

|         |                                                                                                   |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名     | 谷 澤 克 行                                                                                           |
|         | たに ざわ かつ ゆき                                                                                       |
| 学位の種類   | 農 学 博 士                                                                                           |
| 学位記番号   | 農 博 第 285 号                                                                                       |
| 学位授与の日付 | 昭 和 53 年 9 月 25 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 Reaction and Regulation Mechanisms of<br>Kynureninase<br>(キヌレニナーゼの反応機構および活性調節機構に関する研究) |

(主 査)  
論文調査委員 教 授 山 本 龍 男 教 授 山 田 秀 明 教 授 廣 海 啓 太 郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

キヌレニン<sup>1</sup>は複雑多岐なトリプトファン代謝の中心に位置している重要なアミノ酸である。

本論文はキヌレニンをアラニンとアントラニル酸に加水分解する反応を触媒するキヌレニナーゼの酵素化学的性質、反応機構、さらにその活性調節機構を明らかにしてトリプトファン代謝におけるキヌレニナーゼの役割を酵素化学的立場から究明したものである。

まず、*Neurospora crassa* においてトリプトファンで誘導されるキヌレニナーゼをアフィニティクロマトグラフィーを含む方法によって精製結晶化した。この結晶酵素を用いて分子量、サブユニット構造、補酵素ピリドキサル 5'-リン酸の結合様式などの物理化学的性質を究明した。また基質特異性、Km 値などからこの酵素はトリプトファンの分解系、いわゆる芳香族経路に關与することを明確にした。またこの誘導型キヌレニナーゼは補酵素ピリドキサル 5'-リン酸を介してオルニチン-ピルビン酸、アラニン-ピルビン酸間のアミノ基転移反応をも触媒することを明確にしたが、これは細菌キヌレニナーゼにおいて報告されている活性調節機構がカビの誘導型キヌレニナーゼにも存在することを示すものである。一方、*N. crassa* をトリプトファンを含有しない培地で生育させた時にも微弱なキヌレニナーゼが構成的酵素として存在することが明らかにされた。本酵素が誘導型酵素と異なるものであることを免疫化学的に証明し、さらに両者を完全に分離、精製する方法を確立した。この酵素の酵素化学的諸性質は誘導型キヌレニナーゼに酷似するが、基質特異性において、3-オキシキヌレニンに対して高い反応性及び小さな Km 値を有することから、構成型キヌレニナーゼはトリプトファンからニコチン酸への経路すなわち NAD 生合成経路に關与することを明らかにした。

さらにブタ肝臓より均一に精製したキヌレニナーゼは、カビの構成型キヌレニナーゼに類似しており、肝臓内でニコチン酸合成経路に機能していることが推察される。また両酵素には共に誘導型酵素で見られたアミノ基転移反応による活性調節機構が存在せず、NAD 合成の前駆体、3-オキシアントラニル酸によって阻害される。この事実は分解系の酵素と生合成系の酵素において活性調節機構が大きく異なることを

示している。

キヌレニナーゼの触媒機構に関しては、種々のキヌレニン類縁体を化学的あるいは酵素的に調製し、それらに対する *Pseudomonas marginalis* のキヌレニナーゼとの反応性を比較検討し、キヌレニンのベンゼン環に結合したオルトアミノ基がキヌレニンの加水分解を促進していることを明らかにした。また本酵素は  $\beta$ -O-アミノフェニルホモセリンがアラニンと O-アミノベンズアルデヒドに分解される  $\beta$ - $\gamma$  間の脱離反応をも触媒することを示し、反応中間体としてカルボニウムイオンを経由する反応機構を提示した。

## 論文審査の結果の要旨

キヌレニンはトリプトファンの複雑多岐にわたる代謝系の分岐点に位置するきわめて重要なアミノ酸である。キヌレニナーゼは、キヌレニンをアントラニル酸とアラニンに加水分解するユニークな反応を触媒するビタミン B<sub>6</sub> 酵素であるが詳細な研究は乏しい。

本論文は、キヌレニナーゼの酵素化学的性質、触媒機構、活性調節機構、さらには比較生化学的特性を解明した結果をまとめたものである。

まず、*Neurospora crassa* においてトリプトファンで誘導されるキヌレニナーゼを精製結晶化し、その酵素化学的、物理化学的諸性質を明らかにするとともに本酵素がトリプトファンの分解系、すなわち芳香族経路に関与していることを明確にした。この誘導型キヌレニナーゼは補酵素、ピリドキサル 5'-リン酸を介してオルニチン-ピルビン酸、アラニン-ピルビン酸間のトランスアミナーゼ反応をも触媒することから、細菌キヌレニナーゼにおけると同様な活性調節機構が存在することを明らかにした。

一方、*N. crassa* には他に構成型キヌレニナーゼの存在することを実証し、これを単離、精製してその酵素化学的諸性質を明らかにした。その結果この構成型キヌレニナーゼはトリプトファンからニコチン酸への経路、すなわち NAD 生合成経路に関与することを指摘した。

哺乳類のキヌレニナーゼと比較検討するため、ブタ肝臓のキヌレニナーゼを均一状態に精製して諸性質を検討した。その結果、哺乳類のキヌレニナーゼはカビの構成型キヌレニナーゼに類似しており、肝臓内でニコチン酸を合成する経路に働いていることが明らかにされた。また哺乳類キヌレニナーゼとカビの構成型キヌレニナーゼにはトランスアミナーゼ反応による活性調節機構が存在しないことを明確にし、分解系の酵素と生合成系の酵素における調節機構の異同を明らかにした。

*Pseudomonas marginalis* のキヌレニナーゼを用いて酵素反応機構を調べ、キヌレニンのベンゼン環に結合したオルトアミノ基がキヌレニンの加水分解反応を促進していること、並びに本酵素は  $\beta$ -O-アミノフェニルホモセリンがアラニンと O-アミノベンズアルデヒドに分解される  $\beta$ - $\gamma$  間の脱離反応をも触媒することを明らかにし、反応中間体としてカルボニウムイオンを経由する反応機構を提出している。

以上のように本論文は細菌、カビ、哺乳動物に由来するキヌレニナーゼの酵素化学的性質を解明するとともに、その反応機構、活性調節機構をも究明したものであり、微生物化学、酵素化学の分野に貢献するところが多い。

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。