

氏名	江崎信芳
	え さき のぶ よし
学位の種類	農学博士
学位記番号	農博第296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	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	Studies on l-Methionine $\gamma$ -Lyase of <i>Pseudomonas ovalis</i> (シュードモナスオヴァリスのL-メチオニン $\gamma$ -リアーゼに 関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 山本龍男 教授 山田秀明 教授 栃倉辰六郎

### 論文内容の要旨

メチオニンは哺乳動物に必須な含硫アミノ酸であり、メチル基転移など代謝上重要な働きをしている。微生物によるメチオニンの生合成については多くの知見が得られているが、その代謝の酵素化学的な面はほとんど不明な状態に残されている。なかんずく、細菌によりメチオニンがメタンチオール、 $\alpha$ -ケト酪酸、アンモニアに分解する現象は古くから観察されているにもかかわらず、酵素レベルでの研究はほとんど行われていない。

本研究はこの反応を触媒する酵素、L-メチオニン  $\gamma$ -リアーゼ (メチオニナーゼ, EC 4.4.1.11) の細菌における分布を調べるとともに、最も高い活性をもつ *Pseudomonas ovalis* の無細胞抽出液から本酵素をはじめ均一状態にまで精製してその物理化学的、酵素化学的諸性質並びに触媒機構を明らかにしたものである。

均一標品を用いた研究により本酵素の分子量は約 173,000 であり、分子量 48,000 と 40,000 の相異なる 2 種のサブユニット各 2 個から構成されており、酵素 1 分子あたり 4 分子のピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を補酵素として含有していることが明らかにされた。

酵素化学的性質については次のような諸知見を得た。(a)本酵素は各種L-メチオニン類縁体の  $\alpha$ ,  $\gamma$ -脱離反応を触媒し、S-置換基に相当するチオールと、 $\alpha$ -ケト酪酸、アンモニアを生成する。(b)またL-システイン類縁体の  $\alpha$ ,  $\beta$ -脱離反応をも触媒して、チオール、ピルビン酸、アンモニアを生成する。(c)さらに本酵素はチオール化合物存在下で、 $\alpha$ ,  $\gamma$ -脱離反応の基質とは  $\gamma$ -置換反応を触媒する。(d)本酵素はセレンメチオニンに反応して、 $\alpha$ -ケト酪酸、メタンセレンオール、アンモニアへの  $\alpha$ ,  $\gamma$ -脱離反応を触媒するとともにセレンオール化合物の存在下では  $\gamma$ -置換反応を触媒することを見出し、セレン原子がセレンアミノ酸にとりこまれる機構を実証するとともに、含セレンアミノ酸の酵素的合成を可能にした。

酵素の触媒機構に関しては次のような結果を得た。前記  $\gamma$ -位の脱離反応および置換反応は、ビニルグリシンと PLP の Schiff 塩基を共通の中間体として進行する反応機構を推論し、本酵素のビニルグリシン

に対する反応性、酵素反応中の吸収スペクトルの変化、重水中での基質プロトン交換反応の NMR などを解析することによりこの反応機構の妥当性を証明した。

さらに、重水中で生成した  $\alpha$ -ケト酪酸の構造、特に重水素の取りこみ位置を質量分析ならびに NMR 解析によってより明確にした。

これらの研究結果によって従来不明の状態であったメチオニンの酵素的脱アミノ、脱チオール反応並びに PLP 関与の  $\gamma$ -脱離反応の機構が解明された。

さらに応用面から見れば本研究はメチオニナーゼを利用することにより醗酵法、化学法での生産が困難であった各種の L-型含硫および含セレンアミノ酸を能率よく合成する新しい方法を見いだしたものである。

### 論文審査の結果の要旨

細菌によりメチオニンがメタンチオール、 $\alpha$ -ケト酪酸、アンモニアに分解する現象はすでに1951年に見いだされていたが、酵素化学的立場からの研究はほとんど行われていない。

本研究はこの反応を触媒する細菌酵素、L-メチオニン、 $\gamma$ -リアーゼ（メチオニナーゼ、EC 4.4.1.11）の単離、精製、酵素化学的性質、触媒機構並びにその応用を詳細に研究したものである。

すなわち、まず細菌における本酵素活性の分布を調べるとともに最も高い活性をもつ *Pseudomonas ovalis* の無細胞抽出液から本酵素をはじめて均一状態にまで精製して、その物理化学的、酵素化学的諸性質並びに触媒機構を明らかにした。

本酵素の分子量は約 173,000 であり、分子量 48,000 と 40,000 の相異なる 2 種のサブユニット各 2 個から構成されており、酵素 1 分子あたり 4 分子のピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を補酵素として含有している。

本酵素は各種 L-メチオニン類縁体の  $\alpha$ 、 $\gamma$ -脱離反応を触媒し、S-置換基に相当するチオールとともに  $\alpha$ -ケト酪酸とアンモニアを生成する。また L-シスチン類縁体の  $\alpha$ 、 $\beta$ -脱離反応をも触媒することなどを明らかにした。

ついで動物に対する必須微量元素で硫黄とは同族のセレンを含むアミノ酸に対する作用を検討した結果、本酵素はセレノメチオニンの  $\alpha$ 、 $\gamma$ -脱離反応を触媒するとともにセレノール化合物存在下で  $\gamma$ -置換反応をも触媒することを見だし、セレン原子がアミノ酸にとりこまれる機構をはじめて実証し、併せて含セレンアミノ酸の酵素的合成法を可能にした。

触媒機構について、前記  $\gamma$ -脱離反応および置換反応は、ビニルグリシンと PLP の Schiff 塩基を共通の中間体として進行することを分光学的方法、NMR 測定などの各種手法を用いて明らかにし、不分明であったこの面の機構を究明した。

その他含硫アミノ酸の酵素的合成などの応用面を開発するなど細菌メチオニナーゼの基礎及び応用に関する詳細な研究を行ったものであり微生物化学、酵素化学、応用微生物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。