

氏名・(本籍)	みや の まさ し 宮 野 雅 司
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理第 798 号
学位授与年月日	昭和60年9月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
最終学歴	昭和53年3月 東北大学大学院理学研究科 (前期2年の課程)生物学専攻修了
学位論文題目	タバコ Ribulose - 1,5 - bisphosphate Carboxylase / Oxygenase の活性発現と高次構造変化に関する 研究
論文審査委員	(主査) 教 授 小 西 和 彦      教 授 駒 嶺      穆 助 教 授 四 釜 慶 治

## 論 文 目 次

第一章 緒論

第二章 材料及び方法

第三章 結果

第1節 酵素の調製と純度

第2節 Carboxylase 活性の性質

第3節 酵素の活性化機構

I) 粘度による構造解析

II) 蛍光性試薬 1 - Anilino - 8 - naphthalene sulfonate を probe とした構造解析

#### 第四章 考察

< 要約 >

謝辞

参考文献

図表

# 論文内容要旨

## 第一章 緒論

タバコ (*Nicotiana tabacum* L.) の Fraction - 1 蛋白質は約18Sの沈降係数を持つ単一成分からなり、その含量は葉中の可溶性蛋白成分の半分にも及ぶ。この Fraction - 1 蛋白質は、すべての緑色高等植物中に存在し、光合成の炭素固定反応を触媒すると同時に、光呼吸の初期反応をも触媒する二機能性酵素 Ribulose - 1, 5 - bisphosphate Carboxylase / Oxygenase (RuBPC / O) [ 3 - phospho - d - glycerate carboxylase (dimerizing) E C. 4. 1. 1. 39 ] であることが解っている。

この RuBPC / O は、54 kD のサブユニット 8 個と 14 kD のサブユニット 8 個とが方形二層に並んでいる巨大蛋白質であり、その活性は、pH,  $Mg^{2+}$  濃度、および代謝中間体の糖リン酸濃度等により調節を受ける。さらに、この酵素は cold - labile な性質を示すが、熱処理によって再び活性を回復する可逆性を示す。近年、 $Mg^{2+}$  存在下で基質とは異なる二酸化炭素が酵素を活性化する機構が発見され、また大きい方のサブユニットの一次構造も決定されている。こうしたなかで、この酵素の活性発現と高次構造との関係を明らかにすることは重要な研究課題と思われる。

直接結晶による従来の調製法によって得られるタバコ RuBPC / O 標品の比活性は、ハウレンソウ等のものと比べて相当に低いので、本研究ではまず精製法を検討した。そして新しく確立した方法によって得た酵素標品を用い、Carboxylase 活性を比較検討した。次にこの酵素の活性発現がいかなる高次構造変化を伴っているかを明らかにする目的で、沈降速度や粘度の測定により蛋白質全体の構造変化を調べた。次に紫外部の吸収変化や蛍光色素 1 - Anilino - 8 - naphthalene sulfonate (ANS) を probe として用いた分光学的方法により、酵素分子内の局所的变化も検討した。

## 第二章 材料および方法

基質の RuBP は Ribose - 5 - phosphate と ATP から酵素転換法により合成した。

酵素 RuBPC / O は温室栽培のタバコの葉から従来の「直接結晶法」及びそれを一部改良したゲルろ過法により調製した。

酵素活性には、主として  $^{14}CO_2$  の取り込みによる Carboxylase 活性を測定したが、Polarography による Oxygenase 活性も測定した。

高次構造の解析は、沈降分析、粘度測定及び、紫外吸収、蛍光スペクトル等によって行なった。

## 第三章 結果

### 第 1 節 酵素の精製と純度

タバコ RuBPC / O を従来の「直接結晶法」で調製すると電気泳動的には均一だが、Carboxylase 活性は 0.1 ~ 0.3 unit と低い。そこでゲルろ過を用いて新たな精製法を検討した。その結果、電

気泳動的に均一でしかも比活性が 1.0 unit を越えるものを得ることができた。

## 第 2 節 Carboxylase 活性の性質

I) 低温で活性が半減する cold-labile な性質をもつため、熱処理による活性回復条件を検討した。その結果、低温で不活性になった本酵素は、40°C で 15 分間の熱処理をすると活性は約 2 倍となった。

II) Carboxylase 活性は、反応開始後約 1 分間は直接的に反応は進むが、その後徐々に抑えられた。

III) Carboxylase 活性は pH 8 に至適 pH をもつベル形となり、基質 RuBP に対する Michaelis 定数  $K_M$  は 25°C、pH 8.0 で  $3.8 \times 10^{-5}$  M であった。

IV) Carboxylase 活性に対する  $Mg^{2+}$  の影響を調べると、5 mM までは酵素活性は増大するが更に高濃度の  $Mg^{2+}$  では活性は阻害された。 $Mg^{2+}$  の  $K_M$  は  $2.5 \times 10^{-3}$  M と求まった。

V) 低温不活性化型酵素の示す Carboxylase 活性の Arrhenius plot は 16°C で折れ曲る 2 相性を示した。この際の活性化エネルギー ( $E_a$ ) は 16°C 以上では 41.7 kcal/mol、16°C 以下では 67.2 kcal/mol であった。これに対し熱処理をした活性化型酵素の Arrhenius plot は直線となり、 $E_a$  は 36.9 kcal/mol と一定であった。この値は低温不活性化型酵素が熱転移をした後の活性化エネルギーに近い。

## 第 3 節 酵素の活性化機構

### I) 粘度による構造解析

タバコ RuBPC/O の酵素溶液は著しい構造粘性をもち、その固有粘度  $[\eta]$  は 25°C で 28.2 dl/g と求まった。また低温で不活性化型となった本酵素の還元粘度  $\eta_{red}$  を測定すると 15°C に温度転移点が見い出され、15°C 以上では負の温度依存性を、15°C 以上では正の温度依存性を示した。また、低温不活性化型酵素を 40°C で熱処理するとその  $\eta_{red}$  は徐々に低下し約 20 分で一定値に達することが解った。

### II) 蛍光性試薬 ANS を probe とした構造解析

A) 本酵素の ANS に対する解離定数 ( $K_D$ ) は、熱処理により大きな違いはみられなかったが、蛍光強度は大きく減少した。このことは酵素 1 分子あたりの ANS 結合数が熱活性化処理により 3 分子から 1.5 分子に減少したことを示している。この熱活性化型酵素を更に  $CO_2/Mg^{2+}$  で活性化処理をすると、ANS の  $K_D$  には差はなかったが、ANS の結合数は 1.5 から 0.9 へとさらに減少した。

B) また ANS の蛍光強度の変化から  $Mg^{2+}$  イオンの結合点は 2 種類あることが解った。その解離定数は、熱処理前の酵素では、 $K_D = 1.0 \times 10^{-2}$  M と  $K_D = 3.0 \times 10^{-2}$  M、熱処理では  $K_D = 2.0 \times 10^{-3}$  M と  $K_D = 2.9 \times 10^{-2}$  M であった。

C) 本酵素に基質である RuBP を加えると ANS の結合状態が変わることから酵素蛋白に構造

変化のもたらされることが示唆された。

#### 第四章 考察

従来「直接結晶法」により調製されたタバコの RuBPC/O の活性は低い。本研究で検討したゲルろ過法ではその比活性が、25°Cで 1.0 unit を越える標品を得ることができた。得られたタバコ標品の Carboxylase 活性の性質は、ホウレンソウなどの他の高等植物由来の酵素と同様であった。

またこの酵素は低温で不活性化型となるが、40°C、15分間の熱処理によりその活性は回復し、これに伴って種々の物理化学的変化が観察された。まず還元粘度の顕著な低下が起こるが、これはサブユニットの解離会合等の大きな変化によるものではない。つぎに疎水性蛍光色素 ANS を結合させると、酵素当りの結合数は熱処理により約半数に減少した。これらの結果は、この酵素蛋白が低温不活性化型から熱処理によって活性化型に転移する際は、酵素表面の疎水性領域が減ずるような高次構造の変化を伴うことを強く示唆している。また CO<sub>2</sub>/Mg<sup>2+</sup> 活性化処理によっても CO<sub>2</sub> と Mg<sup>2+</sup> イオンが結合することによって、その疎水領域はさらに減少するものと考えられた。この低温不活性化型から熱活性化型への転移温度は、Carboxylase 活性の変化からも、また還元粘度の変化からも共に 15°C 前後と求まった。なお、この転移反応は非常にゆっくりしたものであった。

次に酵素に結合させた ANS の蛍光変化を probe として、この酵素蛋白の高次構造変化をさらに検討した。まず Mg<sup>2+</sup> イオンについては、2 種類の結合定数が求められた。熱活性化型酵素の高親和性 Mg<sup>2+</sup> の結合定数は、Carboxylase 活性発現に必須な Mg<sup>2+</sup> イオンの Michaelis 定数に相当し、一方低温親和性の Mg<sup>2+</sup> 結合定数は Carboxylase 活性の阻害を引き起す Mg<sup>2+</sup> 濃度に相当した。また基質 RuBP の結合実験でも 2 種類の結合定数が求められ、熱活性化型酵素での高親和性 RuBP の結合定数は、Carboxylase 活性に対する RuBP の Michaelis 定数に相当した。以上の結果から、Mg<sup>2+</sup> や基質 RuBP の結合により酵素蛋白には微妙な構造変化がもたらされているものと考えられた。

高等植物の光合成と光呼吸代謝の分岐点に位置するこの酵素は、温度、Mg<sup>2+</sup>、基質等の諸要因によって、その高次構造を微妙に変化させながら活性を制御しているものと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、高等緑色植物において、光合成と光呼吸との分岐点に位置して、最も重要な役割を演じている二機能性の酵素「Ribulose - 1,5-bisphosphate Carboxylase Oxygenase」につき、その活性発現と高次構造変化との関係を明らかにすることを目的としたものである。

本研究では、まずタバコ (Nicotiana tabacum L.)の緑葉を用い、本酵素の単離精製法を種種検討した。その結果、ゲルろ過法により、従来の標品よりも数倍比活性の高い酵素標品を得ることに成功した。次に得られた本酵素につき、主として Carboxylase 活性の pH 依存性、 $Mg^{2+}$  イオンの要求性、基質 RuBP に対する Michaelis 定数の測定等を行い、本酵素の一般的性質を明らかにした。

一方、本酵素を低温にさらすと、その活性は半減して低温不活性化型となるが、 $40^{\circ}C$ で加熱するとその活性は徐々に回復する。そこで、この熱処理に伴う活性化機構を詳細に検討した。その結果 Arrhenius plot は  $16^{\circ}C$  に転移温度を示す二相性となり、その活性化エネルギー ( $E_a$ ) は  $16^{\circ}C$  以下では  $67.2\text{ kcal}$ 、 $16^{\circ}C$  以上では  $41.7\text{ kcal}$  であった。又、この過程で酵素蛋白の還元粘度は著しく減少したが、しかし沈降分析の結果から、これはサブユニットへの解離に基づくような大きな変化ではない。そこで疎水性蛍光色素の A N S 存在下で上記の熱転移反応を検討した。その結果、この酵素蛋白は不活性化型から活性化型へと変化する際に、蛋白分子の疎水性領域を減少させるような、局所的高次構造変化を示すことが明らかとなった。また、活性発現に必須の  $Mg^{2+}$  イオンや、基質の一つである RuBP によっても、同様な高次構造変化が酵素蛋白に生じている可能性も論じられている。

以上、本論文により、本人が自立して研究を行うために必要な研究能力と学識を有することが示され、よって宮野雅司提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。