

Title	グルコースオキシダーゼの分子構造に関する研究
Author(s)	吉村, 哲郎
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/30068
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【15】

氏名・(本籍)	よし 吉	むら 村	てつ 哲	ろう 郎
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	1930	号	
学位授与の日付	昭和45年3月30日			
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	グルコースオキシダーゼの分子構造に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授 伊勢村寿三			
	(副査) 教授 奥貫 一男 教授 成田 耕造			

論 文 内 容 の 要 旨

フラビン酵素は生体内の酸化還元・電子伝達作用をつかさどる重要な酵素であり、現在までその特異性や反応機構に関して多く調べられてきた。しかしながら、その一次構造や高次構造より機能を説明しようとする試みはあまりなされていない。

しかるに、フラビン酵素の一般的性質に注目すると、フラビン酵素はその多くが比較的高い分子量を有し、フラビンあたりの分子量が類似するので、フラビン酵素分子の構造、特に四次構造、ならびにフラビン分子の結合状態をその四次構造との関連において調べることは、フラビン酵素の構造と機能との関係を理解するのに欠かすことができないと考えられる。それ故、グルコースオキシダーゼを材料とし本研究を行なった。そしてその結果よりグルコースオキシダーゼのおおまかな分子構造モデルを提案した。

(1) *Penicillium amagasakiense* 菌株培養液からグルコースオキシダーゼを精製するにあたってその改良法を検討し、DEAE-セルロースを用いる精製法を確立した。その結果、超遠心的、電気泳動的に単一の標品を得た。精製の結果、本酵素は二酵素成分に分離され、この二酵素成分の存在について若干考察した。

(2) 本酵素のサブユニット構造を解明するため、変性剤等によるサブユニットへの解離条件について検討した。そして、生の状態における分子量、サブユニットに解離された場合の分子量を沈降平衡法を用いて解析し、グルコースオキシダーゼは158,000なる分子量を有し、分子量45,000をもつポリペプチド鎖4本から成ること、2分子のモノマーが1本のS-S結合によりダイマーを形成し、そのダイマーが2分子非共有結合で会合してテトラマーを構成していることを明らかにした。

(3) 上記解離条件を用いて、サブユニットへの解離、構造変化、FADの遊離、S-S結合の

開裂等に対する変性剤の濃度依存性を調べ、それらの相関関係よりFADの結合状態とサブユニット分子構成との関連性につき検討を加えた。その結果、2分子のFADはグルコースオキシダーゼのサブユニット間に位置し、それぞれ4個のサブユニットと相互作用をもって結合していること、S-S結合およびFAD分子は cooperative な作用をもってそのサブユニット間会合の安定化に寄与していることが示唆され、グルコースオキシダーゼの機能発現に対するサブユニット間相互作用の重要性が推察された。

論文の審査結果の要旨

フラビン酵素については co-factor であるフラビンに注目した速論的および分光学的研究は少なくないが、補欠分子族たるフラビンと蛋白質との結合および四次構造に関する研究はきわめてすくない。本研究は将来のフラビン酵素の作用機構の解明にあたって四次構造を明らかにすることは必須であるとして行なわれた。

本研究はフラビン酵素であるペニシリウム・アマガサキエンスの産生するグルコースオキシダーゼについてその精製、四次構造の推定、フラビンジクレオチド (FAD) の結合状況などについて研究したものである。

まずグルコースオキシダーゼの精製にあたっては、従来の精製法を廃し、DEAE-セルロースを用いる方法を確立しきわめて純度の高い標品を得ることに成功した。この酵素は2成分に分離されるが、成分は組成的に区別のできない第2成分に移行する。この研究はもっぱら第一成分について行われた。

この酵素がサブユニット構造を有することを明らかにするため、変性剤による解離条件を検討した。この酵素は元来生の状態では沈降速度法および沈降平衡法によって求められた沈降定数および分子量は、それぞれ $S_{20w}^0=7.5S$ および mol. wt=158,000 である。しかるに pH 3.0 で 6M 塩酸グアニジン中で処理したところ、それぞれ 3.3S, 81,300 となり、明らかに2分することがわかった。さらに pH 8.0 で 6M 塩基グアニジン中で 0.3M のメルカプトエタノールで処理するときは、 S_{20w}^0 は 2.8S に、分子量は 45,000 となり、ここに4本のポリペプチド鎖より構成されている蛋白質であることがわかった。この酵素1分子には2個の-SH基が存し還元酵素分子には6個の-SH基が測定せられるのでポリペプチド鎖2本宛がジスルフィド結合で結合し、それが2個非共有結合でテトラマー形式の分子を形成していることが明らかにされた。

次にフラビンの結合状態であるが、これを適確に決定することはなお多くの困難がある。本研究ではサブユニットへの解離、構造変化、S-S結合の開裂等に対する変性剤濃度による依存性などより、FADの結合状態とサブユニット分子構成との関連を推定した。すなわちFADがサブユニット間に介在し、4個のサブユニットと相互作用をもって結合していること、S-S結合およびFAD分子は協同的な作用をもってサブユニットの会合に寄与していることを類推した。

以上吉村君の研究は、フラビン酵素の4次構造に関し多くの実験事実にもとづいて一つの提案をしたもので、蛋白質化学上興味ある結果であり、理学博士の学位論文として価値あるものとみとめる。