

氏名・(本籍)	にし の とく ぞう 西 野 徳 三
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 2 5 3 号
学位授与年月日	昭和 4 6 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専門課程	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)化学専攻修了
学位論文題目	Studies on Substrate Specificity of Farnesyl Pyrophosphate Synthetase (ファルネシルピロリン酸合成酵素の基質 特異性に関する研究)
論文審査委員	(主査) 瀬 戸 秀 一 教授 田 宮 信 雄 教授 北 原 喜 男

論 文 目 次

INTRODUCTION

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Materials

General Methods

Enzymic Reaction

Analysis of Products of Enzymic Reaction

RESULTS AND DISCUSSIONS

Chapter I Syntheses of Substrates

Chapter II Enzymic Condensation of 3-Methyl-2-alkenyl Pyrophosphates
with Isopentenyl Pyrophosphate

Chapter III Dependence of Reactivity of Substrate on Geometry

Chapter IV Difference between Pumpkin Enzyme and Fig Liver Enzyme

Chapter V	Structural Requirement of Substrate
Chapter VI	Formation of 16, 16'-Bisnorgeranyl-geranyl Pyrophosphate by Farnesyl Pyrophosphate Synthetase
Chapter VII	Heat Treatment with Unnatural Substrates and Product Inhibition of Dihydrofarnesyl Pyrophosphate
Chapter VIII	Existence of Two Reaction Sites in Farnesyl Pyrophosphate Synthetase
	(1) Accumulation of Geranyl Pyrophosphate
	(2) Competitive Effect of Two Substrates
	(3) Time Course
Chapter IX	Inhibitory Effect of Farnesyl Pyrophosphate
Chapter X	Reaction of C ₁₀ and C ₁₁ Allylic Pyrophosphates

SUMMARY

REFERENCES

ACKNOWLEDGEMENTS

論文内容要旨

緒言

Farnesyl pyrophosphate synthetase は次式(図1)に示すような2つの反応を触媒する酵素であり, yeast, pig liver, pumpkin などより抽出されている。この反応は有機化学的には炭素-炭素を非常にスムーズに生ずる反応であるという点で興味があるし, 生化学的には一つの反応点で a, b 両反応を触媒し, dimethylallyl pyrophosphate (2)からも, geranyl pyrophosphate (3)からも isopentenyl pyrophosphate (1)と縮合して farnesyl pyrophosphate (4)を生ずると考えられている点で興味がある。

この反応の立体化学的な研究は, 不斉ラベルした基質を用いて, くわしくしらべられているにもかかわらず, 基質特異性という面では, まだ何もわかっていない。そこで著者は(2)の同族体を種々合成し, 炭素数の上からは(2)と(3)の中間の基質やそれ以上の炭素数を持つ基質などを系統的に合成し, それらの基質特異性からこの酵素の反応の調整機構の問題, 活性中心の問題, 動物酵素と植物酵素の差などについて検討した。これらの問題は, 天然基質(2), (3)では解決することが困難な問題で

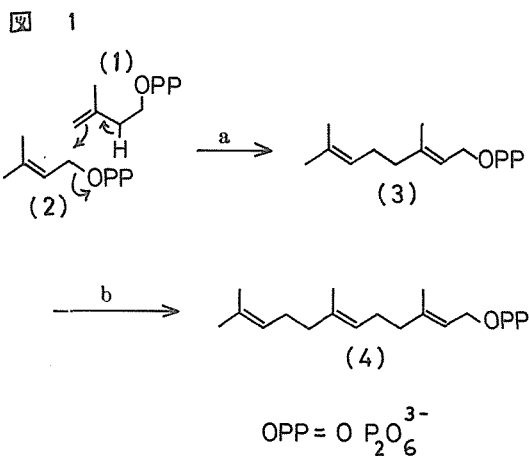
あったが, 非天然の基質を約40個合成し, 系統的に酵素反応を行わせることによって, a, b 両反応をつかさどる反応点は別々に存在すること, 反応の停止機構は疎水性のアルキル基の大きさによって調整されていること, 動物酵素と植物酵素は別の酵素であること, などが結論出来た。

第1章 基質合成;

対応するケトンのWittig反応で *cis*, *trans* 混合のエステルを得, それぞれを分離する為に, 加水分解してカルボン酸にし, *trans* 体は結晶として精製した。一方母液はエステルにもどしてカラムクロマトグラフィーで分離精製して *cis* 体を得た。これらはいずれも LiAlH_4 でアルコールにし, Cramer等の方法でリン酸化してオルソリン酸エステルを除いて, 目的のピロリン酸エステルを得た。又 3-位にメチル基のない 2-alkenyl pyrophosphates は対応するアルデヒドとマロン酸との縮合によってカルボン酸を得, あとは同様な操作で得た。途中の生成物の確認は主として NMR による。得られたピロリン酸エステルの確認は IR による。

第2章 3-methyl-2-alkenyl pyrophosphates の基質特異性;

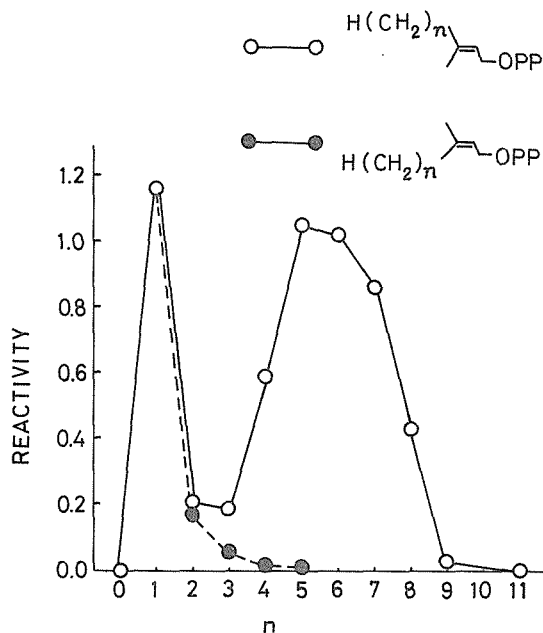
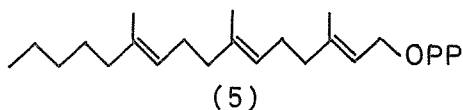
pumpkin 酵素を用いて一定濃度 ($10 \mu\text{M}$) での各基質の初速度を基質の炭素数に対してグラフを書くると図2のようになる。



これから *trans* 型が *cis* 型より酵素活性が強い 図 2

こと, 又 *trans* 型では C_5 と C_{10} のところに 2 つの活性のピークがあるのに反して, *cis* 型では C_5 に 1 つのピークがあるのみであることがわかった。これらの各々の生成物を TLC や GLC で検討すると C_5 のピークに属する基質では, (4) のホモ体まで生ずるが C_{10} のピークに属する基質では (3) のホモ体どまりであることがわかった。又, この酵素が合成し得る最長炭素鎖は, C_{10} の tetrahom of arnesyl pyrophosphate (5) であつた。(図 3)

図 3



第 3 章 geometry のちがう同一炭素数の基質による比較;

炭素数 C_7 , C_8 の基質の異性体の K_m と V_{max} 値を pig liver 酵素で求めると, 表 1 のような結果になる。これから (6) (7) のような 3 位が 2 置換でない化合物は全く基質にならないことがわかった。又, 同じ炭素数に注目してもやはり *trans* 体の方が *cis* 体よりも酵素に対する親和力が強いことがわかったが, (10), (11) のような環状化合物では K_m と V_{max} の関係に統一した傾向がみられなかった。

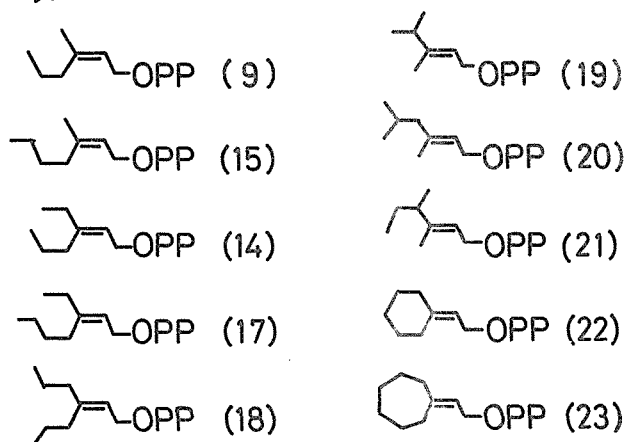
表 1 K_m and V_{max} values of artificial substrates

Compound	K_m (μM)	V_{max} (cpm $\times 10^{-4}$)	Compound	K_m (μM)	V_{max} (cpm $\times 10^{-4}$)
(I)	---	---	(VI)	---	---
(II)	13	1.49	(VII)	7	2.20
(III)	13	1.22	(VIII)	10	0.83
(IV)	40	1.60	(IX)	16	0.76
(V)	50	2.08	(X)	22	0.87
			(XI)	8	0.73

第4章 pumpkin 酵素と pig liver 酵素との比較；

天然の基質の(2)(3)を用いたのでは反応性でも生成物でも両酵素には全く差がみとめられなかったが、2に示した化合物については顕著な差が認められた。これらの化合物は pig liver 酵素に対しては基質になるのに対して、pumpkin 酵素では全く基質にならないか、またはたとえ基質になっても極めて低い反応性しか示さなかった。

表 2



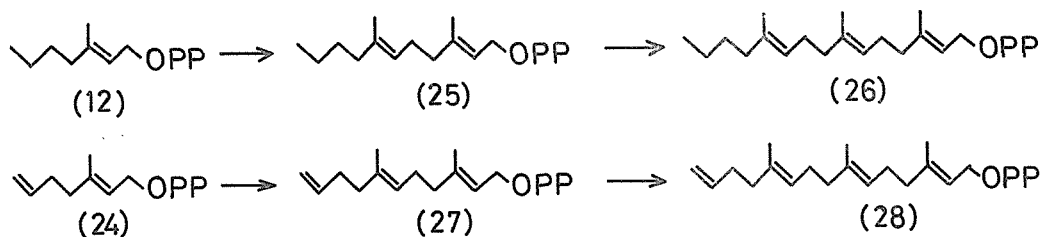
第5章 基質になり得る構造；

合成した基質のうちで酵素活性がなかったものは、図2からわかるようにアルキル基の大きな化合物、又第3章でも述べたが3位に1個しかアルキル基をもたない allylic pyrophosphate などであった。

第6章 16,16'-bisnorgeranylgeranyl pyrophosphate の生成；

第1章でわかったように(12)のように図2で最初のピークに属する基質では、生成物は(3)のホモログと(4)のホモログの2個である。このとき生成物を決める因子が二重結合であるかどうかを決定する為に次の実験を行った。(12)の6,7位に二重結合を導入して二重結合の数と位置に関しては、(8)と同じ(24)を作り酵素反応を行わせた。その生成物には(1)が1モル縮合した生成物のみならず2モル縮合した(28)のような化合物もあった。このことからこの酵素反応の停止機構は二重結合で支配されているのではなく、アルキル基の大きさで支配されているということがわかった。(図4)

図 4



第7章 合成基質存在下での酵素の熱処理と dihydrofarnesyl pyrophosphate の生成物阻害；

第6章のような二重結合の影響を(8)と dihydrogeranyl pyrophosphate (29)で検討する意味で酵素反応の時間変化をしらべたところ、(29)の方では反応速度が時間とともに低下することがわかった。これは非天然の基質なるが、時間がたつと酵素が失活してしまうのか、生成物阻害の為なのかを決定する目的で熱処

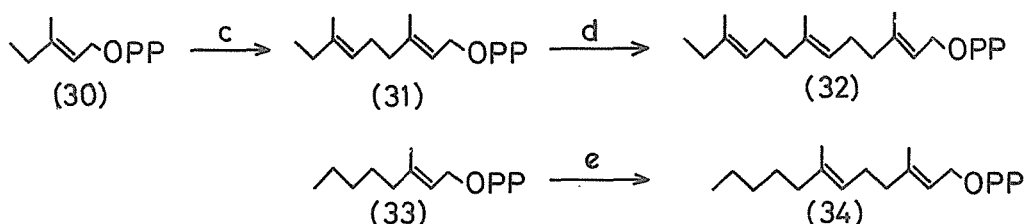
理を行ったが、天然基質(3)との差はあまりなく、この現象は生成物阻害であることがわかった。

第8章 二つの反応点の存在の証明；

今までこの酵素は1つの反応点で2つの反応を触媒すると考えられていたが図2からもわかる通り *trans* の基質で2つの活性のピークを示すということは、2つの反応点の存在を示唆する。この2つの反応点の存在を以下の3つのことから確認した。

- i) 1つの反応点と考えられた根拠に(2)を基質にしたとき中間の(3)が蓄積されず、(4)のみが生成物であったという事実があったが、反応時間の初期に於て、この(3)が蓄積されてくることを認めた。このことは1つの活性中心で中間体が酵素からはなれないで反応を行うという説を否定した。
- ii) 図2で最初のピークに属する基質、たとえば(30)の生成物は(31)と(32)の二種類である。この反応系に二

図 5



つ目のピークに属する基質、たとえば(33)を混合したときに、(30)からの生成物の(31)と(32)の生成量がどのように変化するかをしらべた。結果は(32)が減少して(31)が増加した。このことは図5で、d反応とe反応が拮抗するためにみられた現象であるとする説明が付き、あきらかに、c反応とd反応は別の反応点で行われているといえる。

- iii) 図2で最初のピークに属する基質の反応の time course をとってみると、時間と生成量とのグラフがシグモイド型になる。この時、各時間での生成物をそれぞれ分析して、1が1モル縮合した生成物の量と2モル縮合した量とをグラフにあらわしてみると、1モル縮合した生成物の量が直線になることを見出した。このことは前の反応と後の反応がそれぞれ独立した反応点で行われていて、それぞれ相互に影響をおよぼさないとすれはうまく説明出来る。したがって2つの反応点の存在は、この実験からも認められる。

第9章 farnesyl pyrophosphate の調節作用；

第8章iii)と同じ実験を天然の基質(2)で行うとシグモイド型にならない。しかし生成物を精査して最終生成物の(4)が(2)から(3)になるa反応を選択的に阻害していることが示唆されたので阻害反応をしらべた。その結果は、(4)が25 μ Mのときa反応は62%阻害されるのに対してb反応はほとんど0%の阻害度であった。これは生合成の生理的な調節機構に重要な意義を持っているのではないと思われる。

第 10 章 C₁₀と C₁₁ の基質の反応；

(3)を長い時間反応させると geranylgeranyl pyrophosphate (35)が生成してくる。この反応は(35)を作る酵素に有利な金属イオンを使用しても差がないこと、又(4)を基質にしても短い時間の反応では、(35)を作ることが皆無であることより farnesyl pyrophosphate synthetase が何らかの変形をうけて(35)まで生成するようになったものと考えられる。同じ現象は *trans*-3-methyl-2-nonenyl pyrophosphate, *trans*-3-methyl-2-decenyl pyrophosphate でもみられた。

非天然基質を合成して酵素反応を研究したことによりこの酵素反応の停止の調節機構がアルキル基の大きさによって支配されること、pumpkin と pig liver の酵素は別の酵素であること。そして、この酵素反応が2つの反応点で、a, b 両反応を別々に触媒していることなどが実証された。

これらの事実は天然の基質からは導くことが出来なかったことであり基質特異性をみた意義は大きい。

論文審査結果の要旨

天然物の中でC₃単位からなるものは重要な1群をなしているが、その中ファルネソールはセスキテルペン類およびステロイドの中間体として重要な地位にある。西野徳三提出の論文は、この生合成にあたり重要な働きをするファルネシルピロリン酸合成酵素の基質特異性と反応機作について述べたものである。

緒言につき第1章においては、基質類似体の合成について述べている。正常な基質ジメチルアリルピロリン酸の類似体としてメチル基のないもの、メチル基の代りに種々のアルキル基の入ったもの等約40種を合成した。

これらの中には従来シス体とトランス体の分離の不可能視されたものもあるが、著者はすぐれた実験技術によって精製に成功し、其の後の研究の基礎を築いた。第2章においては、カボチャよりえられた酵素を用いて、3-メチル-2-アルケニルピロリン酸類の反応性を詳細にしらべ、トランス体においては炭素数5ケと10ケに対応して、2つの反応性のピークがあるのに対して、シス体においては5ケの所に1つのピークがあらわれることを見出した。第3章においては、豚肝臓からえられた酵素を用いて、炭素数7ケおよび8ケの類似体について、その構造と反応速度の関係をしらべ、 K_m と V_{max} の値を求めた。その結果3位にアルキル基を1つしかもたないものは全く反応しないこと、およびトランス体の方がシス体よりも酵素に対する親和力が強いことを見出した。第4章においては、カボチャ酵素と豚肝臓酵素の比較を行ない、後者が前者に比し基質の構造に対する許容性の大きいことを見出した。第5章においては前章までにえられた結果を整理して、分類を行い構造上の要件を明らかにした。第6章においては本酵素による反応の終結が、二重結合の数によって決定されるのか、アルキル基の大きさによるのかを検討し、後者が支配していることを見出した。

第7章より第10章にわたり、反応速度と反応生成物の分析結果から、阻害効果を論じ、又ゲラニルピロリン酸とファルネシルピロリン酸の合成される活性部位が別個であることを推論して従来の一活性中心説を否定し、更にファルネシルピロリン酸がゲラニルピロリン酸の生成を阻害する生理的条件下での調節機構を示唆した。

以上西野徳三の論文はファルネシルピロリン酸合成酵素について多くの重要な知見をえて、イソプレノイド生合成の分野に大きな貢献をしている。よって審査員一同は西野徳三提出の論文は理学博士の論文として合格と認めた。