

氏 名	藤 沢 仁 ふじ さわ ひとし
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医 博 第 343 号
学位授与の日付	昭 和 43 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	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Protopocatechuate 3, 4 —Dioxygenase Crystallization and Characterization (プロトカテキン酸 3, 4 二原子酸素添加酵素 結晶化と性質)
論文調査委員	(主 査) 教 授 早 石 修 教 授 島 本 暉 朗 教 授 沼 正 作

論 文 内 容 の 要 旨

酸素添加酵素は分子状酸素を有機物中にとり込む反応を触媒し、生体必須物質例えばアミノ酸、脂質、ホルモン、ビタミン、血色素などの代謝や薬物毒物の代謝解毒に重要な役割を果たしている。

カテコール体のベンゼン核を分子状酸素の添加と共に開裂する酸素添加酵素はいずれも唯一の補酵素として非ヘム鉄を含んでおり、カテコール体の開裂位置により水酸基をもつ炭素原子間で開裂する型と、水酸基をもつ炭素原子とそのとなりの水酸基をもたない炭素原子の間で開裂する型の2つの酵素群に分類される。しかし酵素中の鉄の荷電状態は前者では3価、後者では2価であることが見出され、酵素反応における鉄の役割と分子状酸素の活性化の機構は特に興味を集めてきた。

プロトカテキン酸3, 4 二原子酸素添加酵素はプロトカテキン酸を水酸基をもつ炭素原子間で開裂しβ-カルボキシムコン酸を生ずる反応を触媒する酵素であるが、3価鉄型酵素として初めて結晶化に成功し純粋蛋白として得ることができたのでその諸性質について研究した。

酵素源として Enrichment Culture 法で分離した緑膿菌を用い、その音波破碎液より酵素を約30倍精製し超遠心的、電気泳動的に均一な結晶蛋白として得た。

本酵素の分子量は沈降係数 19.4×10^{-13} (cm/sec)、拡散係数 2.5×10^{-7} (cm²/sec) 及び偏比容 0.729 (ml/g) より約70万と計算され、他の酸素添加酵素に比べて非常に巨大な分子であった。

本酵素は3価鉄型酵素に特有な深紅色を呈し 450mμ 附近に極大吸収を 400mμ より 600mμ 附近にかけて幅広い吸収を示し、蛋白以外の唯一の成分として1分子当り約7グラム原子の非ヘム鉄を含んでおり、この可視部の吸収は鉄に由来するものと考えられる。

アミノ酸分析により本酵素のアミノ酸組成を決めたが酵素1分子当り約95分子の半シスチンを含んでおりその中システイン総数は55分子、遊離システインは約12分子と定量され他の酸素添加酵素に比べその数は非常に多い。一方本酵素はメルカプトエタノールのような -SH 保護剤もしくはヨードアセトアミドのような -SH 阻害剤の存在下でのみ硫酸添加により結晶化し、-SH 剤のない場合には酵素の重合がおこり

結晶化が妨げられた。従って酵素中に存在する多数のシステイン残基の幾つかは酵素の重合に関与していると考えられる。

本酵素は従来報告されていたものよりはるかに広い基質特異性をもちカテコールなど幾つかのカテコール体を分解し、プロトカテキンアルデヒドなど数種のカテコール体は拮抗的阻害剤となった。反応の至適 pH は 8.0 附近、酸素に対する k_m は $4.5 \times 10^{-5} M$, プロトカテキン酸に対する k_m は $3.0 \times 10^{-5} M$ であった。

本報ではプロトカテキン酸 3, 4 二原子酸素添加酵素を純粋な結晶蛋白として多量にしかも簡単な精製方法で得ることを報じ併せてこの酵素蛋白の基礎的な性質を報告した。既に結晶蛋白として得られている 2 価鉄型酵素であるメタピロカターゼと並び酸素添加酵素の反応機構解明のために極めて有用な材料を提供したのと考えられる。更に 2mm の大きさの結晶が得られたことは非ヘム鉄をもった酸素添加酵素を単結晶として X 線解析, ESR などの物理学的研究の対象となることを可能にしたもので活性中心の非ヘム鉄の機能及び酸素の活性化の研究に役立てたい。

論文審査の結果の要旨

本論文は典型的な二原子酸素添加酵素を簡単な方法で多量に精製し、さらに 3 価鉄型酵素としてはじめて結晶化に成功し、酵素の基礎的な性質について研究したもので、酸素添加酵素の研究、ひいては生体酸化の研究に大きく貢献するものである。

著者はプロトカテキン酸 3, 4 - 二原子酸素添加酵素を緑膿菌から精製し、超遠心的、電気泳動的に均一な蛋白とし結晶化に成功した。本酵素の分子量は沈降係数 19.4×10^{-13} (cm/sec), 拡散係数 2.5×10^{-7} (cm²/sec) および偏比容 0.729 (ml/g) より 70 万と計算され、他の酸素添加酵素に比べ非常に巨大な分子であった。本酵素は 3 価型酵素に特有な深紅色を呈し、450m μ 付近に極大吸収を、400m μ より 600m μ 付近にかけて幅広い吸収を示し、蛋白以外の唯一の成分として 1 分子当り約 7 グラム原子の非ヘム鉄を含んでおり、この可視部の吸収は鉄に由来するものと考えられる。また本酵素のアミノ酸組成、基質特異性等に関する詳細な研究を行なった。

よって本論文は学術上有益にして医学博士の学位論文として価値あるものと認定する。