

氏 名	竹 尾 漢 治
	たけ お かん じ
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 164 号
学 位 授 与 の 日 付	昭 和 44 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Existence and Properties of Two Malic Enzymes in Escherichia coli—Especially of NAD-linked Enzyme (大腸菌の二種のリンゴ酸酵素の存在及びそれらの性質—とくに AND要求性酵素について)

(主 査)
論文調査委員 教授 香月裕彦 教授 波多野博行 教授 由良 隆

論 文 内 容 の 要 旨

リンゴ酸の酸化的脱炭酸を触媒するリンゴ酸酵素は、NADP 要求性のものと NAD 要求性のものとが知られている。前者は生物界に広く分布するが、後者はこれまでリンゴ酸培地などに生育させた乳酸菌や、ある種の酵母から証明されていたにすぎなかった。また同一生物で、両方の酵素をもつ例については全く知られていなかった。

申請者は大腸菌からはじめて両酵素の存在を証明し、とくに NAD 要求性の酵素については約100倍程度の精製を行ない、その一般的性質を明らかにした。本酵素は多くのリンゴ酸酵素とは著しく性質を異にしており、allosteric enzyme の特性を示した。さらに NADP 要求性の酵素についても部分精製を行ない、その性質を明らかにした。

まず菌体を音波破碎した後、超遠心分離を行なって得た上澄液にリンゴ酸および NAD を加えると、NADH₂ の生成が認められた。この事実から、NAD 要求性のリンゴ酸酵素の存在を推定し、その精製を試みた。すなわち、超遠心上澄液を第一次硫酸分画、プロタミン処理、第二次硫酸分画、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより順次精製し、比活性として約 100 倍高い標本を得た。この標品は NADP 要求性のリンゴ酸酵素およびリンゴ酸脱水素酵素の活性をほとんど示さず、化学量論的にリンゴ酸の酸化的脱炭酸反応を触媒した。したがって、NAD 要求性のリンゴ酸酵素の存在が完全に証明された。

この酵素は既に知られているリンゴ酸酵素とは著しくその性質を異にしている。すなわち、この酵素はその活性の発現に一価陽イオンを必要とせず、高濃度では逆に阻害された。また、pH7.9における本酵素のKm値は、リンゴ酸および NAD に対し、それぞれ $9 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $4.7 \times 10^{-5} \text{M}$ であった。Mn⁺⁺ に対するKmは高濃度のリンゴ酸が存在する場合には、 $1.5 \times 10^{-5} \text{M}$ であった。さらに注目すべきことには、過剰のリンゴ酸による基質阻害を受けないこと、さらに、リンゴ酸の濃度を大きくすればするほど Mn⁺⁺ に対するKm値が小さくなる傾向を示した。さらに本酵素は本来の性質のほかにオキサリ酢酸の脱炭酸を触媒し、この活性は NAD やリンゴ酸によって阻害された。これらの性質は本酵素が allosteric enzyme である

ことと深い関係にあると推論される。

一方 NADP 要求性の酵素についても部分精製を行なったが、この酵素は他の生体から得られたものと同様な性質を示した。しかし、一価陽イオンとして K^+ のみでなく NH_4^+ によっても活性化を受けるという点において異なった性質を示した。

参考論文 1) は、はじめて大腸菌において、それぞれ、NAD および NADP 要求性の 2 種類のリンゴ酸酵素が存在することを報告したものである。菌の培養条件により、両酵素の量は異なった変動を示すので、両者の生理機能が異なることを推論した。参考論文 2) は、NAD 要求性のリンゴ酸酵素がアスパラギン酸を effector とする allosteric enzyme であることを証明したものである。さらに、参考論文 3) は、その生理機能について論じたものである。参考論文 4) は、筋肉の場合と同様に、ミトコンドリア中に 2 種の収縮性蛋白が存在することを証明し、その性質を明らかにしたものである。

論文審査の結果の要旨

リンゴ酸酵素は広く生物界に分布することが古くから知られていたにもかかわらず、その生理的機能についてはほとんど定説がない状態であった。また、補酵素要求性として NADP 要求性のものと NAD 要求性のものとが存在することが報告されていたが、同一生物から両酵素を証明した例は知られていなかった。

申請者は、参考論文 1) においても部分的に触れているが、大腸菌に上述の両酵素が存在することを証明し、とくに NAD 要求性酵素をかなり高度に精製した。この酵素は既知の NAD 要求性酵素とは著しくその性質を異にし、参考論文 2) に述べられているようにアスパラギン酸によって活性化される allosteric enzyme であることが証明された。

主論文は、両酵素の存在の証明のほかに、NAD 要求性酵素の一般的性質を明らかにしたものである。この酵素の著しい特性として、酵素活性発現に一価陽イオンを必要としない点と、リンゴ酸の濃度を大にすればするほど Mn^{++} に対する K_m 値が小さくなる点である。また、既知の NAD 要求性酵素は、培養の際の炭素源をリンゴ酸にした時のみに見られる、いわゆる適応酵素であるのに反し、本酵素は、種々の化合物を炭素源にした時にも見られるので、全く異なった生理機能をもつことが予想された。このことは、リンゴ酸や NAD に対する K_m 値が小さいという事実にも反映されている。

参考論文 3) において本酵素の生理機能について論じているが、以上の一連の研究を通じて、大腸菌にはリンゴ酸の酸化的脱炭酸反応を触媒する酵素が 2 種類存在し、NAD 要求性のものは細胞内のアスパラギン酸や二塩基酸の濃度を調節する機能をもつという重要な知見を明らかにしたものである。

生細胞内の酵素の生理機能を解明することは極めて困難であるが、申請者の業績は TCA サイクルの重要な調節点を解明した高い価値をもった研究といえることができる。

参考論文 4) は、以上の研究とは全く異なり、収縮性蛋白を取り扱った論文であるが、申請者が種々の分野に勝れた研究能力をもつことを示すものである。

以上を総合して、本論文は理学博士の学位論文に十分値するものと認める。