

氏 名	中 井 智 恵 子 なか い ち え こ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医 博 第 526 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 3 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	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Nonidentical Subunits of Pyrocatechase from <u>Pseudomonas arvilla C-1</u> (ブソイドモナスアルビラ C-1 より得られたピロカテカーゼの相異なるサブユニット)

論文調査委員 (主査) 教授 沼 正 作 教授 佐野晴洋 教授 早石 修

### 論 文 内 容 の 要 旨

ピロカテカーゼは、カテコールの2つの水酸基の間を開裂してシス、シスムコン酸を生じる反応を触媒する二原子酸素添加酵素である。本酵素は、唯一の補因子として三価の非ヘム鉄を含んでおり、可視部に吸収を有するため、その分光学的性質や ESR 等を用いて反応機構の研究が行なわれ、鉄が活性中心に存在し、反応に重要な役割を果していることが明らかにされてきた。

しかし、反応機構の解明には、酵素の構造を知ることが必要であるにもかかわらず、蛋白化学的手法による構造の研究は余り行なわれていない。そこで、構造研究の第一段階として Pseudomonas arvilla C-1 より得られたピロカテカーゼのサブユニット構造を検討した。

従来、本酵素は分子量90,000で酵素一分子あたり二原子の鉄を含むと報告されていたが、蛋白化学的研究を行うためには、正確な分子量値が必要であるので、現在最も信頼できる方法と言われている沈降平衡法によって検討したところ、63,000という結果を得た。この結果は、さらに、セフアデックス G-200 によるゲル濾過法によっても確認された。また鉄含量を測定すると、分子量63,000として、酵素一分子あたり、鉄一原子という結果を得た。従来のは分子量90,000という値に基づいて、求めた値なので、分子量63,000として計算すると、酵素一分子あたり鉄一原子となり、今回の測定値と一致した。

本酵素はラウリル硫酸ナトリウムあるいは、8 M尿素存在下でポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うと、2本のバンドに解離した。さらに8 M尿素を含む緩衝液を用いて、カルボキシメチルセルロースクロマトグラフィーを行うと、本酵素は、ほぼ1:1の割合で分子量30,000の $\alpha$ サブユニットと分子量32,000の $\beta$ サブユニットに分離した。 $\alpha$ と $\beta$ サブユニットのアミノ酸組成は、互いに似ているが、アスパラギン酸、アラニン、イソロイシン等においては、両者の間に差が見られ、また、2つのサブユニットのアミノ酸残基の和は、酵素全体のアミノ酸残基の数とよく一致した。これらの結果は、本酵素が相異なるサブユニット $\alpha$ と $\beta$ より成ることを示唆している。

次に $\alpha$ と $\beta$ サブユニットが相異なるポリペプチド鎖より成ることを確認するために、エドマン分解法に

よって、これらのサブユニットのN末端アミノ酸配列を調べたところ、以下の結果を得た。

$\alpha$  サブユニット : Thr-Val-Asn-Ile-Ser-His-Thr-Ala-Gln-Ile-Gln-Gln-Phe-Phe-Gln-Gln-  
(X)-(X)-Gly-Phe-Gly

$\beta$  サブユニット : Thr-Val-Lys-Ile-Ser-His-Thr-Ala-Asp-Ile-Gln-Ala-Phe-Phe-Asn-Gln-  
Val-(X)-Gly-Leu-Asx

さらに、カルボキシピプチダーゼによる消化法、トリチウムラベル法、およびヒドラジン分解法の3つの方法によって、それぞれのサブユニットのC末端残基の解析を行い、 $\alpha$ サブユニットの場合は、アラニン、 $\beta$ サブユニットの場合はグリシンと同定した。

以上の結果から、本酵素は $\alpha$ と $\beta$ の2つの相異なるサブユニット1箇所づつより成る $\alpha\beta$ の構造をもつことが明らかとなった。恐らく本酵素は、 $\alpha\beta$ と三価鉄一原子で活性単位を成しているものと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

ピロカテカーゼはカテコールからムコン酸を生成する典型的2原子酸素添加酵素である。従来本酵素は分子量9万で、たん白1分子あたり2原子の無機鉄を含むといわれていた。著者は、本酵素を *Pseudomonas arvilla* から高度に精製し、沈降平衡法とゲル濾過により分子量が6万3千であり、鉄含量はたん白1分子あたり1原子であることを明らかにした。さらに、尿素またはラウリル硫酸ナトリウム存在下でゲル電気泳動を行い、分子量3万と3万2千の2個のサブユニットにわかれることを発見し、これらのサブユニットのN末端アミノ酸配列およびC末端アミノ酸残基を同定した。以上の結果から *Pseudomonas* のピロカテカーゼは2つの異なるサブユニット1箇所づつからなる $\alpha, \beta$ 構造をもち、それに1原子の3価鉄が加わって活性単位を作っているものと結論される。

以上の研究は酸素添加酵素の構造の解明に貢献し、酵素の基本構造の研究に寄与するところが大きい。従って、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。