパラギン酸($-\text{CH}_2\text{COO}_-$)に置換したものであっても、反応Ⅰに対する α -サブユニットの機能が全く無くなるということは、活性中心のただ1つのアミノ酸の置換が酵素活性を低下させるのではなく、all or nothingに活性を完全に失ってしまうことを示している。すなわち、カルボキシル基の負の電荷が活性中心付近に存在するだけでは不十分であり、その絶対的厳密な位置が重要であることを示している。

反応Ⅱに寄与する α -サブユニットの機能が、総ての突然変異タンパク質で同程度にポジティブに認められたことは、ここでの α -サブユニットの機能が β_2 -サブユニットと四量体を作ることによって、 β_2 -サブユニット本来の酵素活性を高めることにあり、 β_2 -サブユニットとの結合部位が49番目のアミノ酸から外れていることを示すものと推察される。

論文の審査結果の要旨

本研究では、まずトリプトファン合成酵素 α -サブユニットの特定のアミノ酸を他の任意のアミノ酸に置換した変異タンパク質を作製した。次にその酵素活性の測定により、 α -サブユニットにとって49番目のアミノ酸がグルタミン酸であることが酵素活性上必須であり、カルボキシル基の負の電荷が活性中心付近に存在するだけでは不十分であり、その厳密な位置が重要であることを解明した。また総ての

49位アミノ酸残基置換が α -サブユニットに対して機能的には大きな影響を与えるが、構造的には大きな影響を与えないことを確認している。

以上の業績はタンパク質の機能と構造に関する研究に、大きく寄与するものと考えられる。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。