Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Calorimetric study on the roles of amino acid residues in protein stability and protein－protein interaction : The effects of amino acid replacements on the stability of the tryptophan synthase α subunit and its α/β subunit interaction. |
| Author(s) | 平賀, 香 |
| Citation | 大阪大学, 1996, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/39941 |
| 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

【22】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 平賀　香（ひらが　かおり） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（理　学） |
| 学位記番号 | 第　12330　号 |
| 学位授与年月日 | 平成8年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>理学研究科生物化学専攻 |
| 学位論文名 | Calorimetric study on the roles of amino acid residues in protein stability and protein－protein interaction:The effects of amino acid replacements on the stability of the tryptophan synthase α subunit and its α／β subunit interaction.<br>**（蛋白質立体構造の安定性及び分子間相互作用に果たすアミノ酸残基の役割）** |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教　授　高木　俊夫<br><br>（副査）<br>教　授　長谷　俊治　　教　授　倉光　成紀　　助教授　油谷　克英 |

## 論文内容の要旨

蛋白質の機能発現には特定の立体構造が不可欠であるが，その立体構造は蛋白質を構成するアミノ酸残基の配列順序によって決定されている。アミノ酸残基の一次配列に含まれている蛋白質の立体構造形成及び機能発現の情報を解読すること，すなわち蛋白質立体構造の構築原理の解明は，現在のライフサイエンスにおける主要な研究課題の一つである。本研究では，蛋白質の立体構造の構築原理を明らかにするために，大腸菌トリプトファン合成酵素の系統的な一残基置換型αサブユニットについて，αサブユニットの安定性，α／βサブユニット間相互作用，及び酵素機能に果たすアミノ酸残基の役割について，主にカロリメトリーを用いて研究した。

トリプトファン合成酵素の立体構造安定性及び酵素機能に果たす，システイン残基の役割

大腸菌トリプトファン合成酵素αサブユニットには3つのシステイン残基が含まれ，これらは疎水的な分子内部に存在している。これらの残基をそれぞれSer，Ala，ValまたはGlyに一残基置換した変異型の安定性を示差走査型熱量型DASM 4によって測定した。その結果全ての変異型の熱安定性は野性型より低下しており，これらのシステイン残基がαサブユニットの安定性に大きく寄与していることが明らかになった。また，多くの変異型で非常に大きな変性エンタルピーの減少が観察された。αサブユニットのネイティブ構造に対するリガンド結合の熱力学的パラメータの解析結果は，変異型の変性エンタルピーの減少は，変異による変性状態の構造変化に起因していることを示唆した。

次に，一連のシステイン変異型について，酵素活性への影響を調べた。トリプトファン合成酵素はαとβサブユニット各2分子からなり，それぞれのサブユニットは独自の酵素反応を触媒する（α反応とβ反応）が，$\alpha_2\beta_2$複合体形成によって各サブユニットが互いの触媒活性をそれぞれ2桁以上増幅させるという活性増幅機構を持っている。活性測定の結果，81位システインはαサブユニットの活性部位やβサブユニットとの接触面といった活性に直接に関わっている部位から離れているにも関わらず，αサブユニットの固有活性と複合体の相互活性化に間接的に重要な影響を与える残基であることが判った。

トリプトファン合成酵素のα／β間相互作用と，複合体形成による相互活性化の機構

トリプトファン合成酵素複合体におけるサブユニット間の相互活性化は，αとβサブユニットの結合に伴う両サブユニットの構造変化に由来していることが推測されている。本研究では，複合体形成の際に実際どのくらいの構造変化が起こるのかを明らかにするために，大腸菌とサルモネラ菌由来の野性型トリプトファン合成酵素及びその変異型

を用いて，αとβサブユニットを様々に組み合わせた複合体形成について，等温滴定型熱量型 OMEGA を用いて，結合の熱力学的パラメータを求めた。熱力学的パラメータの解析から，複合体形成に伴ってαサブユニットとβサブユニットのどちらかあるいは両方が大きく折れ畳み，その構造変化はサブユニット界面だけに留まらないことが示唆された。この大きな構造変化による再構築がトリプトファン合成酵素の複合体においてサブユニット間の相互活性化を導いていると考えられる。

トリプトファン合成酵素のα／βサブユニット間相互作用は，α／β結合面の残基の置換によって大きな影響を受けることが判っている。そこで次に，サブユニット間の水素結合残基に注目し，これらの残基がサブユニット間相互作用に果たす役割を，一連の水素結合切断変異型を用いて調べた。サブユニット間水素結合を作っているαサブユニットの6残基について，9種の Ala または Asp 変異型を構築し，β反応における活性増幅能測定，及び OMEGA によるβサブユニットとの結合の熱測定により熱力学的パラメータを求めた。その結果，一連の水素結合残基の全てが重要な役割を担っているのではなく，部位によって影響が異なっていることが判った。特に活性増幅能に著しい低下が見られた N104D，N104A 変異型αサブユニットでは，βサブユニットとの結合定数及び負の結合エンタルピーが野性型より著しく低下していた。E134A 変異型では，結合定数は低下した結合エンタルピーと活性増幅能は影響を受けなかった。これらの結果は，104位の変異型βサブユニットとの相互作用によってインタクトな複合体を形成することができないことを示し，一方 E134A は結合親和力は低下しているが相互作用によって野性型と同様の正常な構造変化を受けることを示している。本研究によって，104位の Asn 残基がα／β間相互作用に伴う正常な構造変化とトリプトファン合成酵素複合体の相互活性化機構に，特別に必要な水素結合残基であることが判った。

## 論文審査の結果の要旨

本論文において，大腸菌トリプトファン合成酵素αサブユニットの系統的な一残基置換型を作製し，αサブユニットの安定性，α／βサブユニット間相互作用に果たすアミノ酸残基の役割について，主にカロリメトリーを用いて研究した結果が述べられている。分子内部のシステイン残基の安定性に果たす役割及びサブユニット界面での水素結合の分子間相互作用に果たす役割が熱力学的に解明された。これらの結果は，蛋白質立体構造の構築原理を解明する上で，重要な知見である。よって，博士（理学）の学位論文として充分価値あるものと認める。