

|         |   |         |         |
|---------|---|---------|---------|
| 氏名      | 山西 守  |         |         |
| 授与した学位  | 博 士   |         |         |
| 専攻分野の名称 | 工 学   |         |         |
| 学位授与番号  | 博乙第 3 5 8 7 号   |         |         |
| 学位授与の日付 | 平成 1 3 年 3 月 2 5 日  |         |         |
| 学位授与の要件 | 博士の学位論文提出者<br>(学位規則第 4 条第 2 項該当)  |         |         |
| 学位論文の題目 | Spectroscopic Studies on the Mechanism of<br>Adenosylcobalamin-Dependent Diol Dehydratase Reaction<br>(アデノシルコバラミン関与ジオールデヒドラターゼの反応<br>機構の分光学的研究) |         |         |
| 論文審査委員  | 教授 虎谷哲夫   | 教授 山田秀徳 | 教授 中西一弘 |

#### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

アデノシルコバラミン(AdoCbl)(ビタミンB<sub>12</sub>補酵素)関与ジオールデヒドラターゼはラジカル機構で触媒する酵素である。本論文では、分光学的手法による詳細な反応機構の解明を目指した。

ジオールデヒドラターゼのラジカル中間体を電子常磁性共鳴(EPR)によって調べると、2価コバルト(Co)と有機ラジカルの中に、基質類による機構依存的な不活性化の速度と良く相関したスピン交換相互作用が見られた。従って、中間体ラジカルとCoの距離が遠くなるほど酵素は不活性化されやすいことを明らかにした。

また、機構依存的に速やかな酵素の不活性化を引き起こす下方配位子塩基部置換補酵素アナログを用いると、中間体有機ラジカルが認められた。従って、この不活性化は触媒回転中に補酵素の再生ができなくなることが原因であることを明らかにした。

<sup>15</sup>N 標識補酵素アナログを用いて不活性化させたジオールデヒドラターゼのEPRスペクトルを解析したところ、ヌクレオチド部の塩基がCoに配位した形で酵素に結合していることが明らかになった。従って、B<sub>12</sub>酵素にはコバラミンの結合様式が異なる少なくとも2種類のスーパーファミリーがあることを示した。

ジオールデヒドラターゼ反応のラジカル中間体の構造を決定するために、安定同位元素(<sup>2</sup>H、<sup>13</sup>C)で置換した基質を数種類合成した。これらを基質としてEPRスペクトルを比較することにより、EPRで観察されるラジカルは基質の1位ラジカル中間体であることを明らかにした。

ジオールデヒドラターゼに結合したAdoCblのCo-C結合の開裂速度を、基質存在下および非存在下でstopped-flow法などにより求めた。これよりCo-C結合は酵素タンパクによる活性化に加え、基質の添加によっても活性化されることを示した。また、標識基質を用い速度論的同位体効果を求めることで、Co-C結合の開裂と基質からの水素引き抜きが速度論的に共役していることを示した。

以上のように、ジオールデヒドラターゼの精密反応機構を分子レベルで考える上で重要な知見が得られた。

## 論文審査結果の要旨

アデノシルコバラミン(AdoCbl) (ビタミン B<sub>12</sub> 補酵素) 関与の酵素はラジカル機構で触媒する。ラジカル機構で進行する酵素反応の機構はまだ不明な点が多く、解明が遅れている。本研究は、代表的な B<sub>12</sub> 酵素の1つであるジオールデヒドラターゼを用いて、分光学的手法による精密反応機構の解明を目指したものであり、以下に要約される成果を得ている。

種々の基質を用いたときの酵素反応のラジカル中間体を電子常磁性共鳴(EPR)によって調べると、2価コバルト種 (Co(II)) と有機ラジカルとの間に基質類による機構依存的な不活性化の速度とよく相関したスピン交換相互作用が観察されたことから、有機ラジカル中間体と Co の距離が遠くなるほど酵素は不活性化され易いことが明らかになった。補酵素の塩基部置換アナログを用いたときも酵素は速やかな機構依存的な不活性化を受け、有機ラジカル中間体が消失したことから、この不活性化は触媒回転中に補酵素の再生ができなくなることが原因であると考えられた。また、<sup>15</sup>N 標識補酵素アナログを用いて不活性化させた酵素の EPR スペクトルを解析したところ、ヌクレオチド部の塩基が Co に配位した形で酵素に結合していることが明らかになり、B<sub>12</sub> 酵素には補酵素の結合様式が異なる少なくとも2つのスーパーファミリーがあることが示された。安定同位元素(<sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C)で置換した基質を数種合成し、これらを基質としたときの EPR スペクトルを比較することにより、ジオールデヒドラターゼ反応で観察されるラジカル中間体は基質の1位ラジカルであることを明らかにした。さらに、酵素に結合した AdoCbl の Co-C 結合開裂速度を基質存在下および非存在下で stopped-flow 法等により求めることにより、Co-C 結合が酵素タンパクによる活性化に加え、基質添加によってさらに活性化されることを示した。標識基質を用い速度論的同位体効果を測定することで、Co-C 結合の開裂と基質からの水素引き抜きが速度論的に共役していることも示された。

以上のように本研究では、ジオールデヒドラターゼの補酵素結合様式と精密反応機構に関して重要かつ独創的な新知見が得られている。よって、本論文は博士(工学)の学位に値するものと認める。