

Title	D-アミノ酸々化酵素の反応機序について
Author(s)	門田, 健
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/28618">http://hdl.handle.net/11094/28618</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名・(本籍)	門 田 健 かど た けん
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 494 号
学位授与の日付	昭 和 39 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 生 理 系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	D-アミノ酸々化酵素の反応機序について (主 査) (副 査)
論文審査委員	教 授 久 保 秀 雄 教 授 萩 原 文 二 教 授 山 野 俊 雄

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

D-アミノ酸酸化酵素系での反応各段階における状態の変化（秩序性）を定めるためエントロピー変化を測る。そして反応機序解析へのデータの提供。

〔方 法〕

酵素は型のように純化。反応速度として酸素消費量をあてる。これは酸素電極で測定。エントロピーを求め方法として、活性化エネルギーEは Arrhenius の式  $\ln k/dT = E/RT^2$  により、実測値  $\log V_{\max}$  対  $1/T$  のプロットから求め、エンタルピーの変化  $\Delta H$  は  $\Delta E = \Delta H + RT$  の式から求め、これらを  $\Delta F = \Delta H - T\Delta S$  式に代入して、 $\Delta S$  を算出した。温度範囲は  $4 \sim 45^\circ\text{C}$ ，pH は 7.0，イオン強度は 0.5，恒温槽は Colora Ultrathermostat Type KLZ 42.60-2-84D。

反応段階は型のように次の通り想定する。



これに基き反応方程式をたて、定常状態近似および実験的に許される近似を施すと

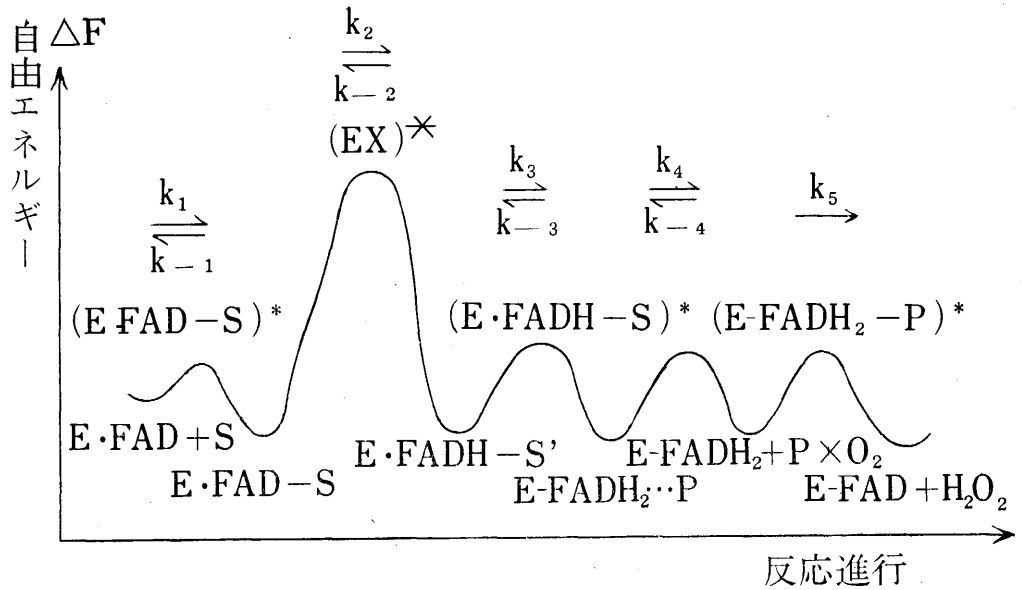
$$v = -\frac{d[S]}{dt} = -\frac{d[O_2]}{dt} = \frac{\beta \cdot (e_0) \cdot (s)}{\beta/\alpha + (s)}$$

$$\text{ここに } 1/\beta = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_4} + \frac{k_{-2}}{k_2 k_3} + \frac{k_{-2} k_{-3}}{k_2 k_3 k_4} + \frac{k_{-3}}{k_3 k_4},$$

$$1/\alpha = \frac{1}{k_1} + \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} + \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_1 k_2 k_3} + \frac{k_{-1} k_{-2} k_{-3}}{k_1 k_2 k_3 k_4}, \text{ただし } 1/k_5 = 0 \text{ とおく。}$$

こうして  $\beta \cdot (e_0) = V_{\max}$ ， $\beta/\alpha = Km$  とする。

自由エネルギーのプロファイルを次のようにとる。それに各反応速度定数を対応させる。



自由エネルギー・プロファイル

[成績]

1. 温度と得た  $V_{max}$ ,  $K_m$

°C	$V_{max}$ ( $\mu A/mg \cdot enz./min.$ )	$K_m \times 10^3$
4	7.2	3.2
10	$2.0 \times 10$	3.2
15	$3.2 \times 10$	2.2
20	$6.0 \times 10$	1.5
25	$1.1 \times 10^2$	1.2
30	$2.3 \times 10^2$	1.3
35	$3.5 \times 10^2$	1.2
40	$5.7 \times 10^2$	1.3
45	$8.3 \times 10^2$	1.3

pH 7.0, Lineweaver-Burk プロット

3. E·FAD+S 状態より (EX)\* 状態に至る熱力学的量

$\Delta H^*_{\alpha}$ (Kcal)	{	16.7 (30°C以上)
		27.8 (30°C以下)
$\Delta F^*_{\alpha}$ (Kcal)	{	17.1 (45°C)
		17.0 (15°C)
$\Delta S^*_{\alpha}$ (cal)	{	-1.1 (45°C)
		43.4 (15°C)

2. E·FAD+S 状態より E·FAD...S 状態に至る熱力学的量

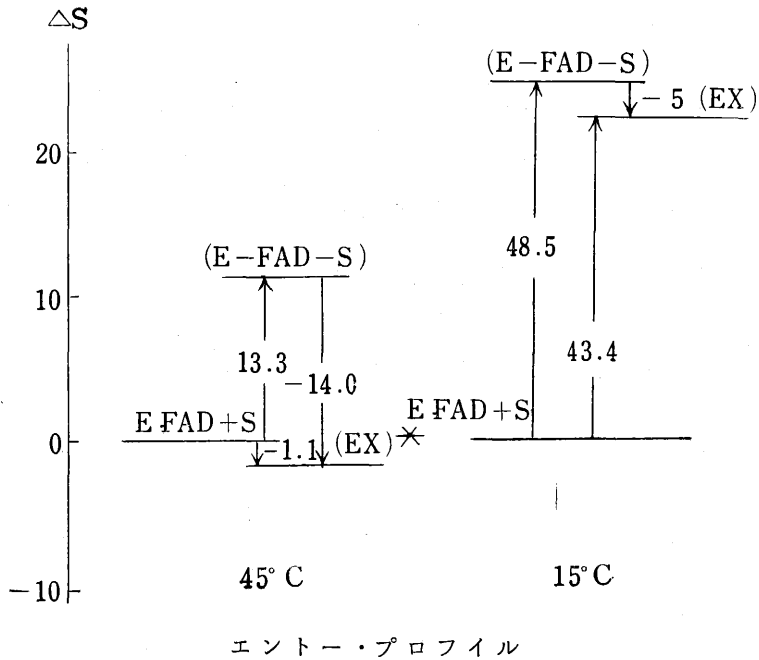
$\Delta H_{\beta/\alpha}$ (Kcal)	{	0 (30°C以上)
		11 (30°C以下)
$\Delta F_{\beta/\alpha}$ (Kcal)	{	-4.3 (45°C)
		-3.5 (15°C)
$\Delta S_{\beta/\alpha}$ (cal)	{	13.3 (45°C)
		48.5 (15°C)

4. E·FAD...S 状態より (EX)\* 状態に至る熱力学的量

$\Delta H^*_{\beta}$ (Kcal)	{	16.8 (30°C以上)
		21.8 (30°C以下)
$\Delta F^*_{\beta}$ (Kcal)	{	21.2 (45°C)
		20.4 (15°C)
$\Delta S^*_{\beta}$ (cal)	{	-14.0 (45°C)
		-4.0 (15°C)

〔結 果〕

エントロピー・プロフィールとして次図が得られる。



要約するとD-アミノ酸化酵素の反応を開始すべき前に経過せねばならない活性複合体 (Ex)\* の形成されるにはあらかじめ酵素-基質結合なる前過程を経なければならないといえる。

論文の審査結果の要旨

本論文はD-アミノ酸化酵素系での反応段階における状態の変化を量的に定める目的で、エントロピー変化を求めたものであり、酵素反応機序解析への拠りどころとなる一つのデータを提供している。すなわち、酵素反応にとって本質的な因子としての酵素蛋白による活性化の機構に対して、いろいろの測定法、表示法があるが、本論文では基質と酵素蛋白との結び付き、及び結び付いた後の励起状態の熱力学的な量を基として論じている。

D-アミノ酸化酵素系で、温度を  $4^\circ\text{C}$  から  $45^\circ\text{C}$  迄変化して酸素消費速度を測定し、ミハエリスメンソンの理論から各温度での最大速度、ミハエリス定数を算出、熱力学諸量を求めている。その成績のうち著明な事実はエントロピー変化についてである。基質と酵素との結び付きについては、 $45^\circ\text{C}$  では、13.3 e.u.,  $15^\circ\text{C}$  では 48.5 e.u. であり、活性化状態への移行のときは  $45^\circ\text{C}$  で -14 e.u.,  $15^\circ\text{C}$  で -5 e.u. となっている。要するに酵素反応の全過程のエントロピー変化は  $45^\circ\text{C}$  の方が  $15^\circ\text{C}$  よりも少ない。この点について著者は  $45^\circ\text{C}$  における酵素蛋白の秩序性を指摘している。これについての更に確実な傍証は今後にまたねばならないが、本論文で反応系の秩序性を指摘した点において学位論文の闕に達するものと考えられる。