

氏名	与那覇和雄 よなはかずお
学位の種類	農学博士
学位記番号	農博第214号
学位授与の日付	昭和50年7月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	<b>STUDIES ON D-AMINO ACID AMINOTRANSFERASE OF BACILLUS SPHAERICUS</b> ( <i>Bacillus Sphaericus</i> のD-アミノ酸トランスアミナーゼに関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 山本龍男 教授 緒方浩一 教授 廣海啓太郎

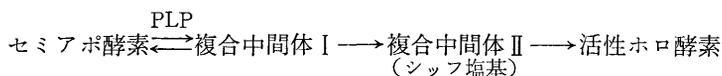
### 論文内容の要旨

アミノ酸代謝研究の初期においては D-アミノ酸は生理的に不活性ないわゆる非天然型アミノ酸として本格的な研究の対象とならなかった。しかしながら近年、細菌の細胞壁、ペプチド性抗生物質などの構成成分として、また植物や昆虫の組織中には遊離の状態では D-アミノ酸が見いだされるようになり、その特異な生理活性とともに D-アミノ酸の代謝、特に酵素化学的な面からの研究が注目されるようになった。本研究は D-アミノ酸代謝において中心的な位置を占める D-アミノ酸トランスアミナーゼを細菌から精製結晶化しその酵素化学的性質を明らかにするとともに構造や反応機構について新知見を加えたものである。

酵素源として *Bacillus sphaericus* IFO 3525 を用い、無細胞抽出液より本酵素を約1,000倍に精製し淡黄色針状の結晶を得た。本酵素は分子量約60,000であり、分子量約30,000の同一サブユニット2個から構成されている。N末端アミノ酸としてアラニン、C末端アミノ酸としてロイシンが同定された。本酵素は補酵素としてピリドキサル5'-リン酸 (PLP) を2分子含有しており、そのうち1分子が酵素活性に直接関与している。活性に関与する PLP は酵素タンパク質中のリジン残基の ε-アミノ基とシッフ塩基を形成して結合している。本酵素をフェニルヒドラジンで処理すると1分子の PLP が解離し、触媒機能を可逆的に失った状態の標品が得られる。この酵素の存在様式は先に L-リジン-α-ケトグルタル酸 ε-トランスアミナーゼに対して報告されたのと同じく、セミアポ型であることが証明された。本酵素の円偏光2色性 (CD) スペクトルは 330 nm および 415 nm に負の CD 帯を示した。この結果は従来研究の行なわれてきた L-アミノ酸トランスアミナーゼがすべて正の CD を示すこととは対照的である。そのほか蛍光スペクトルおよび反応動力学的性質をも明らかにした。

ついで本酵素活性と SH 基との関係や補酵素の結合について検討を加えた。本酵素においては4個の SH 基が5, 5'-ジチオ-ビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) と反応するが、このうち活性に関与するのは2個である。セミアポ酵素においては活性に関与する SH 基の DTNB に対する反応性が失われるが、セ

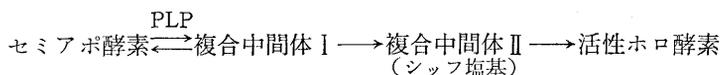
ミアポ酵素と PLP から再構成された活性なホロ酵素においてはその反応性が回復される。セミアポ酵素と PLP の反応の動力学を分光学的測定および酵素活性の増加より検討した結果、次のように少なくとも 3 段階で進行することが明らかにされた。



### 論文審査の結果の要旨

D-アミノ酸の特異的な存在と生理活性が明らかになるにつれて D-アミノ酸代謝研究の重要性が注目されるようになってきた。この分野においては特に酵素化学的研究が乏しく一、二のアミノ酸ラセマーゼを除いて精製酵素を用いた本格的な研究はほとんど行なわれていない。

著者は *Bacillus sphaericus* より D-アミノ酸代謝において最も重要な役割を果している D-アミノ酸トランスアミナーゼを均一に精製し、淡黄色針状の結晶として単離することに成功した。この結晶酵素の諸性質を、酵素化学的、物理化学的ならびにタンパク化学的立場から究明した。本酵素は分子量約 60,000 で、分子量約 30,000 の同一サブユニット 2 個から構成されている。N 末端アミノ酸としてはアラニンが、C 末端アミノ酸としてはロイシンが同定された。補酵素としては、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) が 2 分子結合しており、そのうち 415 nm に吸収極大をもつ 1 分子だけが酵素の触媒作用に直接関与し、酵素タンパク質中のリジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基とジッフ塩基を形成していることを明らかにした。他の結合補酵素 1 分子の結合状態についても分光学的検討を加えている。また本酵素はフェニルヒドラジンで処理すると 1 分子の PLP が解離し、触媒機能を可逆的に失ったセミアポ酵素に変ることを実証した。さらに酵素活性と SH 基との関係を研究し、本酵素の活性発現にはホロ酵素 1 分子あたり 2 個の SH 基が必要であり、この SH 基はセミアポ酵素においては、5,5'-ジチオ-ビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) と反応しないが、再構成された活性なホロ酵素においてはその反応性が回復されることを見いだした。セミアポ酵素と PLP との結合反応の動力学を分光学的測定および酵素活性の増加より検討した結果、活性なホロ酵素は次のように少なくとも 3 段階を経て形成されることを明らかにした。



以上のように本論文は、はじめて細菌の D-アミノ酸トランスアミナーゼを精製結晶化し、その酵素化学的、物理化学的諸性質を明らかにするとともにビタミン B<sub>6</sub> 酵素の立場から反応機構や補酵素の結合によるホロ酵素の形成の過程を解明したものであり、酵素化学、微生物化学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。