

学 位 論 文 題 名

GTP シクロヒドロレース I の酵素学的性質と

フィードバック調節機構

学位論文内容の要旨

プテリジン化合物であるテトラヒドロbioプテリンは、3つの水酸化酵素、即ち、フェニルアラニン水酸化酵素、チロシン水酸化酵素、トリプトファン水酸化酵素と最近発見された一酸化窒素合成酵素の補酵素として働いており、生体内に広く分布している。このようにテトラヒドロbioプテリンはフェニルアラニン代謝、ドーパミンやセロトニンの生合成、及び血管拡張を含め多くの機能を持つ一酸化窒素の合成等の生体内の重要な代謝に関与しており、それらの物質代謝の調節因子の一つであると考えられている。テトラヒドロbioプテリンは生体内でグアノシン5'-三リン酸 (GTP) から3つの酵素により生合成され、その生合成は種々の調節を受けている。特に、生合成の初発段階を触媒し律速酵素であるGTPシクロヒドロレースIは、サイトカインによる転写レベルでの調節等、種々の調節を受けている。GTPシクロヒドロレースIの生合成調節機構を解明することは、上記の物質の代謝調節におけるテトラヒドロbioプテリンの役割を知る上で重要である。

GTPシクロヒドロレースIをラット肝粗抽出液から5%の収量で38,000倍に精製した。酵素の分子量はゲルろ過で300,000と見積もられた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で30,000の単一のバンドを示し、N末端アミノ酸配列分析では一種類のみのアミノ酸が検出されたので、ラットのGTPシクロヒドロレースIは約10個のサブユニットから成るホモポリマーであると考えられる。GTPシクロヒドロレースIは基質であるGTPに対してヒル係数が2.4の正の協同性を示した。最大活性の半分を生ずるGTPの濃度は、塩化カリウム濃度0.1Mで30  $\mu$ Mであった。この値は塩化カリウム濃度の上昇と共に増加し、最大速度やヒル係数は変化しなかった。

精製酵素の部分アミノ酸配列解析から予想した合成オリゴヌクレオチドを使い、ラ

ット肝cDNAライブラリーをスクリーニングし、GTPシクロヒドロレースIの全翻訳領域と3'非翻訳領域を含むcDNAクローンを分離した。4つのクローンが得られ、最も長いものは1024塩基であった。241個のアミノ酸をコードしていたが、N末端の11個のアミノ酸は精製酵素には存在していないものであった。

予想されるアミノ酸配列の特徴には、カゼインキナーゼIIとヒストンH1キナーゼのリン酸化認識部位と考えられる配列が存在していた。さらに、ジヒドロ葉酸還元酵素で保存されているジヒドロ葉酸のプテリン基が結合する配列と高いホモロジーを示す領域があった。GTPシクロヒドロレースIのこの部位は本酵素に対して阻害活性のあるテトラヒドロピオプテリンの結合部位であると予想された。

GTPシクロヒドロレースIのcDNAを組み込んだpMALベクターを構築した。プラスミドを持った大腸菌をイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシドで誘導するとマルトース結合蛋白とGTPシクロヒドロレースIの融合蛋白が得られ、大腸菌蛋白の10%を占めていた。アフィニティー精製、ゲルろ過で融合蛋白を精製し、2つの蛋白の間に設定したファクターXa認識部位をファクターXaで切断、ゲルろ過後、組み換えGTPシクロヒドロレースIを得た。その結果、500mlの培養から2.5mgの酵素を得ることができた。この組み換え酵素はラット肝から精製した酵素と分子量及び速度論的性質において差がなかった。特に、ラット酵素と同様に、組み換え酵素もGTPに対する正の協同性を示した。

GTPシクロヒドロレースIは、テトラヒドロピオプテリン生合成系の律速酵素であり種々の調節を受けているが、肝においては最終生成物であるテトラヒドロピオプテリンによりフィードバック阻害を受けることがin vivoでもin vitroでも示唆されていた。しかし、その分子機構は解明されていなかった。今回、分子量35,000の蛋白(p35)が、テトラヒドロピオプテリンの存在下でその濃度に依存してGTPシクロヒドロレースIを阻害することを見出した。プテリジン化合物の要求性は天然型である6R-テトラヒドロピオプテリンに特異的であり、阻害を起こす濃度は生理濃度の範囲であった。ゲルろ過の実験より、p35とGTPシクロヒドロレースIは、テトラヒドロピオプテリンが存在すると複合体を形成し、テトラヒドロピオプテリンがなければ解離することが明らかになった。このフィードバック阻害様式は、最終産物とその律速酵素を他の蛋白を介して間接的に阻害するという点で新しいものである。

更に、p35とテトラヒドロピオプテリンによるGTPシクロヒドロレースIの阻害は、

肝においてテトラヒドロビオプテリンを補酵素としているフェニルアラニン水酸化酵素の基質であるフェニルアラニンによって特異的に回復された。この回復効果はL-フェニルアラニンに特異的であり、生理濃度範囲で効果があった。更に、GTPシクロヒドロレースIはGTPに対して正の協同性を示すアロステリック酵素であるが、フェニルアラニンは、その濃度依存性にp35と共役してGTPシクロヒドロレースIの協同性を減少させ、基質-速度曲線を飽和型へ変換させた。p35系は、肝においてフェニルアラニン水酸化酵素が必要とするテトラヒドロビオプテリンをその必要に応じて供給するという目的で機能していると考えられる。それは、酵素の基質がその酵素の補酵素の合成を調節するという点で新しいタイプの調節である。フェニルアラニン水酸化酵素の欠損によって起こる高フェニルアラニン血症の患者では血漿中ビオプテリン値も高いことが観察されていたが、我々の発見はこの現象を分子レベルで説明するものであり、高フェニルアラニン血症の患者で観察される原因不明の神経症状について、血漿中の高ビオプテリン濃度の役割やテトラヒドロビオプテリン合成が常時活性化され続けているという点から再考することは興味深いことである。

以上の発見は、補酵素を必要とする酵素のその基質によるその補酵素の生合成速度の制御という新しい機構を示すものである。従って、我々はp35をGTPシクロヒドロレースIの"feedback regulator" proteinと名付けた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 盛 田 フ ミ

副 査 教 授 谷 口 和 弥

副 査 教 授 菊 池 九二三

副 査 教 授 荒 木 義 雄

## 学 位 論 文 題 名

### GTP シクロヒドロレース I の酵素学的性質と

### フィードバック調節機構

グアノシン 5' トリリン酸 (GTP) シクロヒドロレース I は GTP からジヒドロネオプテリントリリン酸を合成する反応を触媒する酵素であるが、ジヒドロネオプテリントリリン酸は更に二種の異なる酵素反応段階を経て最終的にテトラヒドロピオプテリン (BH<sub>4</sub>) に変えられる。GTP シクロヒドロレース I は BH<sub>4</sub> 生成のためのこれら三段の酵素反応の律速段階であり、最終産物である BH<sub>4</sub> はこの律速段階をフィードバック阻害することが知られている。申請者はこのフィードバック阻害には酵素とは異なる分子量 35,000 の蛋白 (p 35) が必要なことを示した。フィードバック阻害に酵素分子以外の蛋白質が必要であるという報告はこれまでに全くなされていない。

更に BH<sub>4</sub> は、フェニルアラニン水酸化酵素、チロシン水酸化酵素、トリプトファン水酸化酵素、一酸化窒素合成酵素などにおける補酵素として働くことが知られているが、その中の一つであるフェニルアラニン水酸化酵素の基質であるフェニルアラニンが、GTP シクロヒドロレース I を p 35 を介して活性化することを見出した。即ち、補酵素を必要とする酵素の基質がその補酵素の生合成を調節するという全く新しい代謝調節のカテゴリーを見出している。

本論文は二部から成る。第一部においては、先ず GTP シクロヒドロレース I をラット肝より抽出精製し、分子量、サブユニット構造等を明らかにした。酵素の最大活性は pH 8 付近にあること、また基質 GTP 濃度に対する酵素活性のシクモイダルな依存性、そのヒル係数はほぼ 2 である事等を示した。次ぎに精製酵素の部分アミノ

酸配列を決定し、ユニークな配列部分三ヶ所を選んでオリゴヌクレオチドを合成した。これらをプローブとしてラット肝 cDNA ライブラリーから GTP シクロヒドロレース I の cDNA を得、全一次構造を決定した。またこの cDNA を用いてマルトース結合蛋白との融合蛋白として GTP シクロヒドロレース I の大腸菌内での大量発現に成功した。

第二部においては、GTP シクロヒドロレース I 活性の調節機構について述べている。先ず、ラット肝から精製したシクロヒドロレース I 或は、大腸菌で発現した組み換え酵素が BH<sub>4</sub> による阻害を示さないことを見出した。しかし肝粗抽出液では BH<sub>4</sub> による阻害が示されたので、精製過程で失われた因子が阻害を誘発するのに必要であるという観点からこれを追跡した。ゲル濾過において分子量 35,000 の位置に溶出される蛋白がその因子であることを見出し、これを p 35 と名づけた。p 35 は BH<sub>4</sub> 存在下でのみ GTP シクロヒドロレース I と可逆的複合体を形成することをゲル濾過と抗体を用いた実験から示した。また BH<sub>4</sub> による阻害の様式は非拮抗的である事が見出された。更にフェニルアラニン水酸化酵素の基質であるフェニルアラニンを加えると p 35 と BH<sub>4</sub> で阻害された GTP シクロヒドロレース I 活性が恢復する事を見出した。そこで、フェニルアラニンの効果を詳しく調べると BH<sub>4</sub> 否存在下でも p 35 が存在すればフェニルアラニンによる GTP シクロヒドロレース I 活性の活性化が起り GTP 濃度依存性を双曲線型に変えることなどを見出した。即ち、基質であるフェニルアラニンがフェニルアラニン水酸化酵素の補酵素である BH<sub>4</sub> の生合成をその最初の段階で活性化するという巧妙な制御機構が働いていることが明らかとなった。しかもその活性化と GTP シクロヒドロレース I のフィードバック阻害の両プロセスに対し共に p 35 が必須なことが示された。

以上総括すると、1) 酵素のフィードバック阻害に酵素分子以外の蛋白質が関与する場合があること。2) 補酵素の生合成の最初の段階がその補酵素を利用する酵素の基質によって活性化されるという調節機構が存在する。という代謝調節の分子機構に関する大きな発見が二つなされている。このような稀に見る優れた研究結果により、審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。