

氏 名	上 島 孝 之 うわ じま たか ゆき
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	論 農 博 第 770 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on Production of Microbial Enzymes useful for Steroid Analyses (ステロイド分析用微生物酵素の生産に関する研究)

(主 査)
論文調査委員 教 授 山 田 秀 明 教 授 中 島 稔 教 授 柄 倉 辰 六 郎

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、血清中のコレステロール及び胆汁酸の分析に利用される酵素類、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ及び 3α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを生産する微生物を検索し、これらの酵素類の生産のための培養条件、精製法及び諸性質について検討した結果をまとめたものである。

まずコレステロールオキシダーゼについて、土壌より分離した *Brevibacterium sterolicum* が本酵素を菌体外に著量に生産することを見だし、その生産の培養条件を確立し、精製、結晶化した。本酵素は分子量が約 32,500 で、FAD を補欠分子族とするフラビン酵素であり、コレステロールをはじめとして広く 3β -ヒドロキシステロイド類を酸化して、対応する 3-ケトステロイド類と過酸化水素を生成した。またコール酸及びトリトン X-100 によって基質協同効果をうけるアロステリック酵素の性質を示した。

次いでコレステロールエステラーゼについては、*Pseudomonas fluorescens* が本酵素を菌体外に生産することを見だし、その生産の培養条件を設定した。とくに本酵素の生産が、大豆かす及び大豆油を培地に添加することによって著しく促進されることを見だした。本酵素を精製し、諸性質を追求したが、本酵素は等電点が 3.8 と 4.9 の 2 つのアイソザイムより成り、両者とも分子量が約 130,000 であって、コレステロールの高級脂肪酸エステルをとくに良い基質として加水分解した。

また 3α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼについては、生産菌として *Pseudomonas putida* を土壌より分離し、その生成条件を設定した。本菌は本酵素を菌体内に生成蓄積するが、菌体抽出液より本酵素を単離し、諸性質を究明した。本酵素は分子量が約 45,000 で、 NAD^+ を補酵素とし、胆汁酸などの 3α -ヒドロキシステロイド類に高い特異性を示して脱水素した。

以上の 3 種類の微生物酵素を用いるステロイド類の定量法について検討し、これらの酵素を用いることによって血清中のコレステロール及び胆汁酸の分析が精度良くしかも簡便に行なわれることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

コレステロールは臨床検査において最も普遍的に測定されており、とくに成人病領域においては必須の検査項目である。またコレステロールの主要代謝産物である胆汁酸の測定も肝疾患の診断として重要視されている。従来これらのステロイド類の分析は化学的方法で行われていたが、精度が悪く、煩雑であるなどの欠点が指摘されており、最近はより精度が高く、簡便な酵素法に置き換えられつつある。

著者は、これらのステロイド類の分析に用いられる酵素類を生産する微生物を検索し、酵素類の生産のための培養条件、精製法及びこれらの酵素類の諸性質について検討した。

まずコレステロールオキシダーゼについては、土壌より分離した *Brevibacterium sterolicum* が本酵素を菌体外に著量に生産することを見だし、本菌の培養液より本酵素をはじめて結晶化することに成功した。本酵素は FAD を補欠分子族とする酸化酵素であり、コレステロールをはじめとして広く 3β -ヒドロキシステロイド類に作用して対応する 3-ケトステロイド類と過酸化水素を生成した。さらに本酵素がコール酸及びトリトン X-100 によって基質協同効果をうけるなどきわめて興味ある諸性質を見いだした。

次いで *Pseudomonas fluorescens* がコレステロールエステラーゼを菌体外に生産することを認め、また本菌による本酵素の生産が大豆かすや大豆油を培地に添加することによって著しく促進されることを見いだした。本酵素を精製し、その諸性質を解明したが、本酵素は等電点を異にする 2 つのアイソザイムよりなり、いずれのアイソザイムもコレステロールの高級脂肪酸エステルに高い親和性を示し、加水分解することを明らかにした。

また 3α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを菌体内に生成蓄積する *Pseudomonas putida* を土壌より分離し、本菌の菌体抽出液より本酵素を単離した。本酵素は NAD^+ を補酵素とし、胆汁酸などの 3α -ヒドロキシステロイド類を特異的に脱水素するが、とくに本酵素の活性と基質になるステロイド類の立体構造との相関関係を究明した。

最後に、上記の 3 種類の微生物酵素類の示す特性を利用することによって、血清中のコレステロール及び胆汁酸が正確に、しかも簡便に分析しうることを明確にした。

上記のように本論文はステロイド類の測定に用いられる酵素類について、それらの微生物生産の諸条件を確立するとともに、生産される酵素類の特性を解明したものであって、応用微生物学、微生物生産学、酵素化学の分野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。