

Title	D-Arabinosoneの還元を促進するパン酵母中の酵素に関する研究
Author(s)	武田, 誠郎
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/28781">http://hdl.handle.net/11094/28781</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 【 2 】

氏名・(本籍)	武 田 誠 郎
	<small>たけ だ まさ お</small>
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 5 8 4 号
学位授与の日付	昭 和 39 年 7 月 31 日
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	<b>D-Arabinosone の還元を促進するパン酵母中の 酵素に関する研究</b>
	(主査) (副査)
論文審査委員	教 授 上原喜八郎 教 授 川崎近太郎 教 授 青沼 繁

## 論 文 内 容 の 要 旨

Osone の生化学的研究は、ほとんどが D-glucosone についてなされており、大別して次の3つの観点から研究がなされた。1つはその特有な毒性と、その原因と考えられる酵素作用阻害の面からの研究、2つには糖の代謝中間物としての見地からの研究、3つには糖に作用する酵素の基質特異性の研究である。しかし自然界で重要な役割を演じている5単糖の osone については生化学的研究はほとんどなされていない。上原らは osone が dicarbonyl 化合物であり、しかも aldose, ketose にきわめて類似していることに着目し、D-型の5単糖の osone である D-arabinosone について酵素化学的研究を行ない、次のような興味ある結果を得た。

まずパン酵母抽出液による D-glucose の嫌氣的醗酵に及ぼす D-arabinosone の影響を検べた。その結果 D-arabinosone には D-glucosone に見られるような阻害作用は見られず、D-glucose の醗酵の初期に見られる lag period を短縮し、炭酸ガスの発生を促進した。最終炭酸ガス発生量より、D-arabinosone が基質となって等モルの炭酸ガスを発生したと考えられる結果を得た。しかし酵母抽出液に D-arabinosone を加えてもこれが分解して炭酸ガスが発生することはなく、D-glucose の醗酵系に D-arabinosone を加えた時のみ分解された。D-arabinosone は、その還元を受けやすい化学構造から考えて、いったん酵素的に還元を受けて5単糖となり、その後分解されて炭酸ガスが発生すると考えた。また D-arabinosone のみでは分解されないのは、酵母抽出液に含まれる  $\text{NADH}_2$ ,  $\text{NADPH}_2$  などの水素供与体が少量であるためであり、D-glucose の分解に伴ってこれらの水素供与体が生成されてこそ D-arabinosone も分解されると考えた。

武田はこれらの考察にもとづいて、パン酵母抽出液中に  $\text{NAD(P)H}_2$  を水素供与体として D-arabinosone を還元する酵素が存在するかどうかを明らかにするために本研究に着手した。

pH 6.5 において D-arabinosone と  $\text{NADPH}_2$  に酵母抽出液を加えると 340  $\text{m}\mu$  における吸光度

の減少が見られた。このことから酵母抽出液中には  $\text{NADPH}_2$  を水素供与体として *D*-arabinosone の還元を促進する酵素が存在することが明らかになった。

この酵素を粗抽出液より硫酸分画法、アセトン分画法を用いて精製し、DEAE-セルローズカラムクロマトグラフィーを行なった結果、酵素活性が3つの蛋白画分に分れた。すなわち DEAE-セルローズにまったく吸着しない酵素と、吸着するが低い塩濃度の緩衝液で溶出される酵素と、強く吸着して高い塩濃度の緩衝液で溶出される酵素である。

これらの酵素による *D*-arabinosone の還元生成物をペーパークロマトグラフィーによって検出した結果、前2者は *D*-arabinosone から *D*-ribulose を生成し、後者は *D*-ribose と *D*-xylose を同時に生成することがわかった。これら2種の酵素は DEAE-セルローズカラムクロマトグラフィーによって完全に分離された。

*D*-Ribulose が生成する反応を促進する前2者の酵素は、反応至適 pH がいずれも 6.5 付近で、基質特異性も近似している。ただ DEAE-セルローズに対する親和性が異なるので蛋白構造に差異が推定され isozyme と考えられる。

これら2者の内 DEAE-セルローズに吸着しない酵素が量的に多いので、それをさらに DEAE-セファデックスを用いて粗抽出液より比活性約 130 倍に精製した。

この酵素は、すでに知られているラットの肝臓の aldehyde reductase, *L*-hexonate dehydrogenase, 羊の貯精囊の aldose reductase に近似しているので、この酵素を仮に“aldehyde reductase”と命名した。この aldehyde reductase は種々の osone のほか *DL*-glyceraldehyde, *D*-glyceraldehyde, *D*-erythrose, *D*-threose, *D*-glucuronolactone, benzaldehyde 等のアルデヒド基の還元を促進する。 $\text{NADH}_2$  は水素供与体とならなかった。Aldehyde reductase の pH 6.5 (反応至適 pH), 25 °C における  $K_m$  値は  $\text{NADPH}_2$  (*DL*-glyceraldehyde が基質の場合) に対して  $5.9 \times 10^{-6}$  M, *DL*-glyceraldehyde に対して  $3.4 \times 10^{-4}$  M, *D*-arabinosone に対して  $4.0 \times 10^{-3}$  M, *D*-glucosone に対して  $1.4 \times 10^{-3}$  M であった。この酵素は上述の aldose reductase, *L*-hexonate dehydrogenase と同様  $10^{-2}$  M の EDTA の作用を受けず、0.2 M  $\text{SO}_4^{--}$  により活性化された。

一方、*D*-arabinosone から *D*-xylose と *D*-ribose を生成する反応を促進する酵素を DEAE-セルローズの再クロマトグラフィーによって粗抽出液より比活性約 50 倍に精製した。

この酵素は *D*-arabinosone のほかに *L*-arabinosone, *D*-xylosone, *D*-glucosone に作用した。*L*-Ascorbic acid には非常に弱いながら活性を示した。しかし aldose, fructose, maltose, benzaldehyde, acetaldehyde には作用しなかった。また  $\text{NADH}_2$  は水素供与体とならなかった。基質特異性から、この酵素を仮に“osone reductase”と命名した。Osone reductase の反応至適 pH は 8.5 付近であった。 $K_m$  値は pH 8.5, 25 °C において  $\text{NADPH}_2$  (*D*-arabinosone が基質の場合) に対して  $1.1 \times$

---

略語： $\text{NADPH}_2$  = Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate,

$\text{NADH}_2$  = Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide,  $\text{NAD(P)H}_2$  =  $\text{NADH}_2$  or  $\text{NADPH}_2$ ,

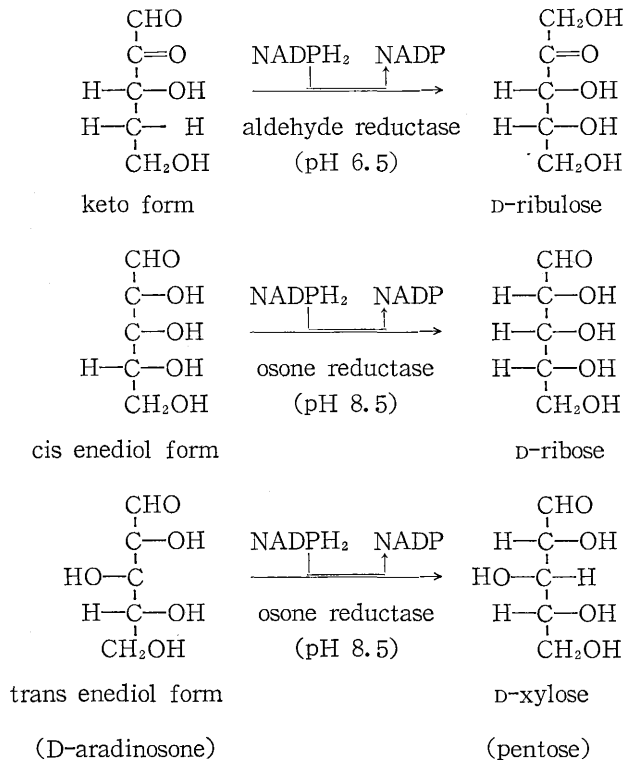
DEAE = Diethylaminoethyl, EDTA = Ethylenediaminetetra-acetate,

PCMB = *p*-Chloromercuribenzoate.

$10^{-5}$  M, D-arabinosone に対して  $2.0 \times 10^{-2}$  M, D-glucosone に対して  $2.4 \times 10^{-2}$  M であった。この酵素は  $2 \times 10^{-5}$  M の PCMB 及び  $10^{-2}$  M monoiodoacetate により顕著に阻害され、 $10^{-3}$  M の  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{+++}$  も 90~100% の阻害作用を示したことから、この酵素の活性発現に sulfhydryl 基が関与していると推定される。 $10^{-2}$  M の EDTA も顕著な阻害作用を示した。

Ozone reductase による  $\text{NADPH}_2$  の酸化が、酵素を加える前に、D-arabinosone にシアン化物を加えて  $40^\circ\text{C}$ , 1時間保つという前処理を行なうことによって、著しく促進される現象を発見した。この現象を利用して、上述の aldehyde reductase が共存している時に, ozone reductase の活性のみを測定しうる方法を考案した。

以上総括すると、パン酵母抽出液中には、D-arabinosone の還元を促進する異なった2種の酵素が存在することが明らかになった。現在これらの酵素による D-arabinosone の還元を下式のように推定している。



#### 論文の審査結果の要旨

オゾンに関する生化学的研究はほとんどなされていないが、特に D-アラビノオゾンに関しては全くないと言っても過言ではない。大阪大学薬学部生物薬品化学教室では先に D-アラビノオゾンがパン酵母抽出液によるブドウ糖の醗酵を促進する結果を得た。本論文に記載された研究はこの現象の機

構を解明するためになされたものであり D-アラビノオソンの還元を促進するパン酵母抽出液中の酵素の精製と性状を検べる目的でなされたものである。パン酵母抽出液中には還元型助酵素Ⅱ (NADPH<sub>2</sub>) を水素供与体とし D-アラビノオソンの還元を促進する酵素が大別して少なくとも二種類含まれている。一つの酵素は既に発表されている文献を参考にして仮にアルデヒド還元酵素と呼ぶことにしたが、このものの至適 pH は 6.5 でありこれが作用したときの還元生成物は D-リブローズらしく思われる。もう一つの酵素は仮に オゾン還元酵素と呼ぶことにしたが、その至適 pH は 8.5 でありこれが作用した時の還元生成物は D-リボースと D-キシロースらしく思われる。なお、この酵素による D-アラビノオソンの還元は D-アラビノオソン と青酸のアルカリ塩とを予め反応させた後であれば一層速やかに行なわれるという興味深い事実を発見した。

本研究の結果は D-アラビノオソンの生化学的研究の突破口となったものであり本論文は薬学博士の学位を授与するに十分な価値があるものと認める。