

氏 名	田 口 寛 た ぐち ひろし
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 218 号
学位授与の日付	昭 和 50 年 9 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	農 学 研 究 科 農 芸 化 学 専 攻
学位論文題目	STUDIES ON QUINOLINATE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼに関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 岩 井 和 夫 教 授 満 田 久 輝 教 授 森 田 雄 平

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は生体内におけるニコチンアミド・アデニン・ジヌクレチオド (NAD) の *de novo* 生合成系酵素の一つである quinolinate phosphoribosyltransferase (EC2.4.2.19) の分布、性状に関する研究結果をとりまとめたものである。

まず著者は本酵素の活性測定法を検討し、2,3,7,8-¹⁴C-キノリン酸を基質に用いるラジオアッセイが高感度で特異性にすぐれた有用な方法であることを確認し設定すると共にこの方法を用いて本酵素の分布を広く検討した。その結果、本酵素は生物界に広く分布しており、動物では肝臓と腎臓に局在していた。植物では柿の葉、キュウリ、シイタケなどに強い活性が見出されたが全く活性の検出されないものもあった。また微生物でも生育にニコチン酸やニコチンアミドを要求しないものにおいて本酵素活性の検出されないものがあって、自然界にはキノリン酸を経由しない別の新しい NAD の *de novo* 生合成経路の存在する可能性が指摘された。

つぎにシイタケ子実体から本酵素の精製を試み約 1,000 倍に精製してクロマトグラフ的に均一な酵素標品を単離しその酵素的諸性質を明らかにした。本酵素標品の分子量は約 160,000 で反応の至適 pH は 6.5 であった。反応にはキノリン酸と 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) の他に Mg^{2+} が必要であり、キノリン酸と PRPP とに対する K_m 値はそれぞれ $1.1 \times 10^{-5} M$ および $2.3 \times 10^{-5} M$ であった。また PRPP は本酵素の allosteric effector として作用することをはじめて明らかにした。本酵素の活性は Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} のような 2 価の金属イオンおよび Al^{3+} , Fe^{3+} のような 3 価の金属イオンによって著しく阻害されたが、さらに Cl^- や NO_3^- などの陰イオンによっても阻害された。また種々のヌクレオチドによっても阻害を受け、とくに ATP は本酵素の活性を強く阻害した。しかし SH 試薬やアルボサイクリンによっては阻害されなかった。

ついでブタ肝臓から本酵素の精製を行ない、61%の高収率で約 5,200 倍に精製し動物組織からはじめて本酵素を結晶状に単離した。この結晶酵素標品は超遠心的ならびにディスク電気泳動的に均一性を示した。

のでその物理化学的ならびに酵素化学的諸性質を検討した。本酵素の分子量は約170,000で分子量約34,000の同一のサブユニットから構成されていた。本酵素反応の至適 pH は6.1でキノリン酸と PRPP の他に Mg^{2+} を必要とした。キノリン酸と PRPP とに対する K_m 値はそれぞれ $1.2 \times 10^{-4}M$ および $1.8 \times 10^{-4}M$ であり、その反応生成物は単離実験によって β -ニコチン酸モノヌクレオチドと同定された。本酵素の活性はシイタケからの酵素と同様に2価および3価の金属イオンによって著しく阻害されたが陰イオンによっては阻害されなかった。また種々のヌクレオチド、フタル酸、SH 試薬などによって阻害されることが見出され、その阻害機構が解析された。

つぎに本酵素のアミノ酸分析を行なってそのアミノ酸組成を明らかにすると共に本酵素を化学修飾して検討し、本酵素の活性中心付近の重要なアミノ酸側鎖としてアミノ基、イミダゾール基、SH 基の存在を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド (NAD) が生体内の種々の酸化還元酵素の補酵素として重要な働きを演じていることはよく知られている。この NAD の生体内における *de novo* 生合成経路にはトリプトファンが前駆体となっている経路と、アスパラギン酸、グリセロールなどが前駆体となっている経路との二つが知られているが、いずれの経路においてもキノリン酸を共通の中間体として經由することが明らかにされている。このキノリン酸から 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate の共存のもとで当量のニコチン酸モノヌクレオチドと CO_2 とを生成する反応を触媒する酵素が quinolinate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.19) であって、NAD の *de novo* 生合成系における重要な酵素の一つである。本酵素はこれまで牛肝と細菌の一種 (*Pseudomonad*) から精製されていたのみで本酵素に関する詳細な研究は行われていなかった。

本論文では著者はまず本酵素の活性測定法を検討し、基質に 2,3,7,8- ^{14}C -キノリン酸を用いる高感度で特異性の高い簡便なラジオアッセイを設定し、この方法を用いて本酵素の動・植物および微生物における分布を詳細に調べその分布の特徴を明白にすると共に、自然界にはキノリン酸を経由する既知の経路の他に別の新しい NAD の *de novo* 生合成経路の存在する可能性のあることを指摘している。

ついで著者は、さきが高い酵素活性を有することを見出したシイタケ子実体から本酵素を高純度に精製単離し、はじめて植物起源の本酵素の諸性質を明らかにした。ことにシイタケの酵素がアロステリック酵素であることなどの新しい性質が明らかにされたのは注目される。

またブタ肝臓からは60%以上の高収率で本酵素をはじめて結晶状に単離することに成功し、超遠心的ならびに電気泳動的にも均一性を示す極めて高純度のものであることを実証し、その物理化学的ならびに酵素化学的諸性質を詳細に検討した。とくに本酵素標品は5個の同一のサブユニットで構成されていると計算される珍しい酵素であることの指摘は興味深い。また、本酵素はシイタケの酵素とは異なって SH 酵素であり、ヌクレオチド、フタル酸、SH 試薬などによっても阻害される特性を有することを明確にしている。また本酵素のアミノ酸組成をはじめて明らかにすると共に本酵素を種々の方法で化学修飾して検討し、活性中心付近の重要なアミノ酸側鎖としてアミノ基、イミダゾール基、SH 基の存在を実証した。

このように本論文は従来明らかでなかった本酵素の分布，性状に関して新しい多くの知見を加えたものであって生化学，酵素学，ビタミン学の分野に貢献するところが大きい。

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。