

氏名	こがしんじ 古賀 晋 治
学位(専攻分野)	博士 (農 学)
学位記番号	論農博第2395号
学位授与の日付	平成13年11月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Screening and enzymological studies of novel microbial enzymes useful for clinical analysis (臨床分析に有用な新規微生物酵素の探索およびその酵素化学的研究)
論文調査委員	(主査) 教授 清水 昌 教授 加藤 暢夫 教授 江崎 信芳

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は臨床分析に有用な新規微生物酵素の探索およびその酵素化学的研究に関するものである。本研究においては胆道関連の病気の指標となる5'-ヌクレオチダーゼの活性測定に有用なヌクレオシドオキシダーゼ (NOD), 生体成分の測定にさまざまなオキシダーゼと共役して用いられるペルオキシダーゼ (POD), また, さまざまなリン酸化酵素と共役して用いることにより新規な測定系の構築が可能となるADP依存性グルコキナーゼ (ADP-GK) の3種類の酵素をそれぞれ微生物に発見し, その酵素化学的諸性質を解明した成果をまとめたものである。本論文は, 5章よりなり, 主な内容は以下に示すとおりである。

1. ヌクレオシドのヌクレオシド-5'-カルボン酸への酸化反応を触媒し, 過酸化水素を生成する新規なNODを *Flavobacterium meningosepticum* T-2799株の菌体内に発見し, その無細胞抽出液から本酵素を精製し, 均一な標品を得た。本酵素は分子量が約500,000で, 4つの異なるサブユニット (81,000, 69,000, 33,000, 16,000) がSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認された。本酵素はヘムタンパク質であり, また, 共有結合したFADを構成成分として含有していた。
2. NODとともに菌体内に協調的に生産される新規なPODを同菌株の無細胞抽出液から収率10.3%で均一に精製した。本酵素はカタラーゼ活性を全く示さず, 細菌の菌体内PODとしてはこれまでに報告がないユニークなものであることが判明した。本PODは, 分子量約220,000, 分子量約54,000のサブユニットからなるホモテトラマー酵素であり, サブユニットあたり1.3モルのプロトヘムを含有していた。N末端アミノ酸配列や内部アミノ酸配列も他起源由来のPODと有意な相同性を示さなかったことから, 一次構造的にも新規なPODと考えられた。
3. 本PODの発現をNODとの関連性を探る観点から解析し, 本PODは, NOD発現条件下でのみ, 対数増殖期から定常期後期にかけて協調的に生産NOD発現条件下でのみ, 対数増殖期から定常期後期にかけて協調的に生産されることが明らかとなった。一方, カタラーゼ活性はこれらとは異なり対数増殖期に特異的に上昇していた。このような両酵素の協調発現とPODの過酸化水素に対する親和性の高さから, 本PODはNOD反応により生成する過酸化水素を消去する系にて特異的な生理機能を担っていることが予想された。
4. NODを固定化したベンゾキノン含有グラファイトペースト電極を作製した。本電極を用いると, 血清中に共存する物質の影響を受けることなく, 5'-ヌクレオチダーゼの活性が簡便に測定できることが示された。また, 5'-ヌクレオチダーゼと共役させることでヌクレオチドの検出が可能なることも明らかとなった。
5. 超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* と *Thermococcus litoralis* 由来のADP-GKを均一に精製し, 酵素化学的諸性質を解明した。両酵素は基質特異性, 補酵素特異性, 至適pHおよび熱安定性等において同様な特性を示した。しかし, サブユニット組成に違いが観察され, *T. litoralis* 由来の酵素は分子量約54,000のモノマーであり, *P. furiosus* 由来の酵素は, 分子量約50,000の同一サブユニットからなるホモダイマーであった。また, これらの酵素をコードする遺伝子をクローニングし, その塩基配列を決定した。*P. furiosus* の酵素遺伝子は51,265の分子量を持つ455アミノ酸, *T. litoralis* の酵素遺伝子は53,621の分子量を持つ467アミノ酸をそれぞれコードするオープンリーディングフレームよりなっていた。両酵素は, アミ

ノ酸配列において約59%の相同性を示したが、すでに報告されている ATP 依存性キナーゼとは全く相同性を示さなかった。

論文審査の結果の要旨

臨床分析の分野では、さまざまな酵素がその特性である特異性と正確性を生かして生体成分の測定に利用されている。本論文は、生体成分の分析に有用と考えられる微生物酵素の探索、各種ヌクレオシドの酸化を触媒するヌクレオシドオキシダーゼ (NOD)、生体成分の測定にさまざまなオキシダーゼと共役して用いられるペルオキシダーゼ (POD)、およびリン酸基供与体として ADP を利用する ADP 依存性グルコキナーゼ (ADP-GK) の 3 種類の新規な酵素の発見、各酵素の酵素学的諸性質の解明、および分析・計測への利用についてまとめたものである。成果として、評価すべき点は次のとおりである。

1. 反応生成物としてヌクレオシド-5'-アルデヒド、ヌクレオシド-5'-カルボン酸および過酸化水素を生成する新規な NOD を *Flavobacterium meningosepticum* の菌体内に発見し、その無細胞抽出液より本 NOD を均一に精製し、その酵素化学的諸性質を解明した。

2. *F. meningosepticum* の無細胞抽出液よりカタラーゼ活性のない新規な POD を発見し、本酵素の酵素化学的諸性質を明らかにした。本 POD は N 末端アミノ酸配列や内部アミノ酸配列も他起源由来の POD と有意な相同性を示さなかったことから、一次構造的にも新規な POD と考えられる。また、POD に特異的な阻害剤に対する感受性も既知の POD と異なるものである。

3. 上記の POD が過酸化水素生成型 NOD と協調的に誘導生産されることを明らかにした。すなわち、POD、NOD ともにその発現に培地への Fe^{2+} の添加を必要とし、その生産は Cu^{2+} の添加により増強されることを認めた。また、NOD の生産を促進する数種のヌクレオシド誘導体が POD の生産を同時に促進することも明らかにした。

4. NOD を固定化したベンゾキノン含有グラファイトペースト電極を作製し、血清中のヌクレオチダーゼ活性の簡便測定法を開発した。

5. 2 種類の超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus litoralis* から ADP をリン酸基供与体として利用する ADP-GK を精製し、酵素化学的諸性質を解明するとともに、両酵素の構造遺伝子をクローニングし、その全塩基配列を決定した。その結果、両酵素はアミノ酸配列において約59%の相同性を示すが、いずれも ATP 依存性のキナーゼとは全く相同性を示さない新規なものであることを明らかにした。

以上のように本論文は各種ヌクレオシドの酸化を触媒する NOD、生体成分の測定にさまざまなオキシダーゼと共役して用いられる POD、およびリン酸基供与体として ADP を利用する ADP-GK の 3 種類の酵素をそれぞれ微生物から発見し、それらの酵素学的諸性質を解明するとともに臨床分析への応用が可能なことを示したものであり、応用微生物学、酵素化学、分析化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年9月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。