

【 67 】

氏名	塚 田 欣 司 つか だ きん じ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医 博 第 121 号
学位授与の日付	昭 和 38 年 6 月 25 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	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	D-Amino Acid Dehydrogenases of <i>Pseudomonas Fluorescens</i> (緑膿菌におけるD-アミノ酸脱水素酵素)
論文調査委員	(主 査) 授 授 早 石 修 教 教 山 田 肇 教 授 島 本 暉 朗

論 文 内 容 の 要 旨

ある種の細菌にD-アミノ酸酸化酵素の存在することは古くから知られていたが、その精製に関する報告はなく、現在までその酵素の性質に関しては全く不明である。当教室において最近D-トリプトファンに適応した緑膿菌(ATCC 11299B)よりD-トリプトファンからキヌレン酸を生成する無細胞抽出液をうることに成功したが、その抽出液中に、D-キヌレニンからキヌレン酸を生成する酵素の存在することが認められ、これを部分精製し、この酵素がD-トリプトファンおよび他のD-アミノ酸をも酸化しうることを認めた。本論文において、同じ緑膿菌より二つのD-アミノ酸脱水素酵素を精製分離し、この両者の間の性質の差について検討された。

D-トリプトファン、L-トリプトファン、またはグルコース培地に生育した緑膿菌を音波破碎後、11,000Xgの上澄を粗酵素液とすると、酵素活性は粗酵素液の105,000Xg一時間上澄のみに存在し、全活性のためには、105,000Xg一時間上澄部分と、その顆粒部分(沈渣)が必須であるが、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール等の色素によって顆粒部分がおきかえられることから、サイトクローム系を経てエレクトロンを酸素に渡す酵素であることが予想された。この際、比活性は、D-トリプトファン>L-トリプトファン>グルコース培地からの菌体の酵素の順に減少する。105,000Xgの上澄を酵素液とし色素を水素受容体とすると、メチレンブルーを水素受容体とする酵素がD-トリプトファンのものみに存在し、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを水素受容体とする酵素は、以上のいずれの培地に生育せるものにも認められた。メチレンブルーと反応する酵素が、D-トリプトファン適応によって特異的に生じたものと考え、この酵素を約40倍に精製した。この精製酵素には、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを水素受容体とする酵素は認められなかった。また2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを水素受容体とする酵素は、D-トリプトファン、L-トリプトファンおよびグルコースのいずれの培地の菌体からも同一の精製方法で約65倍に精製したが、この標品には、メチレンブルーを水素受容体とする酵素活性は認められない。以上の二つの酵素は、いずれも、至適 pH7~8、D-キヌレニンおよびそ

他のD-アミノ酸に対する K_m は $3 \sim 5 \times 10^{-4} M$, 金属キレート試薬, シアン, アザイド等によって影響されない。両者の補酵素は, 精製酵素の吸収スペクトルによる $450 m\mu$ におけるフラビンの吸収, 基質添加によるその吸収の還元, 蛋白を変性させ, 各種ペーパークロマトグラフィー等の挙動から, いずれも, FAD であることが示されたが蛋白部分と強固に結合している。このことは動物のD-アミノ酸酸化酵素と異なり, 特異な FAD 阻害剤に余り阻害されない。両者の酵素は, いずれも不安定で熱に対しては, メチレンブルーを水素受容体とする酵素は $50^\circ C$ 5分で完全に, また 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを水素受容体とする酵素は $50^\circ C$ 5分で80%失活する。

P-CMB に対しては, 前者は後者よりも阻害される。基質特異性に関しては, 多くのD-アミノ酸が酸化されるが, 両者についてはかなり異なった特異性を示している。

以上の結果, 緑膿菌から水素受容体を異にする二つのD-アミノ酸脱水素酵素が分離されたが, 細菌で初めて色素を水素受容体として用いることによりD-アミノ酸酸化酵素の精製に成功した。D-トリプトファン適応菌にのみ存在するメチレンブルーを水素受容体とする酵素については, 新たにフラボ蛋白が誘導されたとも考えられるが, その意義に関しては不明である。

論文審査の結果の要旨

D-アミノ酸を酸化して α ケト酸を生成する酵素については古くから FAD を助酵素とするいわゆるD-アミノ酸酸化酵素が知られている。塚田はD-トリプトファンの代謝を研究中, 緑膿菌の菌体内に2種の新しいD-アミノ酸脱水素酵素を発見したのでこれらを部分精製し, この両者の性質を検討した。

すなわち緑膿菌 (ATCC 11299B) 菌株からメチレンブルーを水素受容体とする脱水素酵素を約40倍, 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを水素受容体とする酵素を約 65倍精製した。これらの酵素はいずれも酸素と直接反応せず, 細胞内ではチトクローム系につながっている点, 従来知られているD-アミノ酸酸化酵素とは全くことなっていることが明らかにされた。この二つの酵素はいずれも至適 pH 7 ~ 8であり, D-キヌレニンその他のD-アミノ酸に対する K_m はおおよそ $3 \sim 5 \times 10^{-4}$ モルであり, 阻害剤に対する態度等も似ており, またいずれも FAD を助酵素としているが, 基質特異性, 加熱安定性にかなりの差がみられるほか, 水素受容体がことなっている点で明らかに相互にことなっており, 従来知られていない二つの新しいフラビン酵素と考えられる。

この新しい酵素の発見は今後生化学の研究分野に貢献するところ大である。よって本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認定する。