

氏 名	大 隅 孝 治 おお すみ たか はる
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	論 農 博 第 459 号
学位授与の日付	昭 和 48 年 7 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	STUDIES ON AMINO ACID RACEMASE OF PSEUDOMONAS STRIATA (<i>Pseudomonas Striata</i> のアミノ酸ラセマーゼに関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 山 本 龍 男 教 授 千 葉 英 雄 教 授 栃 倉 辰 六 郎

論 文 内 容 の 要 旨

アミノ酸ラセマーゼに関してはメチオニン、グルタミン酸、プロリンなどをラセミ化する酵素の存在が報告されているが詳細な酵素化学的研究は行なわれておらず、たとえば補酵素に関してもピリドキサルリン酸 (PLP)、FAD あるいは PLP と FAD 両者の関与、あるいは補酵素を必要としないラセマーゼなどが報告されており、高純度の酵素標品を用いて根本的な検討を加える必要がある。

著者はまず各種細菌についてアミノ酸ラセマーゼ活性を検索し、土壤中より分離同定した *Pseudomonas striata* の無細胞抽出液中にこれまで報告のなかったロイシンと α -アミノ酪酸などをラセミ化する新らしいラセマーゼを見出し、ついで本酵素を約 240 倍に精製し薄板状の結晶酵素を単離し得た。沈降平衡法により測定された本酵素の分子量は 110,000 で 420 m μ に吸収ピークを示す。基質に対する特異性は極めて低く、多くの種類のアミノ酸のラセミ化を触媒し、この点では *Pseudomonas graveolens* のアルギニンラセマーゼと類似しているが、アラニンラセマーゼなど他の従来知られているアミノ酸ラセマーゼの基質特異性が高いのとは対照的であり、特に低基質特異性アミノ酸ラセマーゼと命名された。しかし酸性アミノ酸、イソロイシン、スレオニンなどはラセミ化をうけない。これらの基質特異性を基質アミノ酸の構造の面から考察し β -メチレン基の重要性を明らかにした。また補酵素として PLP のみ要求し、ホロ酵素 1 分子あたり 2 分子の PLP を含み、酵素タンパク質のリジン残基の末端アミノ基とアルジミン結合によって酵素に結合していることを明らかにしている。さらにアポ酵素に対する PLP の結合についても検討を加え pH の低下とともにその結合の速度が大きくなり pH 5.5 附近において最大であることを見出している。

本酵素は 2 個の同一サブユニットに可逆的に解離することを変性剤中での電気泳動あるいは活性測定的面から明らかにした。尿素などの変性剤でサブユニットに解離した酵素は透析あるいは緩衝液により稀釈することによって変性剤の濃度を低下させるとその活性が回復することを明らかにしている。

論文審査の結果の要旨

アミノ酸ラセマーゼはアミノ酸のラセミ化を触媒する酵素の総称であり、Wood らによりはじめてアラニンラセマーゼが細菌中に発見されて以来数種のアミノ酸ラセマーゼの存在が知られている。

本論文は細菌におけるアミノ酸ラセマーゼの分布を調べ、土壌中から単離同定した *Pseudomonas striata* 中にこれまで全く報告のなかったロイシン、 α -アミノ酪酸などのラセミ化を触媒する新しい酵素を見出し、無細胞抽出液から本酵素の精製、結晶化を行ない、その諸性質を物理化学ならびに酵素化学的な立場から究明した。

本酵素の分子量は 110,000 であり、酵素 1 分子中に 2 分子のピリドキサルリン酸 (PLP) が酵素タンパク質のリジン残基の ϵ -アミノ基と Schiff 塩基を介して結合しており、PLP を唯一の補酵素とすることが明らかにされた。また基質特異性についてはリジン、エチオニン、テアニンなど多くのアミノ酸が基質となり、 $\text{RCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ の基本構造を有することが基質となるための必要条件であるが、酸性アミノ酸、芳香族アミノ酸は作用をうけない。本酵素はこのような基質特異性が低く、アラニンラセマーゼやプロリンラセマーゼなど基質特異性が高い他のアミノ酸ラセマーゼとは対照的である。本酵素は尿素、グアニジンなどの変性剤により 2 個の同一サブユニットに解離し、透析などによる変性剤の除去によってネイティブな酵素に回復することが明らかになった。また本酵素中には 2 個の S-S 結合が含まれているが遊離の SH 基は存在しない。アポ酵素と補酵素である PLP の結合についても研究を行ない、pH 5.5 において最も結合速度の高いことを見出している。

以上のように本論文は土壌中より分離同定した *Pseudomonas striata* 中にユニークな低基質特異性アミノ酸ラセマーゼの存在を見出し、酵素を精製、結晶化してその諸性質を詳細に解明しており、その知見は微生物化学、酵素化学の分野に貢献するところが極めて大きい。

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。