Osaka University Knowledge Archive

Title	大腸菌アミノ基転移酵素の構造と触媒機構
Author(s)	井上, 桂
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38432
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【41】

氏　　名	井上　桂（いのうえ　かつら）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　10558　号
学位授与年月日	平成5年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**大腸菌アミノ基転移酵素の構造と触媒機構**
論文審査委員	（主査） 教　授　倉光　成紀 （副査） 教　授　福井　俊郎　　教　授　松原　　央 大阪医科大学教授　鏡山　博行

論文内容の要旨

大腸菌の3種類のアミノ基転移酵素を材料とし，蛋白質工学的手法を用いて，アミノ基転移酵素の触媒反応機構および基質認識機構を解析した。

1．アスパラギン酸アミノ基転移酵素

アスパラギン酸アミノ基転移酵素（AspAT）のTyr 70, Tyr 225, Arg 292, および，Arg 386は，活性部位に存在する補酵素（ピリドキサル5'-リン酸）の近傍に位置することがX線結晶構造解析から明らかになっている。触媒反応過程において重要な役割を果たしていると考えられるこれらのアミノ酸残基を部位特異的変異法で他のアミノ酸残基に置換した。

(1)　Tyr 70変異型酵素

AspAT のTyr 70をフェニルアラニン，および，セリン残基に置換すると，活性はそれぞれ13%および3.4%に低下した。Tyr 70の側鎖の水酸基は，触媒反応過程に於ける遷移状態を約2 kcal・mol^{-1} 安定化することが示唆された。さらにTyr 70の側鎖の水酸基は，補酵素の結合に寄与していた。またTyr 70の側鎖の芳香環は，炭素五つからなる基質（グルタミン酸，および，2－オキソグルタル酸）の認識に寄与していることが示唆された。

(2)　Tyr 225変異型酵素

AspAT のTyr 225をフェニルアラニン，および，アルギニン残基に置換すると，活性はいずれも1%以下に低下した。Tyr 225の側鎖の水酸基は，補酵素の3'位の酸素原子と相互作用することにより，触媒反応過程における補酵素の電子状態を調節していることが示唆された。

(3)　Arg 292変異型酵素およびArg 386変異型酵素

Arg 292をリシン残基に置換したAspAT，および，Arg 386をリシン残基に置換したAspATの活性は，野性型酵素と比較していずれも1%以下に低下した。Arg 292およびArg 386の側鎖のグアニジノ基は，基質の遠位およびα－カルボキシル基と水素結合することにより，触媒反応過程における遷移状態を5～6 kcal・mol^{-1}ずつ安定化することが示唆された。基質のカルボキシル基の認識にはアルギニン残基が必須で，同じ正電荷を持つシリン残基では代用できないことが明らかになった。

2．芳香族アミノ酸アミノ基転移酵素

芳香酸アミノ酸アミノ基転移酵素（AroAT）の一次構造はAspATと43%の相同性を有しており，活性部位のアミ

ノ酸残基は，両酵素でほとんど保存されていた。AroAT は分光学的特性においても AspAT とよく似ていた。AroAT は，芳香族アミノ酸に対して高い基質特異性を示すとともに，酸性アミノ酸基質に対しても AspAT と同程度の特異性を有していた。すなわち，AroAT は，芳香族アミノ酸および酸性アミノ酸という側鎖の性質が全く異なる基質を認識できることが明らかになった。

3．分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素

AspAT および AroAT が 2 量体酵素であるのに対し，分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素（BCAT）は，分子量34000のサブユニット六つからなる 6 量体酵素であった。BCAT は，イソロイシン，ロイシン，バリンの分岐鎖アミノ酸に対して高い基質特異性を有するとともに，メチオニンや芳香族アミノ酸に対して低いながらも活性を示した。BCAT は，構造的特性，分光学的特性，および，基質特異性において，AspAT および AroAT とは全く異なることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

井上桂君は，大腸菌の 3 種類のアミノ基転移酵素について反応特異性を比較するとともに，その中の一つ，アスパラギン酸アミノ基転移酵素については，活性部位に存在するアミノ酸残基を遺伝子操作法を利用して置換し，Tyr 70, Tyr 225, Arg 292, Arg 386がアミノ基転移酵素の機能発現に重要な役割を果していることを明らかにした。よって本論文は，博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。