

氏 名	徳 重 正 信 とく しげ まさ のぶ
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	論 理 博 第 186 号
学位授与の日付	昭 和 42 年 3 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	On the Role of Pyridoxal Phosphate for AMP-dependent Threonine Deaminase of <i>Escherichia Coli</i> (大腸菌のAMP依存性スレオニン脱アミノ酵素におけるピリドキサルリン酸の役割に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 田 中 正 三 教 授 波 多 野 博 行 教 授 加 治 有 恒

論 文 内 容 の 要 旨

酵素の中には、その基質と化学構造において類似性の乏しい化合物によって、触媒反応が促進されたり抑制されたりするものがある。この現象はアロステリック制御と呼ばれ、この種の酵素に関する研究は、代謝の調節機構の解明との関連においてとみに重要性を増しつつある。

大腸菌は二つのスレオニン脱アミノ酵素を生産することが知られている。この二種の脱アミノ酵素は、ともにピリドキサルリン酸を補酵素とするものであるが、その一つは構成酵素でイソロイシンによって阻害され、他の一つは嫌氣的条件下で生産される誘導酵素で、アデノシンーリン酸 (AMP) で活性化されるアロステリック酵素である。

申請者は、まず、参考論文その 1 において、後者の酵素に対する AMP の効果について詳細な研究を行ない、この酵素は AMP の共存下で分子量およそ 7 万 5 千の単量体が二量体に会合することにより、熱や水銀剤処理による失活から保護され、酵素反応の速度が著しく増すことを認めている。

主論文においては、さらに、この酵素について補酵素のピリドキサルリン酸の役割に関する詳細な研究を行ない、ピリドキサルリン酸が単に触媒作用の補助因子として働くだけでなく、AMP とは別な部位で酵素タン白と結んで高次構造の維持に役立っていることを明らかにしている。

すなわち、アミノ酸培地に嫌氣的に培養した大腸菌を超音波処理して酵素抽出液をつくり、安定化剤として AMP と β -Mercaptoethanol とを添加したのち、順次ストレプトマイシン処理、硫安分画 Sephadex G-200 によるゲル濾過、DEAE-Sephadex を用いるカラムクロマトグラフィーを行なって原酵素抽出液の 125 倍の活性をもつスレオニン脱アミノ酵素をえた。この精製酵素は、ピリドキサルリン酸の特徴である $404\text{ m}\mu$ に極大吸収をもち、また、 $420\text{ m}\mu$ の光線で励起すると $510\text{ m}\mu$ の螢光を発した。つぎに低温でヒドロキシラミンを加えて放置し、結合しているピリドキサルリン酸を除去してアポ酵素をえた。これを用いてピリドキシン群化合物による活性の回復をしらべたところ、ピリドキサルリン酸が最も強く、ピリドキサミンリン酸ではピリドキサルリン酸の約 26% の活性が認められたが、ピリドキサル・ピリドキ

サミンおよびピリドキシンは無効であった。また、このアポ酵素は極めて不安定で、0°C で20分間に完全に失活するが、ピリドキサルリン酸の添加によって或程度安定性を増し、ピリドキサルリン酸と AMP の両者を加えると、さらに安定性が増大することを認めた。しかし、AMP 単独添加ではホロ酵素の場合と異なり、ほとんど保護効果が認められなかった。また、この酵素に対するタンパク分解酵素の作用が、ピリドキサルリン酸や AMP の添加によって如何に影響されるかについてしらべ、ホロ酵素に対して AMP は強い保護効果を示したが、ピリドキサルリン酸の添加は無効であった。アポ酵素に対しての実験は、アポ酵素自身が不安定のために成功しなかった。

以上の結果から、申請者は大腸菌の AMP—依存性スレオニン脱アミノ酵素はピリドキサルリン酸を補酵素とする酵素であるが、ピリドキサルリン酸は多くのピリドキサル酵素に認められるように、単に触媒反応の補助因子として役立つだけでなく、アポ酵素の安定化からもうかがえるように酵素タンパクの高次構造の維持にも関係しており、この酵素に対し、アロステリック効果をもつ AMP とは異なった機構で酵素の安定化に寄与していると結論している。

参 考 論 文

その1. 主論文の前報である。

その2. *Clostridium tetanomorphum* のスレオニン脱アミノ酵素に対する ADP の活性促進効果について研究したものである。

その3. *Clostridium tetanomorphum* のスレオニン脱アミノ酵素に対するさらに詳細な研究で、ADP による活性化が、この酵素の触媒作用で生ずる遊離エネルギーの受容体として役立つことに起因することを明らかにしたものである。

その4. ATP によってアロステリックな活性化をうける鼠肝のコカルボキシラーゼ水解酵素がヌクレオシドジホスファターゼの活性をも有し、この作用も ATP によって活性促進をうけることを明らかにした研究である。

その5. ブタ腎のグリコール酸酸化酵素について、その精製、補酵素の決定、この酵素によるグリコール酸の分解経路などについて研究したものである。

その6. β -ケト酸のヒドラゾンがその融点以下の温度で定量的に脱炭酸されることを見出し、これを代謝産物中のケト酸の分析に利用した研究である。

その7. ケト酸の分析法として、そのヒドラゾンの示すニッケル反応と熱異性化現象とを利用することを研究したものである。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

基質と類似性の乏しい化学構造をもつ化合物によって、それが営む触媒反応が著しい影響をうける、いわゆる、アロステリック酵素は、代謝の調節機構の解明に重要な関連をもつものとして注目され、新知見の増加が要望されている。

申請者の研究は、主論文・参考論文を通じて、ほとんどがアロステリック制御をうける酵素に関するものであり、主論文は、大腸菌の生産する二種のスレオニン脱アミノ酵素のうち、嫌気的条件下で生産され

る誘導酵素型の酵素についての研究である。申請者は、まず、参考論文その1において、この酵素が AMP によって活性化されるアロステリック酵素であり、この AMP の作用は分子量約 7 万 5 千の単量体のタンパク質を二分子会合させる役割をもち、その結果酵素反応の速度増加や熱・水銀剤などによる失活からの保護に役立つことを明らかにしている。主論文では、さらに、このスレオニン脱アミノ酵素についての詳細な研究を行ない、まず、酵素の安定化と精製とに成功をおさめたのち、この酵素がピリドキサルリン酵素であることを種々の実験によって証明している。特に、ヒドロキシラミン処理によって補酵素であるピリドキサルリン酸を除去したアポ酵素について詳しい研究を行ない、このアポ酵素は極めて不安定で 0°C、20 分で完全に失活するが、ピリドキサルリン酸の添加で活性化されるだけでなく、安定性も著しく増大することを確認している。AMP はこのアポ酵素の安定化には効果がないが、ホロ酵素には強い保護作用を示し、特にタンパク分解酵素の作用に対しての AMP の保護効果は顕著であるが、ピリドキサルリン酸はこの場合には効果がなかった。

これらの結果から申請者は、このスレオニン脱アミノ酵素においては、多くの他のピリドキサル酵素と異なり、ピリドキサルリン酸はただに触媒反応の補助因子としての役割をもつだけでなく、AMP とは異なる機構によって酵素タンパクの高次構造の維持に関係し、その安定化に寄与していると結論している。

補酵素が触媒反応の補助因子以外の役割をもつことが明らかとされた酵素の例は未だ極めて少なく、申請者の研究はアロステリック酵素の新しい一つのタイプとして貴重な知見を加えたものとして高く評価することができる。また、参考論文の多くがアロステリック酵素に関する優れた研究であり、申請者が生化学特に酵素化学における広い学識をもつことがうかがえる。

主論文・参考論文を併せて申請者徳重正信の論文は理学博士の学位論文として価値があるものと認める。