

氏 名	柘 植 治 人
	つ げ ばる ひと
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	論 農 博 第 477 号
学位授与の日付	昭 和 48 年 11 月 24 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 THE MOLECULAR COMPLEX OF FLAVINS—BINDING NATURE OF FLAVIN COENZYME TO THE APOPROTEIN
	(フラビン類の分子複合体に関する研究—アポタンパク質へのフラビン補酵素の結合の性質)
	(主 査)
論文調査委員	教 授 満 田 久 輝 教 授 千 葉 英 雄 教 授 岩 井 和 夫

論 文 内 容 の 要 旨

本論文はアポタンパク質へのフラビン補酵素の結合に関して

(Ⅰ) モデル系による分子複合体形成の検討, (Ⅱ) FAD (Flavinadenine-dinucleotide) とアポ GOD (Glucose oxidase) [EC 1.1.3.4] との相互作用, (Ⅲ) パーオキシダーゼ-O-ジアニシジン系を用いる活度染色法の開発の3項目について検討した結果をとりまとめたものである。

フラビン補酵素の蛍光の消光を主とした場合, フラビン補酵素とアポタンパク質との相互作用の様式としては, 水素結合説, 電荷移動錯体説および励起エネルギー移動説などが考えられるが, フラビン補酵素の3位のイミノ基とアポタンパク質中のチロシンの水酸基による水素結合説よりも, 電子供与体としてのアポタンパク質部分, 主としてトリプトファン残基から電子受容体としてのイソアロキサジン核への電子移動の可能性が大きいことを説明している。フラビン-トリプトファン(1:1)錯体を結晶化することに成功し, その赤外分光分析から両構成成分には見られない新しい吸収帯を観察し, 電荷移動力の関与を示唆し, イソアロキサジン核の2あるいは4位のカルボニル基の変化が著しいことを指摘している。ついで, このモデル系で得た知見を実在の酵素 GOD を用いてフラビン補酵素とアポ酵素との結合の様式を調べ, さらに FAD 蛍光の消光に関与するアポ酵素のアミノ酸残基を化学修飾することによって探索している。ついで, ホロ酵素およびアポ酵素に PCMB (*p*-Chloromercuribenzoate) を作用させると, 前者ではほとんど変化がないのに, 後者の FAD とり込みは著しく阻害されると同時に FAD の濃度に依存したシグモイド性も消失する。ホロ酵素や加熱変性標品を PCMB 滴定しても遊離の SH 基は検出されないが, 8M 尿素, 4M グアニジン塩酸塩中およびアポ酵素では2~3モルの遊離 SH 基を検出定量している。FAD のアデニン部分の NH₂ 基とアポ GOD 中の SH 基との相互作用の可能性を推定し, さらにパーオキシダーゼ-O-ジアニシジン系を用いる活度染色法を開発している。

論文審査の結果の要旨

生体にとって重要な酸化還元反応をつかさどるフラビン酵素はその水素運搬体としてのフラビンとアポタンパク質を主構成成分としている。現在知られている40種以上のフラビン酵素には、Fe や Mo などが必要とするものもあるが大部分は単純フラビントタンパク質である。フラビン酵素の特長の一つは succinate dehydrogenase [EC 1.3.99.1] など1, 2の例を除いて酸性で塩析することによって容易に補酵素を遊離することである。すなわち、補酵素とアポ酵素との結合は非共有的であり、一種の分子複合体と考えられることである。さらにもう一つの特長は酸化型の遊離 FMN (Flavinmononucleotide) あるいは FAD は強い蛍光を発するが、いったんホロ酵素となると lipoamide dehydrogenase [EC 1.6.4.3] などの例外を除いて、非蛍光性か、弱蛍光性に変化することである。

本研究はフラビンとアポタンパク質とのいかなる作用によりホロ酵素が形成され、フラビン補酵素の蛍光を消光させるかを究明している。フラビンとトリプトファンを濃塩酸を含むアルコール系の溶剤に別々に溶解し、両液を合すると両者には見られない褐色の溶液となり Mulliken によって提唱された電荷移動錯体が出現する。錯体の安定性に与える溶剤の影響を調べ、BuOH:12^N HCl (7:3) の混液では沈殿し易いことを見出し、減圧濃縮、再溶解を行ない、少量の四塩化炭素かエーテル添加して低温に保つことにより結晶化に成功している。X線分析、紫外、可視吸収およびインドールの比色定量によりフラビン:トリプトファン=1:1の結晶であることを明らかにしている。モデル系で得たこれらの知見を実在のフラビン酵素により確かめる目的で、比較的安定な GOD を選び、フラビン補酵素とアポ酵素との結合の様式を調べた。アポ GOD と FAD との再構成反応で得た酵素は native な標品と本質的に変わらないこと、アポ GOD と FAD との再構成反応は FAD 濃度に依存し、反応の初期に FAD の蛍光の急増する事実などを見出している。また GOD 中での FAD の蛍光の消光にはトリプトファン残基が関与することを明らかにし、さらにアポ GOD の SH 基が FAD とり込みに重要な役割を演ずることも究明している。

以上のように本研究は生化学、ビタミン学の分野に貢献するところがきわめて大きい。

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。