

Title	共有結合型フラビンを含むSchizophyllum communeのコレステロール酸化酵素の精製と性質について
Author(s)	福山, 美穂
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32136
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	福 山 美 穂
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 4 5 7 1 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	共有結合型フラビンを含む <i>Schizophyllum commune</i> のコレステロール酸化酵素の精製と性質について
論文審査委員	(主査) 教授 山野 俊雄 (副査) 教授 和田 博 教授 松本 圭史

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

Cholesterol を酸化するバクテリアの存在は1950年代より知られており、近年までに多数の微生物より単離精製が試みられている。さらに、血中Cholesterol 定量に有効であることから、分析方法、基質特異性などに関しては急速かつ詳細に研究がなされているが、酵素の分子的性質、反応機構についての研究はあまりなされていないのが現状である。著者は、分子レベルでの酵素の性質を解明するため、まず、Cholesterol を ligand とする affinity gel を開発し、これを用いた酵素の精製を検討し、さらに、精製酵素の一般的性質を調べるとともに、とくに、特徴的であった補酵素“共有結合型フラビン”についてその性質を検討した。

[方法ならびに成績]

Affinity gel の調製ならびに酵素の精製 Affinity gel は、ethylenediamine を spacer として、3-0-succinylcholesterol を agarose gel に共有結合させ、調製した。

この affinity gel を用いることにより、本酵素を電気泳動的・超遠心的に単一な標品に精製することができた。

酵素学的性質 酵素活性は酸素電極を用いて基質酸化に伴う酸素消費速度より求めた。本法より精製酵素は cholesterol を基質として $60 \mu\text{mol O}_2 \text{ consumed/min/mg of protein}$ の比活性を持ち、みかけの K_m 値は 0.33 mM であった。

既知のコレステロール酸化酵素とは次の点で差が認められた； 1) 至適 pH は 5.0 付近(既知のものでは 7.0 付近)であった。 2) 基質特異性に関して、 $3\beta\text{-OH}$ 基を有する sterols のうち、ergoste-

rolはまったく酸化されなかったが, dehydroepiandrosterone, pregnenolone, lanosterol は緩慢ではあるが酸化された, 3) 基質 sterol 溶解のため, detergent (Triton X-100, deoxycholate (Na salt)) を用いた場合, 酵素は不活性化された。Ethyl alcohol を用いた場合は, その濃度は, 10%まで酵素活性に影響しなかった。

分子量ならびにアミノ酸組成 本酵素の分子量は SDS-電気泳動法より 5.3 万, 沈降平衡法より 4.6 万であった。また, ゲル透過の結果, 本酵素がモノマーとして存在し, さらに, アミノ酸分析より, 分子量 5.3 万あたり 483 コのアミノ酸残基を有すると算出された。

分光学的特質 本酵素の吸収スペクトル (吸収極大: 274, 353, 455nm 485 (sh) nm, pH4.0), ケイ光スペクトル (ケイ光極大: 526nm) は, 典型的なフラビン酵素のものであった。また, 嫌気条件下で基質として DHA* を加えた場合, 還元型酵素の吸収スペクトルを示した。

補酵素フラビンの性質と構造 このフラビンは, 酸, 煮沸, 6 M塩酸-グアニジン, 界面活性剤などの処理によっても酵素タンパクより遊離せず, trypsin, chymotrypsin による消化で酸抽出可能となった。このフラビン成分は, 単離精製後, フラビン第二吸収帯の浅色効果の特徴とする吸収スペクトルを与え, フラビンペプチドとして存在し, また nucleotide pyrophosphatase 処理で 5'-AMP を遊離したので FAD 型 dinucleotide と考えられる。また, このペプチドの緩和な加水分解 (6 N HCl, 95°C 16hrs) により, クロマトグラム (薄層クロマトグラフィー, 高圧口紙電気泳動) 上, FAD, FMN, riboflavin と異なる挙動を示し, かつ pH によるケイ光の消光 ($pK_a = 5.1$) をうけるフラビンが得られた。このフラビンは, 既知の共有結合型フラビン (dephosphorylated form) のうち, thiamine dehydrogenase に観察されている 8α -[N(1)-histidyl]-2', 5'-anhydroriboflavin の挙動によく似ており, さらに, histidyl flavins の標品との比較より 8α -[N(1)-histidyl]-2', 5'-anhydroriboflavin と同定された。

[総括]

基質 cholesterol を 3β -OH 基のところで固定化した affinity gel は, コレステロール酸化酵素の精製に有効で, 簡単迅速に電気泳動上単一の状態に酵素を精製することができた。精製酵素の分子量は, 電気泳動法より 5.3 万, 沈降平衡法より 4.6 万のモノマー酵素であった。至適 pH, 基質特異性, 界面活性剤の影響, において既知のコレステロール酸化酵素と異なる性質を示した。本酵素において, FAD が補酵素として触媒活性に関与するが, 一般のフラビン酵素と異なり, この FAD は, 酵素タンパクに共有結合しており, その構造は, 酵素タンパク中, 1 コのアミノ酸残基 histidine の imidazole ring の N(1) の位置に FAD の isoalloxazine ring の 8 位の炭素が共有結合した, いわゆる, 8α -[N(1)-histidyl]-FAD であることが明らかになった。

* Dehydroepiandrosterone

論文の審査結果の要旨

コレステロール酸化酵素は臨床診断上血清コレステロール定量などにも利用され最近注目されてきているが、著者は本酵素のアフィニティゲルによる精製法の確立ならびに酵素反応機構の解明などに成果をあげた。とくに特異な共有結合型FADが存在し反応に関与していることを見出したのはコレステロール酸化酵素研究上重要な知見を与えるものであり、またそのフラビンの性質をしらべ構造を同定したことはフラビンの分野における研究に重要な貢献をなすものである。