



Title	好塩性アルデヒド酸化酵素の好塩性について
Author(s)	竹田, 美文
Citation	大阪大学, 1965, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28731
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	竹	田	美	文
	たけ	だ	よし	ふみ
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	第	6	9	1 号
学位授与の日付	昭	和	40	年 3 月 26 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 病 理 系 学位規則第 5 条第 1 項該当			
学 位 論 文 題 目	好塩性アルデヒド酸化酵素の好塩性について			
	(主査)		(副査)	
論文審査委員	教 授	藤野恒三郎	教 授	天野 恒久 教 授 川俣 順一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

生育のために、培地中に高濃度の塩類の存在を必要とする、偏性好塩菌は、菌体内にも高濃度のイオンを含むことがわかっている。このような偏性好塩菌より抽出した酵素が、塩類によって活性化される事実については、数多くの報告がある。しかし、その大部分は、粗酵素についての実験報告であり、塩類による活性化が、酵素タンパクそのものにかかわるものかどうかは明らかにされていない。わたくしは、さきに、片桐・清水が部分的精製を行なった好塩性アルデヒド酸化酵素を、更に精製し、精製酵素について好塩性を中心に種々の性質を調べ、好塩性が酵素タンパクそのものの性質であるかどうか調べた。

〔方法並びに成績〕

I 酵素の精製

1. 粗酵素液の抽出

10% の食塩を含む普通寒天培地を用い、48 時間培養した偏性好塩菌 No. 101 を、型の如く集菌、洗滌した後、M/100 EDTA 溶液に懸濁すると、容易に溶菌が起こる。これを更に Waring Blender を用い 5 分間粉碎し、遠心上清を粗酵素液とした。

2. 硫酸分画

粗酵素液 1 ml 当たり 350 mg の固体硫酸を加え、その遠心上清 1 ml 当たり 100 mg の固体硫酸を更に添加し、沈澱を少量の 0.3 M NaCl を含む M/5 Na-Phosphate Buffer pH 6.0 に溶かし硫酸分画とした。

3. 熱処理分画

60-65 °C 5 分間加熱し、遠心上清を熱処理分画とした。

4. 透 析

熱処理分画を、0.1 M NaCl を含む M/100 Na-Phosphate Buffer pH 6.0 に対して透析を行なった。

5. DEAE-Cellulose Column Chromatography

透析の結果生じた沈澱を除去した後、DEAE-Cellulose Column に Charge し、0.1-1.0M の NaCl Gradient Elution を行ない、活性部分を集めた。

6. DEAE-Sephadex Column Chromatography

DEAE-Sephadex Column を用いて再クロマトグラフィーを行なった。NaCl 0-1.0 M の Gradient Elution を利用し、活性部分を集めて、精製酵素とした。

II 精製酵素の酵素化学的性質

1. DEAE-Sephadex Column Chromatography の結果

酵素活性のピークと OD₂₈₀ によって測定したタンパクのピークがほぼ一致した。酵素活性は、Acetaldehyde を基質とし、2, 6-dichlorophenolindophenol を電子受容体として、2, 6-dichlorophenolindophenol の腿色を 550 mμ における吸光度の減少により測定した。

2. 酵素の比活性

粗酵素液の比活性は約 0.02 units/mg/min であるが、精製酵素では約 7.1 units/mg/min で約 350 倍の精製が出来た。収量は約 8 % であった。

3. 精製酵素の吸収曲線

280 mμ に吸収極大をもつほかに、410 mμ になだらかな吸収をもつ曲線を得た。

4. 精製酵素は、基質の存在下において、NAD, NADP を還元せず、また FAD, FMN の添加効果も認められなかった。

III 精製酵素の活性に及ぼす塩類の影響

1. NaCl の酵素活性に及ぼす影響

酵素活性は、NaCl の濃度に比例して直線的に増大し、4M 食塩溶液中では対照の約 5 倍の活性を示した。

2. NaCl 以外の影響

K⁺ は Na⁺ の 80 % 程度の活性化を示した。NH₄⁺ を含む塩類による活性化は、NaCl とほぼ同じであった。

IV 酵素の安定性に及ぼす塩類の影響

2M の NaCl の共存する場合と、共存しない場合に、精製酵素の熱安定性を調べた結果、2M の NaCl の共存する場合、70°C 20 分間加熱でも 80 % の活性を保つのに対し、NaCl の共存しない場合は、70°C 5 分間加熱で、活性が 20 % 以下になることがわかった。

失活した酵素は、NaCl の添加によっても活性の復活は見られなかった。

〔総 括〕

1. 偏性好塩菌から抽出した好塩性アルデヒド酸化酵素を、比活性 7.1 (約 350 倍) に精製した。
2. 精製酵素が NaCl をはじめ種々の塩類によって活性化されることを明らかにした。

3. 酵素の安定性に、塩類が重要な役割りを果たしていることがわかった。
4. 以上のことから、好塩性酵素の好塩性は、酵素タンパクそのものの性質であると考ええる。

論文の審査結果の要旨

高濃度のイオンを含んでいる偏性好塩菌の菌体から抽出した酵素が、高濃度の塩類によって活性化される事実については数多くの報告があり、好塩性酵素として広く知られている。しかし、現在までに報告されている好塩性酵素の実験の大部分は、粗酵素についての実験結果であって、好塩性酵素の好塩性の機序を十分に論ずることはできなかった。

本論文では、*Pseudomonas* に属する偏性好塩菌より抽出した好塩性アルデヒド酸化酵素を、比活性約 7 units/mg protein/min (約 350倍) に精製し、好塩性酵素の好塩性の機序について考察している。

今までのところ、好塩性酵素の好塩性の機序については、二つの考え方が提示されている。一つは Baxter らが部分的精製を行なったグリセリン脱水素酵素についての実験から推論したもので、次のような考え方である。すなわち、好塩菌の代謝活性には塩類が本質的に要求され、塩類は細胞内に入り込むことにより、菌体内の酵素を活性化し、酵素は精製の程度に関係なく好塩性を示す。一方、前野らは高度に精製したアルドース脱水素酵素の実験結果から、好塩性酵素の好塩性が酵素タンパク以外のタンパク性因子によって発現されると考えている。

本論文では高度に精製したアルデヒド酸化酵素を用いた実験を行ない、酵素の好塩性が、精製の操作によって変化しないことを明らかにし、好塩性酵素の好塩性が、酵素タンパクそのものにかかわる性質であることを立証して、Baxter らの考え方を支持する結果を示している。また、酵素活性の好塩性だけでなく、酵素の安定性についても、塩類が大きい役割りを果たしている実証を挙げている。要するに本論文は好塩性アルデヒド酸化酵素を高度に精製し、酵素タンパクの好塩性を明らかにした点に大きい意義があり、好塩性酵素のもつ好塩性機序の解明に新しいよりどころを提与したものと考えられる。