

氏 名	鈴木 信太郎 すずき しんたろう
学位の種類	理学博士
学位記番号	理博第 457 号
学位授与の日付	昭和 52 年 5 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	土壤中より分離した好気性細菌に存在する Mesaconate Hydratase の生理機能に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 香月裕彦 教授 波多野博行 教授 川出由己

論文内容の要旨

メサコナーゼ (mesaconate hydratase) はメサコン酸に加水してフマル酸を生成する反応を可逆的に触媒する酵素である。申請者は β -メチルリンゴ酸を唯一の炭素源として生育する菌として土壤中より単離された好気性菌について、 C_5 一分岐二塩基酸の代謝ならびに関連する酵素について研究中、好気性菌のメサコナーゼの生理機能を示唆する重要な知見を発見した。

まず、申請者は、本酵素を上記土壌菌から硫酸分画、Sephadex — 6B—カラムクロマトグラフィーなどの方法を用いて約 8 倍に精製した。この標品に基質を加えて反応させたところ、基質の減少量と生成物の増加量とは相等しく、反応は化学量論的に進行することが証明された。本酵素は非常に不安定であるが、失活した酵素は二価鉄イオンおよび β -メルカプトエタノールと共に窒素気流中でインキュベートすると容易に再活性化されることがわかった。この再活性化反応は、温度に依存し、 $30^{\circ}C$ では 30 分間で反応が完了するのに反し、 $4^{\circ}C$ では 100 分以上を要した。また、空気中では再活性化反応は阻害された。この鉄イオンの効果は特異的であり、他の金属イオンによって代替されなかったが、SH 化合物の特異性は低く、L—または D—システインも同程度の効果を示した。また、鉄イオンを加えずに培養して得た菌体の酵素レベルは、加えて培養した場合のレベルの約 1/5 に過ぎなかった。しかしながら、酵素活性測定のためのインキュベーションにおいては、鉄イオンの添加効果は認められなかった。これらの実験結果は、二価鉄が本酵素分子中に含まれ、かつその活性発現に関与することを示唆している。

本酵素標品は、また、L—チトラマル酸とメサコン酸との間の転換反応以外に、L—リンゴ酸とフマル酸との間の転換反応をも触媒した。この場合の反応も、メサコン酸を基質とした場合と同じく、二価鉄イオンと β -メルカプトエタノールにより再活性化を受けた。両活性を分離する目的で、酵素標品を Sephadex—6B—カラムクロマトグラフィーにかけたところ、両者は全く同一画分に溶出した。また、全画分を通じ、二価鉄イオンを要しないフマルラーゼ活性を検出することはできなかった。さきに述べた

酵素の精製ならびに酵素の再活性化操作において、さらに酵素標品を種々な温度で加熱処理した場合の失活過程において、両活性の測定を行なったところ、その比は常に一定値を示した。また、メサコン酸及びフマル酸の両方を基質として用いると、活性の加成性は認められず、拮抗阻害が認められた。以上の事実は、本菌中には二価鉄を要しない、いわゆるフマラーゼは存在せず、二価鉄要求性のフマラーゼ活性はメサコナーゼに帰因することを示唆している。両方の基質を用いた時の酵素の K_m , 最大酵素活性, 反応の最適 pH を調べたが、これらの値は、いわゆるフマラーゼの場合と異なり、最もよく知られている *Clostridia* のメサコナーゼの値と近似していた。本酵素の生細胞における機能として種々の可能性が考えられるので、数種の化合物を炭素源として菌を培養し、本酵素のレベルを測定した。その結果、本酵素のレベルは炭素源の差異によって変動を示さず、本酵素が構成酵素であることを示唆する知見を与えた。また、同時に、トリカルボン酸サイクルの諸酵素のレベルを測定したが、これらの酵素のレベルはメサコナーゼのレベルとほぼ同程度の値を示した。これらの結果は、本菌におけるメサコナーゼは *Clostridia* の場合に見られるようなグルタミン酸の分解代謝に関与したり、また、 C_5 一分岐二塩基酸の代謝に関与するのではなく、むしろ、フマル酸に加水してリンゴ酸を生成する反応を触媒し、トリカルボン酸サイクルの作動の一翼を担う働きをもつことを強く示唆した。

参考論文 1 は上記土壌菌の無細胞抽出液について、threo- β -メチルリンゴ酸の L-型および D-型が、それぞれ、メサコン酸を経て L-チトラマルを与える経路とチトラコン酸を経て D-チトラマル酸を与える経路とにより代謝されることを解明した論文である。参考論文 2 は大腸菌からアスパルターゼを高度精製し、本酵素が四量体であり、二価金属イオンやカリウムイオンによって活性化されることを示すと共に、分子量、アミノ酸組成、基質特異性および速度論的諸性質を明らかにした論文である。

論文審査の結果の要旨

申請者の用いた土壌菌は、 β -メチルリンゴ酸を唯一の炭素源として生長する菌であり、 C_5 一分岐二塩基酸によって内呼吸を阻害されないという特性を有している。申請者は、本菌を用 C_5 一分岐二塩基酸の代謝について研究を行ない、 β -メチルリンゴ酸の分解代謝に関し、2つの新しい分解経路を発見した(参考論文 1)。さらに分岐二塩基酸代謝に関与する酵素について研究中、メサコナーゼが他の酵素と挙動を異にすることに注目し、その生理的機能を解明することを試みた。本酵素は、*Clostridia* においてはグルタミン酸代謝に関与するとされ、またその他の菌においてイソロイシン生合成に関与する可能性が指摘されていた。もし、これらの考えが正しいとすれば、土壌菌について β -メチルアスパルターゼ活性が証明されなければならない筈であるが、実験の結果は否定的であった。ついで本酵素が分岐二塩基酸代謝に関与する可能性が当然考えられるが、*Pseudomonad* に関する知見や申請者の経験から、この可能性は少いと考えた。まず、酵素の精製が試みられたが、その不安定な性質のため約 8 倍程度に純化できたにすぎなかった。本酵素はメサコン酸の他にフマル酸の加水反応をも触媒するが、両活性は、申請者が試みた限りの全実験において、常に挙動を一にすることがわかった。また、細胞を破碎して得た粗抽出液を Sepharose-6B-カラムクロマトグラフィーにかけたが、両活性は完全に同一画分に溶出され、その他の画分にフマラーゼ活性を見出すことはできなかった。これらの結果から、申

請者は、両活性は同一酵素蛋白に帰因するとせざるを得ないと結論した。また、種々の条件下に培養した菌について本酵素ならびに関連酵素のレベルについて測定を行った結果に基き、本菌は二価鉄非要求性のいわゆるフマラーゼを持たず、その代りに本酵素がフマル酸の加水反応を触媒し、トリカルボン酸サイクルの作動に与っていることを提唱した。この考えに従えば、フマル酸の加水反応を触媒する酵素すなわち“生理的なフマラーゼ”には2種類あり、一つは従来から知られている二価鉄非要求性の通常のフマラーゼであり、他は申請者の研究した二価鉄を要求する本酵素である。この発見は、現在のフマラーゼの酵素学的分類をくつがえすものであり、また、細胞化学的に新しい概念を導入したといえる。酵素化学ならびに代謝化学の分野において貢献するところ頗る大であるといわざるを得ない。

申請者は土壌菌以外の他の好気性菌についても検討を行なった結果、同様の現象が観察された。しかし、一部の菌については、二価鉄を要しないフマラーゼ活性も検出され、両酵素をもつ菌の存在が示唆されている。このことは、細菌の分類および生物進化の上から見ても、重要な知見であり、興味ある研究課題を提出するものである。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。