

Title	D-アミノ酸酸化酵素の無水コハク酸修飾に関する研究
Author(s)	山地, 建二
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29537
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	山 地 建 二 <small>やま ち けん じ</small>
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 4 0 0 号
学位授与の日付	昭 和 4 3 年 3 月 2 8 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
学位論文名	D-アミノ酸酸化酵素の無水コハク酸修飾に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 山 野 俊 雄 (副査) 教 授 中 馬 一 郎 教 授 萩 原 文 二

論 文 内 容 の 要 旨

〔研究目的〕

D-アミノ酸々化酵素 (DAO) の生理的意義はいまだ不明であるが、その高い組織内含量および高純度に精製の可能なことから、フラビン酵素のモデルとして、酵素化学的およびたんぱく化学的な見地よりいろいろな検討が加えられてきた。その結果、DAO は 2 つのサブユニットからなるダイマーであり、各サブユニットは FAD を 1 分子ずつ含む同種のペプチドであろうと予測されるに至った。しかしながら DAO も含めてフラビン酵素においては、まだ活性とサブユニットとの関係について、あまり詳しい報告が見られない。そこで著者は DAO のサブユニット構造に関する研究の一環として無水コハク酸修飾 (サクシニル化) を試み、修飾の詳細を調べるとともに、活性とサブユニットとの関係を追求しようとした。

〔実験材料および方法〕

酵素は豚の腎臓より、久保、山野ら、Massey らの方法に若干の修飾を加えて酵素-安息香酸複合体として精製し、ホロ酵素は過剰のアラニン存在下で Sephadex G-25 処理をして得た。アポ酵素は酸性硫酸処理を 3 回くり返しおこなって調製した。酵素-安息香酸複合体としては精製した標品をさらに 1% 安息香酸溶液に 10 時間透析したものをを用いた。

たんぱくの定量は Biuret 法および分光学的方法を併用し、酵素活性の測定は酸素電極法により 37°C でおこなった。

サクシニル化は L. F. Hass のアルドラーゼに対する修飾にならった。

アミノ基の定量はニンヒドリン反応、SH 基の定量は PCMB による滴定、チロジンの OH 基定量は 280 m μ の吸光度測定、によりそれぞれおこなった。

超遠心実験 (沈降速度法および沈降平衡法) には日立 UCA-1A 型分析用遠心機を、施光分散測定

には JASCO ORD UV-5 を使用した。

〔実験結果および考察〕

1) サクシニール化に際し、添加する無水コハク酸の量に応じて活性が低下し、ついにはまったく失活する。酵素たんぱくのアミノ基が修飾される割合と活性との関係は、酵素-安息香酸複合体、ホロ酵素、アポ酵素の三者で異っている。すなわち酵素-安息香酸複合体では活性減少の割合と側鎖アミノ基修飾の割合が平行であるが、ホロ酵素およびアポ酵素では活性の減少がよりすみやかに起こりアミノ基の修飾の割合との相関がくずれる。この傾向はホロ酵素よりアポ酵素に強い。

SH 基および Tyrosyl-OH はサクシニール化をうけず、活性低下とは無関係である。

酵素 1 分子あたり 1 分子のアミノ基が修飾をうけた状態では、酵素-安息香酸複合体ではなお 80% 以上の残存活性を有するが、ホロ酵素では 50% に、アポ酵素では 25% に低下する。このホロ酵素およびアポ酵素の急速な失活の原因は活性中心近傍の essential なアミノ基が修飾をうけたためと考えられる。

いっぽう、酵素-安息香酸複体の活性低下は Kinetics による解析から基質に対する K_m の増加、 V_{max} の減少によることがわかった。この場合、安息香酸は活性中心近傍の essential なアミノ基を protect しており、 K_m の増加は local な Conformational Change によるものと考えられる。

ホロ酵素およびアポ酵素では急速な失活のため、種々な解析が困難であるとわかったので以下の分子形態に関する実験はすべて酵素-安息香酸複合体によった。

2) 沈降速度法により沈降係数 ($S_{20, w}$) を求め、あわせて活性の有無の検討をしたところ、サクシニール化の程度により、native な状態を含めて次の 6 段階に分類できることがわかった。i) native な状態、6.8S、活性は 100%。ii) サクシニール化はされているが依然として 6.8S、活性 65~80%。iii) 6.8S と 3.1S の 2 peak の沈降像を示すもの、活性 50% 前後。iv) 6.8S が消失し 3.1S のみを示すもの、活性 30%。v) 3.1S で活性零の状態。vi) さらに大過剰に無水コハク酸を加えると 1.9S の 1 peak を示す。活性零。6.8S→3.1S→1.9S の変化が DAO 分子の分裂を意味しているかどうかを検討するため、沈降平衡法 (Yphantis の meniscus depletion method) により分子量を求めた。6.8S 92,000 3.1S 45,000 1.9S 44,000 なる結果を得た。すなわち 6.8S 成分は 3.1S 成分のダイマーであると考えられるが、1.9S 成分は 3.1S 成分がさらに分裂したものではなく、分子形態に大きな変化を生じたことを考えさせる。6.8S→3.1S がダイマーからモノマーへの解離を意味しているものとする、沈降速度実験の iv より明らかのように、DAO はモノマー自体が活性を有するものと考えられる。

3.1S→1.9S の変化が分子形態の大きな変化によるものであることは、施光分散測定による 233 m μ の比施光度の変化および粘度測定による結果からも強く示唆された。

〔総括〕

1) サクシニール化による活性低下の様子が、酵素-安息香酸複合体と、ホロ酵素およびアポ酵素とは異っていることを見出し、それぞれの原因について検討した。

2) サクシニール化によって活性を有するモノマーの状態が見出された。

3) 6.8S→3.1S はダイマーからモノマーへの解離を、3.1→1.9S は分子状態の大きな変化をそれぞれ

れ意味していることを明らかにした。

論文の審査結果の要旨

本研究によってこの酵素の活性域に無水コハク酸修飾に鋭敏な部位があること、安息香酸がその部位を修飾より保護することを見出した。また修飾によって活性のあるモノマーが生じることがわかった。さらに修飾が進むとモノマーの unfolding がおこることを見出した。この3つの事実の発見は高く評価できると考える。