The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	D-アミノ酸酸化酵素の反応機構に関する研究 : 反応の多様性とサブユニットの解離会合
Author(s)	安部, テル子
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32020
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

【55】

氏名・(本籍)	安部テル子
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4134 号
学位授与の日付	昭和53年2月2日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**D-アミノ酸酸化酵素の反応機構に関する研究** **——反応の多様性とサブユニットの解離会合——**
論文審査委員	(主査) 教授 山野 俊雄 (副査) 教授 萩原 文二 教授 和田 博

論文内容の要旨

〔目　的〕

D－アミノ酸酸化酵素の反応機構に関しては，すでに数多くの研究がなされているが，補酵素フラビン・アデニン・ジヌクレオチド（FAD）の酸化還元を含む酵素反応機構，酵素蛋白の反応に伴う変化，生理的な意義などの詳細について，今なお不明な点が多い。本研究は，モデル基質β-クロル-D-アラニンを用いた場合の酵素反応機構を，従来よく用いられているD－アラニンを基質とした場合と比較し，その差異について検討して，本酵素の反応機構を追求する。また，分子篩法により，本酵素の四次構造，特にその動的状態における変化について検討する。

〔方法ならびに成績〕

D－アミノ酸酸化酵素ホロ酵素およびアポ酵素は豚腎皮質より精製した。酵素活性は酸素電極法により，また酵素濃度は，結合FADの455nmにおける分子吸光係数$11.3\times10^{3}M^{-1}cm^{-1}$を用い，それぞれ定量した。

反応中における補酵素FADの変化については，β-クロル-D-アラニンと従来よく用いられているD－アラニンを基質として用い，生ずるスペクトル変化や，迅速走査分光法およびstopped flow法による反応初期の分光学的変化を好気および嫌気状態で観察し，反応の差異を比較検討した。またそれぞれの基質の本酵素に対するミハエリス定数(K_m)，およびD－アラニンを基質とした酵素反応に対する各種炭素数の異なる脂肪酸およびその塩素誘導体の阻害定数(K_i)は，反応動力学的に，これら脂肪酸の本酵素との解離定数(K_D)は，分光学的にそれぞれ求めた。

酵素蛋白の四次構造については，基質D－アラニン，拮抗阻害剤である安息香酸および活性中心近

傍のリジン残基と結合するピリドキサールりん酸（ＰＬＰ）の存在，非存在下でのセファデックスＧ－100カラムクロマトグラフィーを行い，本酵素の溶出のされ方(V_e)を調べ，molecular sieve coefficient[$\sigma=(V_e-V_o)/V_i$]と展開した酵素の濃度との相関を解析した。

得られた結果は次のとおりである。

[1]　Ｄ－アミノ酸酸化酵素はβ-クロル－Ｄ－アラニンを基質とした場合，好気反応で，ピルビン酸，H_2O_2, NH_3を生じ，反応過程で酸素消費が観察された。酸素消費反応から得られたミハエリス定数は3.3mMでＤ－アラニンの場合と同一であったが，最大反応速度はＤ－アラニンを基質とした場合の約¼であった。

[2]　本酵素とβ-クロル－Ｄ－アラニンの反応ではＤ－アラニンを基質とした場合には見られない経時的な酸素消費反応速度の低下が観察された。この現象は基質濃度の増加，グルタチオンの添加で抑制され，また，低下時点での基質の添加により酸素消費の回復があった。

[3]　好気反応開始後約10秒前後で，380nm, 445nmに吸収極大，465nmに肩を示し，500nmより長波長域に弱い巾広い吸収帯を有する緑色中間体特有のスペクトルが出現した。この中間体はＤ－アラニンを用いた場合には観察されないものである。

[4]　嫌気反応において，β-クロル－Ｄ－アラニンによる本酵素の還元過程で，500nmより長波長域に弱い巾広い吸収帯をもつが，その他の可視波長域では酸化型酵素に似たスペクトルを示す中間体を生じ，その後，徐々に還元型酵素に移行したが，その間にＤ－アラニンを用いた時に観察される紫色中間体は出現しなかった。NH_3存在下では，この紫色中間体は観察されたが，その生成には２時間を要した。

[5]　クロル酢酸およびβ-クロルプロピオン酸のK_Dはそれぞれ2mM, 1.3mMであり，酢酸およびプロピオン酸のK_Dに比して著しく小さく，また，β-クロル－ｎ－酪酸のK_Dも0.1mMであった。これら脂肪酸塩素誘導体はＤ－アラニンを基質とした場合，酵素反応を拮抗的に阻害し，クロル酢酸，β-クロルプロピオン酸およびβ-クロル－ｎ－酪酸のK_iは，それぞれ25mM, 6.6mM, 1.7mMであった。

[6]　高濃度のホロ酵素をセファデックスＧ－100カラムクロマトグラフィーを行った場合，V_eから算出されるσ値は安息香酸あるいはＤ－アラニンの存否にかかわらず，0.12であり，十分低濃度では0.35に近づいた。$\sigma=0.12$，$\sigma=0.35$は，それぞれ分子量90,000および45,000に相当した。この現象のみられる４mg蛋白/ml以下の酵素濃度で，アポ蛋白のσ値は常に0.35であった。Ｄ－アラニンあるいは安息香酸存在下では，酵素濃度を２mg蛋白/ml付近にしてもσ値は0.12を保ち，それ以下の濃度で急激なσ値の上昇があり0.35に近づいた。安息香酸共存下ではσ値の上昇はＤ－アラニン共存下より低濃度で観察された。リジン残基修飾試薬としてのＰＬＰ存在下ではまったく逆であり，４mg蛋白/ml付近の酵素濃度ではσ値がホロ酵素よりも大きく，この場合もやはり酵素濃度を下げるに従い，σ値が0.35に近づいた。

〔総　　括〕

(1) β-クロル－Ｄアラニンを基質とした場合の好気反応の結果から，本酵素は酸化的脱アミノ反応のほかに，β-離脱反応を触媒することが示された。

(2) 好気反応および嫌気反応において，D－アラニンを基質として用いる場合には観察されない中間体が出現した。

(3) 分子篩法による実験では，ホロ酵素の単量体—2量体平衡は，D－アラニン存在下で2量体形成に傾いた。

論文の審査結果の要旨

D－アミノ酸酸化酵素は従来その名のとおりオキシダーゼとして知られている。今回著者はβ-クルD－アラニンを用いてオキシダーゼ反応のほかに，反応生成物の同定からエリミネーション反応の存在を見出した。

さらにこの基質のエリミネーション反応に関すると思われる酵素反応中間体複合体を分光的に観察し，上記エリミネーション反応の機作を推定した。本酵素の生理的意義を探求する上でも，本酵素反応の多様性を見出した意義は大きいと判断される。