



| | |
|--------------|--|
| Title | The Substrate Recognition Mechanism of Thermophilic Aminotransferases |
| Author(s) | 宇良, 秀明 |
| Citation | 大阪大学, 2001, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/42530 |
| 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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|---------------|---|
| 氏 名 | 宇 良 秀 明 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (理 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 5 9 7 7 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 13 年 3 月 23 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻 |
| 学 位 論 文 名 | The Substrate Recognition Mechanism of Thermophilic Aminotransferases (耐熱性アミノ基転移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 福山 恵一 |

論 文 内 容 の 要 旨

はじめに

酵素は、基質結合によってその全体構造が変化したり、活性部位の構造が変化したりする性質を持つ。酵素の全体構造の変化はドメインの動きによって代表され、その役割や動きの大きさなどについての研究が行われてきているが、基質結合によるドメインの動きと、酵素の耐熱性との関係についての研究はなされていない。

また、活性部位の残基の動きには、酵素の揺らぎが重要な役割を果たしている。その揺らぎを巧みに利用して、基質結合部位の性質を変化させ、性質の異なる二種類の基質を結合できるような酵素（「1酵素－2基質」酵素）がアミノ基転移酵素である。しかし、その機能発現機構に対する詳細な解析はなされていない。

これらの二点を明らかにするために、アミノ基転移酵素を用いて以下の研究を行った。

1. 基質結合によるドメインの動きと耐熱性との関係

アミノ基転移酵素は、酸性基質であるグルタミン酸を共通のアミノ基供与体として、アミノ基転移反応を触媒する酵素である。これまでに、約37°Cで生育する大腸菌由来のアミノ基転移酵素 (EcAT) と80°C近くまで生育可能な高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来のアミノ基転移酵素 (TtAT) とについて、酸性基質存在下および非存在下の立体構造が報告されている。そこで、酸性基質の結合によるドメインの動きと酵素の耐熱性との関係を知るために、100°C近くまで生育可能な超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来のアミノ基転移酵素 (PhAT) の、酸性基質類似物質存在下での立体構造をX線結晶構造解析により決定したところ、PhATでは基質結合によるドメインの動きが非常に小さいことがわかった。PhAT、TtATおよびEcATのドメインの動きを比較すると、酵素の耐熱性が高いほど基質結合によるドメインの動きが小さい、という傾向が見い出された。さらに、他の酵素における実験結果を「基質結合によるドメインの動きと耐熱性との関係」という観点で再解析したところ、「酵素の耐熱性が高いほど基質結合によるドメインの動きが小さい」という傾向は、酵素に一般的な性質であることが示唆された。

2. 「1酵素－2基質」酵素の基質認識機構

EcATとPhATの両者が酸性・疎水性両方の基質に対して高い活性を示す「1酵素－2基質」酵素であるのに対し、TtATは酸性基質に対してのみ高い活性を示す「1酵素－1基質」酵素である。EcATは「1酵素－2基質」酵素の機能発現に必要な残基としてArg292⁺をもつ。この残基は酸性基質認識残基であるが、TtATおよびPhATでは保存されていない (Ser15、Thr17、Lys109およびTyr70⁺)。TtATが「1酵素－2基質」酵素でないことは、そ

の酸性基質認識残基が他の酵素と異なることが主な原因であると考え、15、17、109および292位に段階的に変異を導入した TtAT の変異型酵素群を作製し、それらの速度論的解析・X線結晶構造解析を行った。その結果、S15D、T17V、K109S および S292R の変異を導入することによって、TtAT が「1 酵素－2 基質」酵素に変換されることが明らかになった。X線結晶構造解析により、この [S15D、T17V、K109S、S292R] 変異型酵素では、酸性基質と疎水性基質は同じ結合部位に全く異なる様式で認識されていることがわかった。また段階的に変異を導入することによって、酸性基質と疎水性基質に対する活性が独立に変化することが明らかになった。以上のことからアミノ基転移酵素において、酸性基質と疎水性基質とは独立した機構で認識されていることが示され、アミノ基転移酵素が「1 酵素－2 基質」酵素であることが支持された。また、これまでの他の酵素に関する実験結果を再解析したところ、「1 酵素－2 基質」酵素は、アミノ基転移酵素だけでなく、酵素一般に存在するということが明らかになった。これらの結果から、酵素の荷電性基質認識残基が触媒基から離れた部位に存在すれば、「1 酵素－2 基質」酵素の機能を発現し得るということが示された。

論文審査の結果の要旨

アミノ基転位酵素と基質との反応過程を解析するとともに、立体構造を解析し、好熱菌の蛋白質の耐熱性が高いほど基質結合時のドメインの動きが少ないという一般則を見い出した。さらに、これまで酵素の基質特異性は「1 酵素－1 基質」で、非常に高いと考えられてきたが、「1 酵素－2 基質」の酵素が広く存在することを明らかにするとともに、その機能発現機構を明らかにした。よって、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。