

Title	PHENYLALANINE RACEMASE : ITS PROPERTIES AND ROLE IN BIOSYNTHESIS OF GRAMICIDIN S AND TYROCIDINE
Author(s)	Yamada, Michiyuki
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27722
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【 3 】

氏名・(本籍)	山 田 道 之
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 1505 号
学位授与の日付	昭和43年6月19日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	フェニルアラニンラセマーゼ ——その性質とグラミシジンSおよびチロシジン生合成における役割——
論文審査委員	(主査) 教授 倉橋 潔 (副査) 教授 鈴木 友二 教授 佐藤 了 教授 成田 耕造

論 文 内 容 の 要 旨

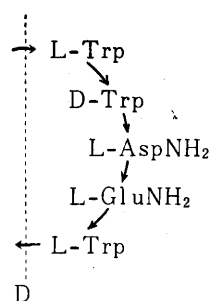
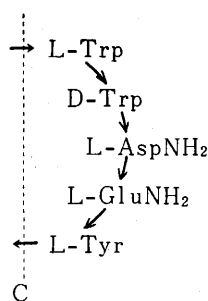
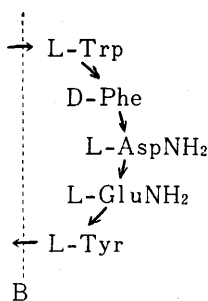
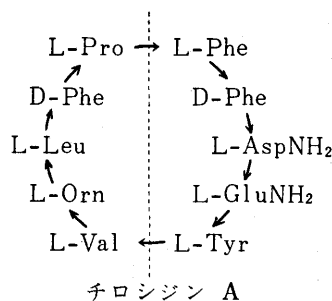
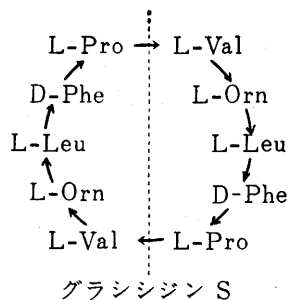
ペプチド性抗生物質は微生物によって産生され、一般に一分子あるいは数分子の D-アミノ酸を含む。生菌を用いた L-あるいは D-アミノ酸の抗生物質へのとりこみ実験においては、L-アミノ酸の方が D-アミノ酸よりもよりよくとりこまれるので、一般に抗生物質の D-アミノ酸残基は、L-アミノ酸がペプチド結合を形成したのち、D-アミノ酸に立体構造を変えることによって生じるものと考えられてきた。しかし *Bacillus brevis* 菌が産生するグラミシジン S あるいはチロシジン(図参照)には L-フェニルアラニンと同様に D-フェニルアラニンも生菌によってとりこまれる事実もあるので、これら抗生物質の D-アミノ酸残基は、まず L-体が D-体となり、のちにペプチド中にとりこまれる可能性も除外することができなかった。

本研究においては、グラミシジン S およびチロシジン産生菌に ATP を要求する新しい型のフェニルアラニンラセマーゼが存在することを明らかにし、その精製純化を行なった。さらに本酵素の諸性質および反応機構の解析を行い、本酵素が上記デカペプチドの D-フェニルアラニン残基の由来に必須であることを明らかにした。

グラミシジン S は *B. brevis* Nagano あるいは ATCC 9999 によって産生される抗菌性環状デカペプチドである。チロシジンは別の *B. brevis* 株 ATCC 8185 によって産生されるデカペプチドである(図参照)。

本研究においては上記抗生物質中に、共通に見られる L-ロイシンと L-プロリンには含まれた D-フェニルアラニン残基の由来について論じる。

これらの無細胞抽出液と L-フェニルアラニンおよび L-プロリンを ATP 存在下にインキュベートすると D-Phe-L-Pro-diketopiperazine, さらに L-バリンが存在すると D-Phe-L-Pro-L-Val の生成が認められる。これらの中間ペプチドはグラミシジン S のアミノ酸配列の一部からできているの



で、D-フェニルアラニン残基がペプチド結合の出発点となり、順次 C 末端に次のアミノ酸がつくものと考えられた。従って L-フェニルアラニンから D-体が形成されることがこれらのペプチド生成の最初の段階ではないかと推察された。これらの音波破碎抽出液に、ATP, Mg⁺, PPI, KF の存在下に、L-フェニルアラニンを D-フェニルアラニンに転換する酵素活性が存在する。この酵素は 78,000 ×g 遠沈、スレプトマイシン処理、硫酸分画、リン酸カルシウムゲルによる吸着溶出、269,000 ×g 遠沈、Sephadex G-150 によるゲルロカ、DEAE-Sephadex のクロマトグラフィにより精製され、超遠心的、電気泳動的に均一である酵素標品をえた。蔗糖密度勾配遠心法により求められた S_{20,w} は 6.1S、分子量は 10 万である。

純化した酵素は L-フェニルアラニンを D-体にかえ、また逆に、D-フェニルアラニンを L-体にかえる。本酵素の活性には ATP, Mg⁺ を必須とし、活性は dithiothreitol 等の還元剤、PPI および AMP により著しく促進される。ATP は反応中に分解され、D-フェニルアラニン 1 mole の生成に際して、AMP 1 mole が生成される。また本酵素標品は固有の活性として、L-および D-フェニルアラニン活性化の活性を有する。これらの事実から L-フェニルアラニンは活性化され、L-Phe · AMP · E_{NZ} 複合体の状態ではラセミ化を起し、そのうち D-phe · AMP が水解を受け、D-フェニルアラニンと AMP になるものと考えられる。本ラセマーゼは一般のアミノ酸ラセマーゼと異なり、補欠分子族としてピリドキサルリン酸を含んでいない。

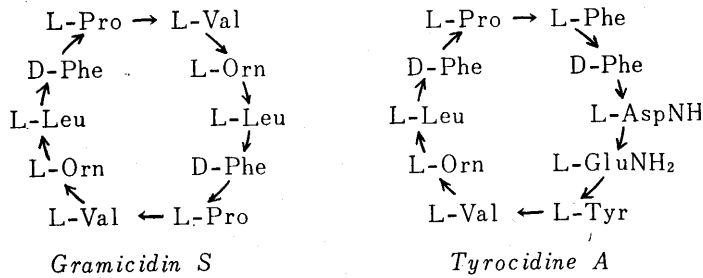
グラミシジン S 合成酵素系は Sephadex G-200 のゲルロカにより、相補的な画分 I および II に分けることができる。画分 II は L-および D-フェニルアラニン活性化の活性を有するので、画分 II はフェニルアラニンラセマーゼではないかと考えられた。事実、画分 II はラセマーゼによって完全におきかえられ、画分 I とフェニルアラニンラセマーゼを酵素として、グラミシジン S が生成される。グラミシジン S 産生菌とは異なる菌よりえられるチロシジン合成酵素系もやはり 2 つの相補的な画分に分け

られているが、グラミシジンS産生菌から精製された上記のフェニルアラニンラセマーゼは2つの画分の1つを完全におきかえ、チロシジンを生産することも明らかにされた。

以上の実験結果より、グラミシジンSあるいはチロシジンの生合成においては、ここに記述したフェニルアラニンラセマーゼがまず、L-フェニルアラニンを活性化し、phenylalanyl adenylateの形でラセミ化を起し、D-Phe・AMPとなり、これらペプチド生合成系の他の酵素画分によって活性化されたアミノ酸と順次にペプチド結合を起すものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

微生物の産生する抗菌性ペプチドには、一般に一個乃至数個のD-アミノ酸残基が存在するが、その生成の過程については全く不明であった。山田君は環状デカペプチドであるグラミシジンS及びチロシジンを産生する *Bacillus brevis* 菌体内に



新しい型のラセマーゼ、フェニルアラニンラセマーゼが存在することを明らかにし、この酵素を精製純化し、その性質を明らかにし、又この酵素が実際上記ペプチド中のL-ロイシンとL-プロリンにはさまれたD-フェニルアラニン残基の生成に関与していることを証明した。

この酵素の特性は、一般のラセマーゼとは異なり、ピリドキサル燐酸、あるいはフラビンアデニンジヌクレオチドを補酵素として含まず、ATPの存在下にL-フェニルアラニンアデニレートにし、このアデニレートの状態でD-体に変えることである。一モルのD-フェニルアラニンの生成に際し、一モルのAMPが生じることより、D-フェニルアラニンアデニレートは水解され、D-フェニルアラニンとAMPを生じるものと考えられる。D-フェニルアラニンも同様の過程でL-フェニルアラニンに変えられる。

グラミシジンSあるいはチロシジン生合成酵素系は、相補的な二つの画分に分けられるが、その一方の画分が上記のフェニルアラニンラセマーゼと同一のものであり、他の画分は残りのアミノ酸の活性化とペプチド結合の生成を触媒しており、ラセマーゼの働きによって生成したD-フェニルアラニンアデニレートに次々に構成アミノ酸を順次結合し、デカペプチドを形成するものと結論した。

この論文は、抗菌性ペプチドの生合成の機作に全く新しい知見を与えるもので理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。