

Title	The Substrate Recognition Mechanism by the Dual-Substrate Enzyme
Author(s)	河口, 真一
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40819
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	かわぐち しんいち 河 口 真 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 3 6 4 9 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	The Substrate Recognition Mechanism by the Dual-Substrate Enzyme (「1酵素-2基質」酵素の基質認識機構)
論文審査委員	(主査) 教授 倉光 成紀 (副査) 教授 谷澤 克行 教授 京極 好正

論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌由来の2つのアミノ基転移酵素、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AspAT)と芳香族アミノ酸アミノ基転移酵素(AroAT) は共に、酸性基質 (アスパラギン酸やグルタミン酸) に対して高い活性を示す。一方、フェニアラニンのような疎水性基質に対しては、AroATの方がAspATよりも約10,000倍も高い活性を示す。酸性と疎水性という全く性質の異なる2つの基質をもつ、という点で、「1酵素-2基質」酵素であるといえる。アルギニン残基によって酸性基質側鎖を認識する機構は、両酵素とも同一である。一方、基質結合部位近傍のアミノ酸残基はほとんど全て保存されており、AspATとAroATとの疎水性基質特異性の違いを説明することはできていない。

疎水性基質の認識機構を明らかにするため、3つの酵素 (AspAT、AroAT、及び、それらのキメラ酵素) の基質特異性を解析した。基質の疎水性度を定量的に扱うことを目的として、疎水性度が異なる一連の脂肪族アミノ酸とケト酸を基質として用いた。これらの基質に対する酵素活性は、基質の疎水性度が増加するにつれて、ほぼ一定の割合で上昇した。また、3つの酵素は形状の異なる基質に対しても、疎水性度が同じであれば、同等の活性を示した。これらの結果から、「酵素は疎水性基質の形状に関係なく、基質結合部位内の広い範囲でほぼ一様に基質を認識する」ことが示唆された。さらに、興味深いことに、3つの酵素はほぼ同等な基質結合部位を持つにも関わらず、活性に対する単位疎水性度あたりの寄与はそれぞれ異なっていた。この結果は、「基質結合部位の疎水性度が疎水性基質特異性を決定する」という従来の考え方とは明らかに異なっている。この現象を説明する機構として、酵素分子の立体構造の「柔らかさ」(ダイナミクス) が異なることが考えられた。そこで、酵素の柔らかさを比較する実験を行い、その結果から、酵素の立体構造が柔らかいほど、疎水性基質の認識が強いことが明らかになった。従って、「疎水性基質の認識には基質結合部位の疎水性度だけでなく、酵素の柔らかさも必要である」ことが示唆された。

次に、酵素反応の熱力学的解析を行い、先の基質認識機構に関する仮説をさらに検討した。AroATにおいて、疎水性基質シリーズの活性を種々の温度で測定し、反応動力学定数の温度依存性からアミノ基転移反応の熱力学的パラメータを得た。疎水性基質と酵素との結合反応は、全体で見るとエントロピー駆動であるが、基質の単位疎水性度の結合は、エンタルピー駆動であり、エントロピーからの寄与は小さいことが明らかになった。このことは、「基質の疎水性部分は、単に水層から有機相 (蛋白質内部) へと移行されるだけでなく、蛋白質の基質結合部位と強く相互作用する」ことを示唆した。

さらに、AspAT、および、AroATの疎水性基質複合体をモデリングし、300-400ピコ秒間の分子動力学計算を行っ

た。系のエネルギーが安定した後、100ピコ秒の計算結果を基に、両酵素の差異を解析した。AspATでは、292番目のアルギニン残基が、基質結合部位内に侵入していたが、AroATでは、このアルギニン残基は基質結合部位の外側に位置し、基質のための空間を保持していた。従って、この残基の位置の差異が両酵素の基質特異性の違いに対する1つの原因であることが示唆された。また、基質に対する接触の「程度」は両酵素ではほぼ同じであったが、主鎖構造はAroATの方でゆらぎが大きく、分子全体が「柔らかい」構造であることが示唆された。このことが、基質との接触に必要な構造変化のエネルギーを小さくしていると考えられる。従って、「柔らかさ」の違いも、両酵素の疎水性基質特異性の違いを説明する1つの要因であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

酵素は基質特異性が高く「1酵素-1基質」とこれまで考えられてきたが、1つの酵素が2種類の異なる基質と反応する「1酵素-2基質」酵素の存在が、近年明らかにされた。その1つであるアミノ基転移酵素は、触媒基は共通で、酸性基質・疎水性基質の基質結合部位は近くに存在する。この酵素の反応過程を解析した結果、酸性基質結合部位は蛋白質分子の揺らぎが小さい部分に存在するのに対し、疎水性基質結合部位は揺らぎの大きい部分に存在することが示唆された。さらに、その揺らぎによって「疎水性基質に対する異常な特異性の低さ」が説明できることも示した。本研究を通して得られた知見は、酵素の新たな分子設計原理を明らかにした点で非常に重要であり、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。