

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
イスラム・モハマド・マイヌル Islam, Mohammad Mainul	主査 教授 鏡 山 博 行 副査 教授 宮 崎 瑞 夫 副査 教授 清 水 章 副査 教授 玉 井 浩 副査 教授 窪 田 隆 裕
主論文題名 Reaction of Aspartate Aminotransferase with C5-Dicarboxylic Acids: Comparison with the Reaction with C4-Dicarboxylic Acids (アスパラギン酸アミノ基転移酵素と C5-ジカルボン酸の反応: C4-ジカルボン酸の反応との比較)	
学位論文内容の要旨	
<p>           &lt;&lt;研究目的&gt;&gt;            アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) においてアスパラギン酸(炭素数 4 個; C4)が触媒を受けてオキサロ酢酸になる過程は詳細な検討がなされ、その全貌がほぼ明らかになりつつある。しかしながらも一つの重要な基質であるグルタミン酸(炭素数 5 個; C5)が触媒を受けて <math>\alpha</math>-ケトグルタル酸になる過程についてはグルタミン酸をはじめとする C5 化合物と AST の親和性が低いため解析が難しく、ほとんど研究されて来なかった。しかし最近の測定技術および解析技術の進歩により、微弱なスペクトル変化を精密に測定し、複雑な反応を解析する条件が整ったので、この古くからの問題に取り組むことにした。         </p> <p>           &lt;&lt;方法&gt;&gt;            遺伝子操作系・大量発現系の確立した大腸菌 AST を用いた。同 AST を大腸菌体内で発現し 10 L の YT(酵母エキス-トリプトン)培養液から精製を行い、1 g の酵素蛋白質を得た。電子吸収スペクトルは二光軸分光光度計(日立 UV-3300)を用い、高速反応の追跡はストップフロー分光分析器(英国 Applied Photophysics SX.18MV)を改良し、強力な光を試料に加えかつ検出部を改善することで S/N 比を向上させたものを用いた。得られた時分割スペクトルは林・鏡山(1997)によって確立されたアミノ基転移酵素の遷移相速度論に基づいて解析した。         </p> <p>           &lt;&lt;結果&gt;&gt;            AST はピリドキサルリン酸を補酵素とし、補酵素と Lys258 残基がシッフ塩基を形成して触媒中心となっている。シッフ塩基のプロトン化状態によって                           EH<sup>+</sup> シッフ塩基がプロトン化している酵素                           E シッフ塩基がプロトン化していない酵素                       の 2 型が存在する。一方、基質アミノ酸についても中性付近では <math>\alpha</math>-アミノ基のプロトン化状態によって                           SH<sup>+</sup> アミノ基がプロトン化している基質                           S アミノ基がプロトン化していない基質                       の 2 型が存在する。AST とアスパラギン酸 (C4) が会おうと EH<sup>+</sup> は S と、また E は SH<sup>+</sup> とのみ反応         </p>	

する。ところが、種々の pH における AST とグルタミン酸 (C5) の反応はアスパラギン酸の場合とは異なった経時的スペクトル変化を示し、この場合は  $\text{EH}^+$  と  $\text{S}$ 、 $\text{E}$  と  $\text{SH}^+$  に加えてさらに  $\text{EH}^+$  と  $\text{SH}^+$  が反応していることが示された。また、反応が酵素-基質複合体形成で停止する基質アナログの 2-メチルグルタミン酸 (C5) と AST の反応による種々の pH におけるスペクトル変化を解析すると、酵素-基質複合体は  $\text{EH}^+ \cdot \text{S}$ 、 $\text{E} \cdot \text{SH}^+$ 、 $\text{EH}^+ \cdot \text{SH}^+$ 、および  $\text{E} \cdot \text{S}$  の 4 種類が存在し、 $\text{EH}^+ \cdot \text{S}$  と  $\text{E} \cdot \text{SH}^+$  の 2 種類しか存在しない 2-メチルアスパラギン酸 (C4) とは対照的であることが判明した。さらに、C5 リガンド結合によるシッフ塩基の  $\text{p}K_a$  の変化は +1.3 となり、C4 リガンド結合の +2.0 に比べて顕著に低い値となった。

#### 《考察および結論》

アスパラギン酸 (C4) で  $\text{EH}^+$  と  $\text{S}$ 、および  $\text{E}$  と  $\text{SH}^+$  の組み合わせでしか結合しないのは結合したアスパラギン酸の  $\alpha$ -アミノ基と AST のシッフ塩基が近接し、強い相互作用を持つために  $\text{EH}^+$  と  $\text{SH}^+$  は正荷電同士、また  $\text{E}$  と  $\text{S}$  は負荷電同士の反発が生じるためである。これに対してグルタミン酸 (C5) では  $\text{EH}^+$  と  $\text{SH}^+$ 、 $\text{E}$  と  $\text{S}$  の結合が可能となっている。これは結合したグルタミン酸の  $\alpha$ -アミノ基と AST のシッフ塩基の相互作用が極めて弱いことを示している。また、C4 リガンド結合によるシッフ塩基の  $\text{p}K_a$  の上昇の一部は結合に伴う AST 蛋白質のコンフォメーション変化によっており、C5 リガンド結合による  $\text{p}K_a$  の上昇の程度が低いことは AST 蛋白質のコンフォメーション変化が小さいことを示唆している。本酵素の X 線結晶構造を用いてグルタミン酸の結合様式のモデルを構築すると、AST とグルタミン酸の複合体ではグルタミン酸の  $\alpha$ -アミノ基がシッフ塩基と反対側に配向している結果が得られ、両者の間の相互作用が弱いという本分光学的解析結果についての構造論的根拠を与えた。また、このグルタミン酸の  $\alpha$ -アミノ基の配向がアスパラギン酸と異なるのは、グルタミン酸は開いた状態のままの AST に結合しているためであることが説明された。AST がアスパラギン酸とグルタミン酸という長さの異なる基質を両方とも認識する機構は長らく不明であったが、本研究により AST は炭素鎖長の異なる基質に対して酵素蛋白質の開いた構造と閉じた構造を対応させて認識を行っていることが明らかとなった。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第675号	氏名	イスラム・モハマド・マイヌル Islam, Mohammad Mainul
論文審査担当者		主査 教授 鏡 山 博 行 副査 教授 宮 崎 瑞 夫 副査 教授 清 水 章 副査 教授 玉 井 浩 副査 教授 窪 田 隆 裕	
主論文題名 Reaction of Aspartate Aminotransferase with C5-Dicarboxylic Acids: Comparison with the Reaction with C4-Dicarboxylic Acids  (アスパラギン酸アミノ基転移酵素と C5-ジカルボン酸の反応: C4-ジカルボン酸の反応との比較)			
論文審査結果の要旨			
<p>アスパラギン酸とグルタミン酸は同じ官能基を有しているために、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) 上の同一の残基によって認識されると期待される。ところが、アスパラギン酸を結合した AST の複合体の結晶構造はアスパラギン酸等の C4 基質の結合に最適化されており、C5 基質が如何に AST に取り込まれるかは長らく不明であった。この機構の解明が困難であった理由としては C5 基質の AST に対する親和性が低いことと、反応が複雑であったことが挙げられる。申請者は分光学的測定系を工夫することで精密な測定を行い、さらに遷移相速度論的解析を駆使することでこの問題の解決に挑んだ。その結果、今まで基本的にアスパラギン酸と同じであろうと想像されて来たグルタミン酸と AST の反応が、特に複合体形成の段階においてアスパラギン酸とは大きく異なっていることを明確に示している。</p> <p>さらに申請者は結晶構造に基づくモデル構築を行い、得られた分光学的解析結果を最もよく説明できる機構として AST がアスパラギン酸とグルタミン酸に対して異なるコンフォメーションで結合する機構を提唱している。</p> <p>本研究により、AST 反応の半分を占める C5 基質との反応に初めて光が当てられたのであり、酵素のコンフォメーション変化による複数基質認識という新しい基質認識機構を提出することができ、AST の分子構造と機能の解明に寄与するところ大である。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) The Journal of Biochemistry 134(2): 277-285, 2003</p>			