

氏 名 城 戸 俊 子
学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 論 農 博 第 709 号

学位授与の日付 昭 和 52 年 5 月 23 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 **ENZYMOLOGICAL STUDIES ON METABOLISM OF
ALKYL NITRO COMPOUNDS BY YEASTS**
(酵母によるアルキルニトロ化合物代謝の酵素学的研究)

論文調査委員 (主査)
教 授 山 本 龍 男 教 授 森 田 雄 平 教 授 山 田 秀 明

論 文 内 容 の 要 旨

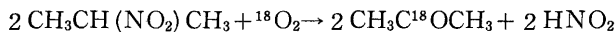
自然界にはクロラムフェニコール、ピロールニトリンなど生理活性を示す多くのニトロ化合物の存在が知られている。またニトロアルカンを始めとする各種のニトロ化合物は工業的にも広く使用され、環境浄化の面からも大きな問題になっている。しかし、これらにトロ化合物の代謝、特にその酵素化学的側面はほとんど不分明の状態にある。本研究は微生物によるニトロアルカンの代謝経路を解明し、これに関与する酵素を精製してその性質と反応機構を解明することを目的としている。その主な内容は次のようである。

1. 各種微生物についてニトロアルカン特にニトロエタンに対する単一窒素源としての資化性を検索したところ、*Hansenula* 属酵母が高い資化能を示した。ニトロエタンを良好に資化するとともにその無細胞抽出液中に最も高いニトロアルカン分解活性が存在する *Hansenula mrakii* (IFO 0895) を選び以下の酵素化学的研究を行った。

2. 本酵素は DEAE-セルロース、Bio-gel P-150 カラムクロマトグラフィーなどにより約1,300倍に精製され、超遠心法、ディスク電気泳動法によりその均一性が確認された。本酵素の分子量は約62,000であり、また分子量39,000と25,000の2種のサブユニット各1個から構成されている。また補欠分子族としては酵素1モルあたり、1モルの FAD と1グラム原子の非ヘム鉄を含んでいる。基質特異性について検討したところ2-ニトロプロパンに対して最も強い酸化作用を示し、そのほかニトロエタン、1-ニトロプロパン、3-ニトロ-2-ペンタノールなども基質となるが、ニトロメタン、テトラニトロメタンや芳香族ニトロ化合物は酸化されない。

3. 2-ニトロプロパンを基質にした際の反応の化学量論的關係から、本酵素は1モルの酸素を吸収して2モルの2-ニトロプロパンを酸化するとともに2モルのアセトンと亜硝酸が生成することが明らかにされた。過酸化水素の生成は全く認められない。 $^{18}\text{O}_2$ 存在下での実験により分子状酸素のアセトンへの取り込みが証明された。すなわち本酵素は次の反応を触媒する酸素添加酵素であり、酸素分子の2

個の原子が共に同一の受容体各1分子に取り込まれる点でユニークな分子間2原子酸素添加酵素である。



4. 2—ニトロプロパンを用いた反応の反応速度論的研究より、本酵素反応はいわゆる Ordered Bi Bi 機構によって、次のような機序で進行することが証明された。



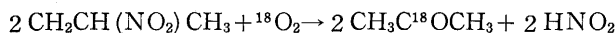
5. 本酵素反応はスーパーオキシドディスムターゼ、チトクローム *c*、エピネフィリン、NADH などによって阻害される。また阻害反応中に起るチトクローム *c* の還元やエピネフィリン、NADH の酸化がスーパーオキシドディスムターゼの添加によって阻害されることから反応中に O_2^- が生成することを証明した。

またスカベンジャーとして作用する NADH が本酵素と結合して反応中間体を生成することを分光学的に確認するとともに、生成する O_2^- と NADH の反応はほぼ立体特異的に起ることをも実証している。

論文審査の結果の要旨

本論文の主題は微生物によるニトロアルカンの代謝、特にその酵素化学的側面の解明である。

著者はまずニトロエタンなどのニトロアルカンを窒素源として生育する各種微生物を検索して、*Hansenula*, *Penicillium* などに属する数種の酵母とカビが高い資化性を示すことを明らかにした。ニトロエタン培地に特に良好な生育を示した *Hansenula mrakii* (IFO 0895) の無細胞抽出液から次式の反応を触媒する酸素添加酵素を見出した。



本反応では1モルの酸素分子から1原子ずつが同一の基質（酸素の受容体）2モルに取りこまれる。

この点でも本酵素は新しいタイプの分子間2原子酸素添加酵素である。

本酵素を均一タンパク質にまで精製し、その酵素化学的あるいは物理化学的性質を詳細に研究した。

すなわち、分子量は約62,000で補欠分子族として酵素1モルあたり1モルのFADと1グラム原子の鉄を含有する。本酵素は2—ニトロプロパン、ニトロエタン、1—ニトロプロパンなどのニトロアルカンの酸素添加反応を触媒するが、ニトロメタン、テトラニトロメタン、芳香族ニトロ化合物は基質とはならない。反応速度論的研究により本酵素反応は Ordered Bi Bi 機構により進行することを証明した。また本酵素反応はスーパーオキシドディスムターゼ、エピネフィリン、チトクローム *c* の添加により阻害されることなどから本酵素反応における O_2^- の生成を証明するなど、酸素添加酵素の立場からも種々の興味ある結果を得ている。

さらに、スカベンジャーとして 4*R*-[4- ^3H] NADH, 4*S*-[4- ^3H] NADH を用いた実験を行い、本酵素に結合する NADH と O_2^- との反応では NADH のプロー*R*のHが移動する、いわゆるA型の立

体特異性が完全ではないが存在することをも明らかにしている。

以上のように本論文はこれまでほとんど未開拓の状態にあった微生物によるニトロアルカンの代謝とこれに關与する酵素について多くの新しい知見を得たものであり，微生物化学，酵素化学に貢獻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。