

氏 名	沖 中 靖 おき なか おさむ
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 107 号
学位授与の日付	昭 和 45 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 THE DIHYDROPTEROATE-SYNTHESIZING ENZYME IN PLANTS (植物中の DIHYDROPTEROATE 合成酵素に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 岩 井 和 夫 教 授 緒 方 浩 一 教 授 満 田 久 輝

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は植物における葉酸の生合成系酵素のひとつであるジヒドロプテロイン酸合成酵素についてその酵素的諸性質、反応機構およびサルフェ剤による阻害について詳細に検討した結果をとりまとめたものである。

本酵素はプテリン供与体とパラ・アミノ安息香酸（以下 PABA と略す）とからジヒドロプテロイン酸（以下 H_2Pte と略す）を生成する反応を触媒するが、発芽エンドウの無細胞抽出液を酵素液として用いた場合には 6—pyrophosphorylmethyldihydropterin（以下 $H_2Pterin-CH_2OPP$ と略す）がプテリン供与体として最も有効であることを明らかにした。またこの酵素反応において PABA-7- ^{14}C を基質に用いると H_2Pte にとり込まれるので、その放射能を測定することによって本酵素の活性を迅速正確に定量する radiossay を確立した。この測定法を用いて植物における本酵素の分布を検討したところ、とくに緑葉部に高活性であった。また発芽 1 日目のエンドウおよびダイズを用いて本酵素の細胞内分布を検討しミトコンドリア画分に局在することを見出した。

つぎに本酵素を発芽エンドウの抽出液から硫酸分別し、DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex および Sephadex G-200 のカラムクロマトグラフ法によって精製しクロマトグラフ的および超遠心的に均一な酵素標品を単離した。この酵素標品は $H_2Pterin-CH_2OPP$ を基質して特異的に利用したが、ATP を添加すると 6—hydroxymethyldihydropterin（以下 $H_2Pterin-CH_2OH$ と略す）も利用し、その K_m 値はそれぞれ $1.14 \times 10^{-5}M$, $1.33 \times 10^{-5}M$ であった。また PABA に対する K_m 値は $1.11 \times 10^{-6}M$ であった。その反応至適 pH は 8.8 であり、PCMB および Cu^{2+} , Hg^{2+} などの重金属イオンによって阻害された。

本酵素の反応機構を ATP- γ - ^{32}P を用いて検討し、 $H_2Pterin-CH_2OH$, Mg^{2+} の存在下で反応させると ATP の放射能は酵素画分に見出されたが、これに PABA を加えて反応させると H_2Pte が生成するとともに PPi が遊離され、ATP からは AMP が生成されることを認めた。したがって $H_2Pterin-CH_2OH$ は ATP の存在のもとで本酵素の作用によってまず $H_2Pterin-CH_2OPP$ になるが、これは酵素との複合

体として存在し、ここに PABA が共存すれば H_2Pte を生成して遊離するものと考えた。これらの結果から本酵素は系統名を 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridine : p-aminobenzoate ligase (AMP) とするのが適当であろうと結論した。

また本酵素の作用はサルファ剤によって特異的に阻害されたが、その阻害は PABA に対して拮抗的であり、本酵素に対する種々のサルファ剤の K_i 値は *E. coli* を用いた *in vivo* の抗菌試験の結果と相対的な値を示すことが認められた。

論文審査の結果の要旨

ジヒドロプテロイン酸（以下 H_2Pte と略す）は抗貧血性ビタミンのひとつとして知られている葉酸の生合成における中間体とみなされている化合物であって、dihydropteroate-synthesizing enzyme はプテリン供与体とパラ・アミノ安息香酸（以下 PABA と略す）とからこの H_2Pte を生成する反応を触媒する酵素である。これまでこの酵素に関する研究はきわめてすくなく、とくに精製した酵素を用いての研究はなかった。その理由のひとつは、本酵素活性の測定法として乳酸菌を用いるバイオアッセイ以外にはなく、簡易迅速な測定法がなかったことである。著者はまず PABA-7- ^{14}C を用いる本酵素活性の迅速正確な radioassay を確立してその有用性を実証した。つぎにこの測定法を応用して本酵素の精製を行ない、発芽エンドウからはじめてクロマトグラフ的ならびに超遠心的に均一な酵素を単離することに成功した。そしてこの酵素標品を用いてその酵素的諸性質、反応機構に関して詳細に検討した。その結果、本酵素は系統名として 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxy-methyldihydropterine : p-aminobenzoate ligase (AMP) と呼ぶべき性質を有することを明らかにした。またサルファ剤による本酵素の阻害についても詳細に検討し、その機構のひとつを解明した。

このように本論文は植物における葉酸の生合成に関与する酵素の酵素的諸性質ならびに作用機構を明らかにしたものでビタミン学、酵素学および植物生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。