



Title	D-アミノ酸酸化酵素の光照射セミキノンのいくつかの性質とセミキノン形成に及ぼすピルビン酸及びフェニールピルビン酸の影響について
Author(s)	蘆田, 和彦
Citation	大阪大学, 1969, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29680
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、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)	蘆田和彦
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1621 号
学位授与の日付	昭和44年3月28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-アミノ酸酸化酵素の光照射セミキノンのいくつかの性質とセミキノン形成に及ぼすピルビン酸及びフェニールピルビン酸の影響について
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〕

D-アミノ酸々化酵素の酵素反応においてはセミキノンの存在は証明されていない。ところが、本酵素のジチオナイト還元や光還元によると、その経過中ではセミキノンが証明されている。酵素反応時の生成物であるピルビン酸などの存在のもとで、山野は本酵素をジチオナイト滴定してセミキノンを得ている。著者は、本酵素の代表的な酵素反応時の生成物であるピルビン酸とフェニールピルビン酸について、これが本酵素の光還元によるセミキノン形成に対し、どのような影響を与えるかを検索した。又このために、セミキノンの分子吸光係数を求め、ピルビン酸及びフェニールピルビン酸と酵素との複合体の解離定数を求めた。

〔方法〕

D-アミノ酸々化酵素は久保らの方法で調製し、酵素活性は酸素電極法により測定した。分光度計は Beckman DK-2 及び日立 EPS-2 を使用した。嫌気実験のためにツンベル型キュベットを用い、酸素は真空ポンプによる排気と窒素ガス置換とを繰り返すことによって取り除いた。光照射は 750W のタンクステンランプを使用し 5 cm 巾の10%硫酸銅溶液を硝子容器に入れたものをフィルターに用い、これによって紫外線及び赤外線を除去した。

〔成績〕

1. セミキノンの分子吸光係数——嫌気で D-アミノ酸々化酵素に光に照射して作ったセミキノンをメチレンブルーで滴定し、吸収スペクトルの変化から還元型のないことを確認して、セミキノンの分子吸光係数を算出した。このようにして得たセミキノンの吸収スペクトルはジチオナイト滴定より得られたものと一致した。ここで得た分子吸光係数を以下の計算に用いた。
2. ピルビン酸及びフェニールピルビン酸のセミキノン形成に対する影響——過剰のピルビン酸又は

フェニールピルビン酸の存在のもとで、嫌気的に D-アミノ酸々化酵素に光を照射するとセミキノンは得られなかった。添加するピルビン酸又はフェニールピルビン酸の濃度を変えたいくつかのサンプルで、光照射中の各時間における吸収スペクトルを求め、酸化型、Leuco 型、セミキノン型の濃度の時間変化を計算した。ピルビン酸又はフェニールピルビン酸の濃度の高いサンプルほど、Leuco 型の形成量が増し、セミキノン形成量が減少していった。各サンプルでの Leuco 型及びセミキノン型の濃度の時間変化から、これらの形成の初速度を求めた。

3. ピルビン酸又はフェニールピルビン酸と酵素との複合体の解離定数——ピルビン酸やフェニールピルビン酸は本酵素と酵素生成物複合体を作り、酵素の吸収スペクトルで、各々、 $490m\mu$ 及び $500m\mu$ に肩を作る。酵素をピルビン酸及びフェニールピルビン酸で滴定し、これらの波長における吸光度の変化から、複合体の解離定数を求めた。解離定数は pH 7.0, 20°C で、各々 $1.7 \times 10^{-2}M$ 及び $5.2 \times 10^{-5}M$ であった。
4. ピルビン酸又はフェニールピルビン酸の存在下でのセミキノン形成のメカニズム——添加するピルビン酸及びフェニールピルビン酸の濃度を変えて光照射した時の各サンプル中の遊離の酵素及び酵素生成物複合体の濃度を解離定数から計算した。遊離の酵素の初濃度とセミキノン形成の初速度との関係、及び複合体を形成している酵素の初濃度と Leuco 型形成の初速度との関係を各々プロットすると直線となった。したがって、光照射によって、遊離の酵素はセミキノンとなり、複合体を形成している酵素は Leuco 型になることが解明された。
5. Leuco 型の性質——Leuco 型はセミキノンにピルビン酸やフェニールピルビン酸を添加しても得られなかった。この Leuco 型は空気中に24時間放置しても酸化型には移行しなかったが、酢酸々性で熱処理を行うとフラビンの吸収が再現された。複合体から Leuco 型への反応の活性化エネルギーは、温度変化の実験から 17Kcal と算出され、セミキノンの活性化エネルギーの 5Kcal とは異った。したがって、Leuco 型は本酵素の單なる還元型ではなく、セミキノン形成とは異った系での光化学反応によって生じたと云える。

〔総括〕

1. 光還元によるセミキノンはジチオナイト滴定によるセミキノンと同一の吸収スペクトルを示した。
2. 本酵素は生成物と複合体を作っている時は、光照射を行っても安定なセミキノンを形成しない。

論文の審査結果の要旨

本論文は D-アミノ酸々化酵素のセミキノンについて次の結果を得ている。酵素反応生成物が本酵素のフラビン近傍に結合している場合は、光還元を行っても安定したセミキノンを形成しない。以上の成績は酵素反応経過中のセミキノン存在及び関与様式の解明に寄与するところ少くないものと認める。