

氏 名	武 田 博 士 たけ だ ひろ し
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	論 医 博 第 645 号
学位授与の日付	昭 和 51 年 5 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 Monooxygenases: GENERAL PROPERTIES OF CRYSTALLINE L-LYSINE MONOOXYGENASE (一原子酸素添加酵素に関する研究, 結晶 L-リジン一原子酸素添加 酵素の一般的諸性質)
論文調査委員	(主 査) 教 授 沼 正 作 教 授 本 庄 一 夫 教 授 早 石 修

論 文 内 容 の 要 旨

緑膿菌にみられる L-lysine の代謝は、分子状酸素の存在下で α 位の脱炭酸、脱アミノを同時に受け δ -amino-n-valerate が生成されることが須田らによって報告されている。

著者は、この代謝経路の最初に関与する酵素を 5 段階の精製過程を経て、約 100 倍精製し (収量 41%) 比活性 $10.6 \mu \text{ moles/min/mg}$ 蛋白 (34°C) の標品を得ることができ、35% 硫酸液中 (4°C) で結晶化に成功した。この結晶酵素の純度は、超遠心分離並びに電気泳動法により単一酵素であることを確認した。

この標品を用いて超遠心分析法を行い、 $S^{20, w}$ が 10.4S の値をえた。拡散定数 $D^{20, w}$ は $4.80 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ であった。更に偏比容についても平均値 0.725 の値がえられ、これらの測定値を用いて求められた本酵素の分子量は 191,000 である。また、同標品のアミノ酸分析の結果では、特に tryptophan と tyrosine の比率が比較的高く、 $E_{280}^{10\%}$ は 17.9 と高値を示した。

この結晶酵素によって、L-lysine がどのような反応を受けるか諸種の検討を加えてみた。まず、反応生成物を得るために、ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) に L-lysine HCL 500mg と酵素 6.8mg を加え約 2 時間反応させた後、HBy 塩として抽出精製し結晶 256mg の収量があった。この反応生成物は paper chromatography, 融点 (283°C 分解), 元素分析, 赤外スペクトル等で、有機合成した新合成物質 δ -amino-n-valeramide と一致し同定しえた。また、 O_2 消費量, L-lysine 消失量, CO_2 生成量, δ -amino-n-valeramide 生成量の間に 1:1:1:1 の関係が見出された。

本酵素の一般的諸性質を列挙すると、まず、至適 pH 曲線は 9.0~9.5 で最高活性がみられ pH 8.0 附近で顕著な肩が認められた。基質特異性の点では、L, D-lysine においては L 型にのみ活性がみられるほか L-arginine, L-ornithine, L-thialysine にも弱いながらも酵素消費が認められた。安定性の面では 4°C, pH 7.0~8.0 の保存であれば数週間にわたり活性低下はみられなかった。SH 阻害剤で、ほぼ 100% の強い活性阻害がみられるが、SH 試薬の添加により 50% 以上の再活性化をみた。

なお、本酵素は著明な黄色調を帯び、可視部の 385m μ と 460m μ に強い吸収がみられ、分析の結果二

分子の FAD が含まれていることが判明した。嫌氣的条件下に基質あるいは dithionite などの還元物質を添加することにより上記の二峰性の波形は消失し、補酵素 FAD が還元されるものと考えられる。更に、補酵素 FAD は、蛋白部分から可逆的な解離が可能であるが他のフラビンでは可逆性が認められなかった。

最後に、初反応生成物質 δ -amino-n-valeramide の脱アミノに関与し δ -amino-n-valerate を生じる酵素 deamidase についても、同一菌抽出液から約20倍（比活性 10.8, $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白）にまで精製しその基質特異性について検討した。

以上の結果から、緑膿菌による L-lysine の代謝の初反応は、従来考えられていたように単一酵素添加、脱炭酸、脱アミノが同時に触媒されるのではなく、まず脱炭酸を伴う一原子酸素添加反応によって δ -amino-n-valeramide を生じ、引き続いて deamidase の作用で脱アミノを受ける2段階の反応であることが明らかにされ、それぞれの反応に関与する異なった2酵素の精製・単離を行った。

また、フラビン酵素によって触媒される最初の反応は、NAD(P)H等の水素供与体を必要としない一原子酸素添加反応であって、現在では他のいくつかの例と共にフラビン酵素の重要かつ特異な一群となっている。加えるに、本酵素が比較的容易に精製標品として得られることから、フラビン含有酸素添加酵素の反応機構を解明するための充分量の材料を提供し得るものである。

論文審査の結果の要旨

緑膿菌によって L-lysine が δ -amino-n-valerate に代謝されることは須田らによって報告されている。著者はこの代謝経路の最初の反応を触媒する酵素を菌体から抽出・精製し結晶化することに成功した。この結晶酵素は、超遠心的ならびに電気泳動的に単一たん白であり、拡散定数、沈降定数および偏比容から分子量は19万1千で、FAD 2分子を含むことが証明された。さらに、この結晶酵素を用い、反応生成物が δ -amino-n-valeramide であることを証明し、本酵素の性質および反応機構を詳細に検討した。また、同一菌体から δ -amino-n-valeramide の脱アミド反応を触媒する deamidase を分離、精製した。これらの知見は、緑膿菌における L-lysine 代謝の経路を解明し、特に最初の反応がフラビン酵素による一原子酸素添加反応であることを明らかにした先駆的な業績である。以上の研究は、生体の酸素利用機構の解明に貢献し、生化学・酵素学の進歩に寄与するところが大きい。

よって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。