

Title	D-アミノ酸酸化酵素のセミキノン
Author(s)	黄, 健周
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/29547">http://hdl.handle.net/11094/29547</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名・(本籍)	黄	健	周
	こう	けん	しゅう
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	1378	号
学位授与の日付	昭和43年3月28日		
学上授与の要件	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セミキノン		
論文審査委員	(主査)		
	教授	中馬	一郎
	(副査)		
	教授	山野	俊雄 教授 坂本 幸哉

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

Michaelis がフラビンの酸化還元電位測定中にフラビンがなかば還元されたセミキノン状態が存在すると提唱して以来、フラビン酵素の反応においてもセミキノンが形成され酵素反応に関与する可能性について非常な関心が払われてきた。D-アミノ酸々化酵素について、久保らは本酵素の反応過程で紫色の中間体が発見されたことを発見したが、この中間体はセミキノンならば示すはずの電子スピン共鳴吸収をほとんど示さなかった。

Massey らはこの中間体に可視光線を照射すると電子スピン共鳴吸収シグナルが検出されることを認めたが、これに先だてて教室の志賀らは酸化型酵素に可視光線を照射してもフリーラジカルが形成されることを報告している。著者はこのフリーラジカルについて、はたしてこれがセミキノンであるか否か、紫色中間体との関係、その形成のメカニズム、ならびに二、三の物理化学的性質を検索した。

#### 〔方 法〕

D-アミノ酸々化酵素は久保らの方法で調製し、酵素活性の測定は酸素電極法で行なった。光照射の光源には1KW タングステンランプを用い、紫外線除去のためUV フィルターを併用した。単色光の照射には同ランプを装備した Bausch & Lomb のモノクロメーターを用いた。

嫌気実験にはツンベルグ型キュベットを用い、真空ポンプで排気した。吸収スペクトルは島津IV-50A 自記分光光度計により、また電子スピン共鳴スペクトルは Varian V 4500 によって測定した。

#### 〔成 績〕

1, セミキノンの形成——嫌気状態でD-アミノ酸々化酵素に可視光線を照射すると、その吸収スペクトルは徐々に変化し、本酵素をグチオナイトで滴定して得られるセミキノンの吸収スペクトルに

近づく。これと平行して電子スピン共鳴吸収では G-2 附近にシグナルが出現する。両者を同時測定することにより吸収スペクトルの変化とシグナル強度間に直線関係が成立することが確かめられた。従って D-アミノ酸々化酵素は光照射によってセミキノンに変化することが明らかとなった。

2, セミキノンと紫色中間体との関係——照射光の波長を変化させ、これとセミキノン形成速度との関係からアクションスペクトルを求めたところ、酸化型 D-アミノ酸々化酵素の吸収スペクトルに一致した。このことから酵素中の酸化型フラビンが光によって励起され、これがさらにセミキノンに変化したことがわかる。また紫色中間体は、酸化型酵素、還元型酵素、D-アラニン、ピルビン酸、及びアンモニウムイオンなどが混在する平衡状態に存在すると考えられ、これに光照射を行うと、酸化型酵素がセミキノンとなり平衡の移動がおこると考えられる。光照射により形成されたセミキノンの吸収スペクトルはピルビン酸、およびアンモニウムイオンを加えても変化せず、また電子スピン共鳴吸収のシグナル強度および形状も変化しなかった。D-アラニンとセミキノンとの反応も非常に遅い。以上の結果から久保らの得た紫色中間体はセミキノンとは異なったものであるのみならず、相互に変化し得るものでもないことが判明した。

3, セミキノンの安定性——光照射により形成されたセミキノンは嫌気状態では非常に安定であり、0°C にて 40 時間放置しても、その吸収スペクトル及び電子スピン共鳴シグナルには変化が認められなかった。しかし酸素との反応性は非常に強く、空気を導入すると速やかに元の酸化型酵素に戻った。酵素活性は光照射前後で全く同一であり、光化学反応による酵素の失活は認められなかった。

4, セミキノン形成のメカニズム——遊離フラビンのセミキノン形成メカニズムは Gibson らによって既に報告されており、還元型フラビンと酸化型フラビンが反応してセミキノンが形成される。しかし D-アミノ酸々化酵素の場合には、光化学反応において電子供与体となることが知られている EDTA を添加し、微量の FAD を加えて、光化学的に還元型酵素を作り、これを酸素で滴定したがセミキノンの形成は認められなかった。また酵素濃度を変えて光照射を行ない、形成セミキノン量を測定したが、セミキノンの収率は酵素濃度に依存せず、各濃度において 70% であった。以上の実験事実及び嫌気状態でのセミキノンの安定性から、D-アミノ酸々化酵素のセミキノン形成メカニズムは遊離フラビンの場合とは異なり、酸化型酵素に直接一つの電子が入ってセミキノンが形成されるものと考えられる。

#### 〔総括〕

- 1, D-アミノ酸々化酵素は可視光線を照射すると酵素中の酸化型フラビンはセミキノンに移行する。
- 2, 紫色中間体はセミキノンとは異なったものであり、相互に変化し得ないものである。
- 3, D-アミノ酸々化酵素のセミキノンは遊離フラビンとは異なり、酸化型酵素に直接一つの電子が入って形成される。

## 論文の審査結果の要旨

本論文はD-アミノ酸化酵素の反応機構におけるセミキノンの存在および関与様式を追及し、次の結果を得ている。

1) D-アミノ酸化酵素に可視光線を照射すると、セミキノンを形成する。 2) 久保らの反応中間体はセミキノンとは異なったものであり、また相互に変化し得ない。 3) D-アミノ酸化酵素のセミキノン形成メカニズムは遊離フラビンの場合とは異なる。

これらの成績は斯学の発展に寄与するところ少なくないものと認める。