

氏 名 池 田 精 一 郎
いけ だ せい いち ろう
 学位の種類 工 学 博 士
 学位記番号 論 工 博 第 743 号
 学位授与の日付 昭 和 49 年 11 月 25 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 Immobilized Vitamin B₆ Enzymes**
 (固定化ビタミンB₆酵素に関する研究)

(主 査)
 論文調査委員 教 授 福 井 三 郎 教 授 河 西 三 省 教 授 松 浦 輝 男

論 文 内 容 の 要 旨

ビタミン B₆ 酵素は共通して補酵素型ビタミン B₆ (pyridoxal 5'-phosphate, 略称 PLP) を活性中心とし種々のアミノ酸の多様な変化を触媒する。本論文はビタミン B₆ 酵素の代表的な数種をはじめて固定化し、それらの構造と機能に関する理論的研究とアミノ酸の定量あるいは生産に応用した研究をまとめている。

第1部では PLP をその 6 位, ピリジン環窒素又は 3 位の水酸基を介して共有結合法で不溶性担体のセファロースに固定化する方法と、得られた 3 種類の不溶性 PLP の性質を詳細に調べた結果とをまとめている。これら不溶性 PLP は、種々のビタミン B₆ 酵素のアフィニティ・クロマトグラフィーによる精製ならびに補酵素・アポ酵素間の特有の親和性に基づく固定化法にきわめて有用であることを明らかにしている。

第2部ではそれぞれ L-トリプトファン, L-チロシン又はこれらの誘導体の可逆的分解反応を接触する細菌のトリプトファナーゼ, β -チロシナーゼを、第1部で調製したセファロース結合 PLP を用いて、あるいは活性化セファロースに直接又は適当な長さの側鎖を介して固定化し、それぞれの方法の固定化率、得られた固定化酵素の活性、物理的及び化学的性質を比較している。その結果、4 個のサブユニット構造を持ち 4 つの活性中心を有するトリプトファナーゼでは、PLP の 6 位を介してセファロースと結合させた不溶性 PLP (SP-A) を用いて 1 つのサブユニットの活性中心のリジン残基とシッフ塩基を形成せしめたのち還元して固定化する方法が最も優れており、2 個の活性中心しか持たない β -チロシナーゼでは活性化セファロースと直接に反応させるのが最も有利であることを確認した。

このようにして調製した固定化トリプトファナーゼ及び β -チロシナーゼは共に熱安定性、変性剤にたいする抵抗性、保存性などが遊離状態の酵素よりも優れ、生化学反応の触媒として有用であることが明らかにされた。

第3部では固定化トリプトファナーゼ、固定化 β -チロシナーゼを用いて、ピルビン酸、アンモニウム

イオン，インドール又はフェノールあるいはそれらの誘導体を原料とする L-トリプトファン，L-5-ヒドロキシトリプトファン，L-チロシン，L-ドーパなどの重要な生理活性アミノ酸の簡便な生産法を確立している。

トリプトファナーゼ， β -チロシナーゼは共に補酵素 PLP との結合能が弱く，固定化酵素をカラムに充填して連続酵素反応の固相触媒として用いる場合も PLP の解離による活性の低下が起こるが，固定化された酵素たん白はきわめて安定であった。従って PLP を補足した反応原料を適当な流速で固定化酵素カラムに通すことにより，上記のアミノ酸類がきわめて高収率で容易に合成されることを示した。

第4部では固定化酵素を用いるアミノ酸の微量定量を取り扱っている。即ち，固定化トリプトファナーゼを用いた L-トリプトファンを定量的にインドールに変化させることにより発色試薬にたいする感度が著しく向上することを利用して，L-トリプトファンの微量定量法を設定し，さらにトリプトファナーゼと乳酸脱水素酵素を組合せて固定化したカラムを用いて，L-トリプトファンから生じたピルビン酸が乳酸に変化せしめられるのに伴う還元型ピルビン補酵素の 340nm の吸収値の減少を追跡することにより，より高感度かつ特異性の優れた定量法を確立した。また L-アスパラギン酸の定量法として，固定化アスパラギン酸アミノトランフェラーゼ (AAT) 及び固定化 AAT・リンゴ酸脱水素酵素のカラムを用いる方式を設定した。

第5部は酵素の構造と機能の関係を，固定化により解明することを企てたものである。*Pseudomonas dacunhae* のアスパラギン酸 4-脱炭酸酵素は16個のサブユニットから成り，適当な処理により，サブユニット 8 個又は 2 個からなる中間状態に解離するが，活性の測定条件では容易に会合して元の状態に戻るので，中間状態の構造の持つ活性を試験管内で測定することは不可能であった。本研究では中間状態のサブユニット会合体を適当な距離をへだてて不溶性担体に結合させ再会合を防いで活性を調べることにより，8 個のサブユニット会合体では16個のサブユニット会合体の約60%の活性を持ち 2 個のサブユニット会合体はもはや酵素活性を示さないことを明らかにした。

またトリプトファナーゼのアポたん白と補酵素 PLP との結合及び解離の動力学的研究を，固定化トリプトファナーゼのカラムを用いることにより，従来方法よりもはるかに簡便かつ正確に行なうことができることを示した。

論文審査の結果の要旨

生化学反応を接触する酵素は，きわめて優れた触媒であるが不安定であり，水溶性であるために反応生成物と分離しにくく，くりかえし使用することが困難であるなどの欠点がある。これらの欠点を除く手段として，酵素を不溶性担体に適当な方法で固定化し，安定性及び取り扱いの容易さを高めることが最近注目されている。固定化酵素として既に実用化されているものもあるが，これまでの報告はすべて比較的単純な構造を持つものに限られている。

本論文は種々のアミノ酸類の多様な生化学反応を触媒し，共通して補酵素型ビタミン B₆ (PLPと略称) を活性中心とするビタミン B₆ 酵素の代表的な数種を固定化し，構造と機能に関する理論的研究を行なうとともに，アミノ酸の微量定量や簡便かつ高能率な合成への応用に成功した成績をまとめたものである。

得られた成果の主なものは次の通りである。

(1) 3種類の不溶性 PLP を、PLP 分子の 6 位、ピリジン環窒素、又は 3 位につく水酸基を介して適当な反応性側鎖を持つ高分子担体と共有結合せしめることにより調製した。これら 3 種の不溶性 PLP は補酵素活性の発現に必要な性質を維持し、種々のビタミン B₆ 酵素と個々の相互作用を示しアフィニティ・クロマトグラフィーによる精製ならびに固定化に応用できることを確認した。

(2) それぞれ L-トリプトファン、L-チロシンの可逆的 α , β -脱離反応を触媒する細菌トリプトファナーゼ、 β -チロシナーゼを固定化し、高次構造と固定化による性質の変化との関係を明らかにした。また優れた性能を持つ固定化酵素を調製し、これらのアミノ酸の簡便かつ特異性の高い微量定量法を考案した。さらに、ピルビン酸、アンモニウム・イオン、インドール又はフェノールあるいはそれらの誘導体から、連続酵素反応による L-トリプトファン、L-5-ヒドロキシトリプトファン、L-チロシン、L-ドーパなどの製造法を確立した。

(3) 複雑なサブユニット構造を持つアスパラギン酸・4-デカルボキシラーゼの構造と活性の研究と、トリプトファナーゼなどの補酵素と酵素たん白間の結合ならびに解離の動力学的解析を、固定化酵素を用いることにより、巧妙に行なった。

以上を要約すれば、本論文は複雑な構造を持ち生命現象に重要な役割を演じるビタミン B₆ 酵素類をはじめて固定化し、構造と機能の関する興味深い研究を行なうとともに、生理的に重要なアミノ酸類及びその誘導体の簡便かつ能率の良い定量法ならびに製造法を設定したものであり、学問上ならびに実用上寄与するところが少なくない。よって、本論文は工学博士の学位論文として価値あるものと認める。