

氏 名	吉 田 元 よし だ はじめ
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	農 博 第 217 号
学位授与の日付	昭 和 50 年 7 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 Tryptophanase from <i>Proteus rettgeri</i> (<i>Proteus rettgeri</i> のトリプトファナーゼに関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 山 田 秀 明 教 授 緒 方 浩 一 教 授 森 田 雄 平

論 文 内 容 の 要 旨

本論文はトリプトファナーゼを用いる L-トリプトファン¹の製法の基礎的条件を確立することを目的として、本酵素のもっとも強力な生産菌である *Proteus rettgeri* の生産するトリプトファナーゼの物理化学的性質や触媒的性質について検討した成果をまとめたものであり、内容はつぎの2つに大別される。

1. L-トリプトファンを含む半合成培地に生育した *Proteus rettgeri* の菌体抽出液より本酵素を精製し、補酵素であるピリドキサルリン酸 (PLP) とグリセロールの存在下で硫安を添加することによってホロ酵素を、PLP とグリセロールの非存在下で硫安添加によってアポ酵素を、それぞれ結晶化することに成功した。これらの結晶標品を用いて、本酵素の物理化学的性質を検討し、分子量は200,000~220,000 daltons で、4個の同一サブユニットからなること、さらにアミノ末端アミノ酸やアミノ酸組成などを明らかにした。また PLP は各サブユニットの1個のリジン残基の ϵ -アミノ基に1個ずつ結合して活性を発現することを明確にした。なおホロ酵素、アポ酵素およびアポ酵素から再構成したホロ酵素を用いて、5,5'-ジチオオービス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) 法により酵素たんぱく質中の遊離の SH 基を滴定した結果、ホロ酵素からはサブユニット1個あたり1個が、アポ酵素と再構成したホロ酵素からは2個が滴定され、アポ酵素と再構成したホロ酵素においてのみ触媒活性の著しい低下が観察された。

2. 上記の結晶標品を用いて、本酵素の触媒的性質について検討し、本酵素が L-トリプトファンをピルビン酸、アンモニアおよびインドールに分解する反応のみならず、L-システイン、L-セリンなどのアミノ酸を分解する反応、これらのアミノ酸とインドールから L-トリプトファンを生成する反応、さらにピルビン酸、アンモニアとインドールから L-トリプトファンを合成する反応を触媒することを明らかにした。この合成反応において、5-メチル-, 5-ヒドロキシ-, 5-アミノ-インドールなどのインドール誘導体は、インドールにおきかわって基質となり、それぞれ5-メチル-, 5-ヒドロキシ-, 5-アミノ-L-トリプトファンなどの L-トリプトファン類縁アミノ酸を合成することを明らかにした。また、上記の分解、置換、合成の3種の反応について、至適 pH、基質や阻害剤の動力学的パラメータ (V , K_m , K_i) を詳細に測定する

とともに、動力学的解析や分光学的測定の結果からこれらの反応機構を考察し、これらの反応が酵素-アミノアクリル酸複合体を共通の反応中間体として進むことを推定した。

論文審査の結果の要旨

L-トリプトファンはきわめて重要なアミノ酸であり、広い範囲での利用が注目されている。現在、主として化学的合成法によって製造されているが、最近、微生物のトリプトファナーゼを用い、インドール、ピルビン酸とアンモニアより合成する方法が開発され、工業的意味での発展が期待されている。

著者は、このトリプトファナーゼを用いる L-トリプトファンの製法の基礎的条件を確立することを目的として、本酵素の生産菌である *Proteus rettgeri* の菌体抽出液より本酵素を精製し、ピリドキサルリン酸 (PLP) とグリセロールの存在下でホロ酵素を、非存在下でアポ酵素を、それぞれ結晶化することに成功した。従来、トリプトファナーゼの精製は、*E. coli* などで行われてきたが、ホロ酵素が結晶として得られたのは、本研究が最初の例である。これらの結晶標品を用いて、本酵素の分子量、サブユニット構造、PLP と酵素たんぱく質の相互作用などを究明した。とくに PLP の酵素からの解離にともなって、酵素たんぱく質の conformation に不可逆的な変化が生ずることを明らかにしたが、これは本酵素において PLP は反応のみならず酵素の構造の保持にも関与していることを示すものである。

ついで著者は、本酵素の触媒的性質について追究し、本酵素が L-トリプトファンなどのアミノ酸の分解反応、置換反応、さらに比較的高濃度のピルビン酸とアンモニアの存在において、インドールやその誘導体から L-トリプトファンやその類縁アミノ酸を合成する反応をも触媒することを見いだした。このことは従来不可逆であると考えられていたトリプトファナーゼ反応が、可逆反応であることを明確にしたものである。またこれらの3種の反応について、詳細な動力学的解析を行うとともに、反応機構について PLP 酵素の立場から考察している。

以上のように本論文はトリプトファナーゼの酵素学的研究に新しい知見を加えたものであり、応用微生物学および酵素化学に寄与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。