

Title	D-アミノ酸酸化酵素の逆反応過程における機構について
Author(s)	松下, 尚司
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32859">https://hdl.handle.net/11094/32859</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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)	まつ 松	した 下	しょう 尚	じ 司
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	5141	号	
学位授与の日付	昭和55年12月22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逆反応過程における機構について			
論文審査委員	(主査) 教授	山野 俊雄		
	(副査) 教授	坂本 幸哉	教授	和田 博

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

D-アミノ酸酸化酵素は、D-アミノ酸を酸化的脱アミノ化反応を触媒し、 $\alpha$ -ケト酸とアンモニアを生成する酵素でFADを補酵素にもつ。本酵素は非常に古くから研究されているにもかかわらず、その生理的意義、物理化学的性質、反応機構等に関して今なお不明の点が多い。いっぽう本酵素はフラビン酵素の中ではもっとも詳しく研究されているものの一つであり、かつ代表的フラビン酵素の一つとみなされており、その反応機構を調べることは、フラビン酵素一般の統一的反応機構を知る上できわめて重要である。

本酵素と基質アナログである $\beta$ -クロル-D-アラニンとの好気反応では、通常酸化反応（生成物として、クロルピルビン酸と、アンモニアを与える）と、 $\alpha$ ,  $\beta$ 脱離反応（ピルビン酸、アンモニア、塩酸を与える）とが同時に進行することが知られているが、本研究では、本酵素の逆反応を、アンモニア共存下、クロルピルビン酸を基質アナログとして用いておこない、その反応中間体と生成物の同定をおこなってその結果を解析して逆反応の機構を解明し、同時に、正逆両反応を包括する反応機構を提出する。

#### 〔方法ならびに成績〕

ブタじん臓D-アミノ酸酸化酵素（酸化型）に逆反応の基質アナログのクロルピルビン酸、アンモニア共存下、室温、好気条件下で反応を開始した。反応開始直後には、酵素・安息香酸型吸収スペクトルがあらわれ、徐々に変化し30分後に、安定で特有のスペクトルが得られた。このスペクトルは、長波長側の550-700nm領域に電荷移動（Charge Transfer : CT と略す）相互作用に起因する幅広い

吸収帯によって特徴づけられる。このスペクトルは正反応である $\beta$ -クロル-D-アラニンの好気条件下での反応中間体のスペクトルに一致した。このCT型反応中間体を確認する目的でこれを $\text{NaB}^3\text{H}_4$ で還元しその $^3\text{H}$ のとりこみをみた。反応後、高圧ろ紙電気泳動法、液体シンチレーションカウンターにより $^3\text{H}$ ラベルされた $\beta$ -クロルアラニンが確認された。この事実は本中間体にはイミノ酸すなわち $\alpha$ -イミノ- $\beta$ -クロルプロピオン酸が含まれていることを示している。またこの時の酵素はスペクトルから判断すると、酸化型でイミノ酸とのCT複合体を形成していると考えられる。そこで、逆反応を完結させその最終生成物を確認する目的で、まず $2\text{-}^{14}\text{C}$ -クロルピルビン酸、アンモニア共存下、好気条件下で反応中間体を生成させ、ジチオナイト、またはEDTA、3-メチルルミフラビン共存下での光還元のいずれかの方法で、嫌気条件下で還元した。この際の反応生成物の同定は、アミノ酸、ケト酸についてそれぞれ高圧ろ紙電気泳動を行い、呈色反応による易動度の確認と放射活性の検出によって行った。その結果 $^{14}\text{C}$ ラベルされたアミノ酸としては、 $\beta$ -クロルアラニンのみで、アラニンは認められなかった。ケト酸に関しては、逆反応の出発物質の $2\text{-}^{14}\text{C}$ -クロルピルビン酸に放射活性が認められたのみであった。また本酵素なしの対照実験では、 $\beta$ -クロルアラニンの生成は認められずこの事実から本酵素の逆反応は完結し、かつその反応生成物は、正反応の基質である $\beta$ -クロルアラニンであることが見いだされた。

#### [総括]

本研究の逆反応においては、正反応時のような塩素イオン脱離反応が見られない事実は、反応機構の解明には重要である。このことは、Walshらの主張とは相容れない。すなわち本研究では、正反応時に塩素イオン脱離、酸化の両反応は共通のカルバニオン型反応中間体を經由するというWalshの仮説とは相容れない結果が得られた。これらの事実にもとづき次の様な反応機構を提唱することができる。 $\beta$ -クロル-D-アラニンと、本酵素との正反応では、二つの競合する協奏的過程を経て脱離反応、酸化反応が進行するという新しい反応機構である。すなわち、酸化反応では $\alpha$ -水素のひきぬきと、フラビンへの電子の流れがみられる。もう一方の脱離反応では、 $\alpha$ -水素のひきぬきと、塩素イオン脱離がおこる。したがって共通の反応中間体を經由することなく協奏的にすすむというのが本機構である。この機構によれば本研究の結果のみならず、Walshらの結果も矛盾なく説明できる。

### 論文の審査結果の要旨

D-アミノ酸酸化酵素については、これまでよく知られたD-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応触媒のほかに、脱離反応を触媒することが最近知られるようになった。著者はこれらの触媒反応の機構を知るために、脱アミノ、脱離両反応の過程をとりうる $\beta$ -クロロピルビン酸を逆反応の基質として用い、その中間体および逆反応生成物を同定した。生成物はクロロアラニンのみであった。この結果は脱アミノ反応と脱離反応は、カルバニオンを共通の中間体とするのではなく、2つの別々の協奏的反應の経路を辿るという仮説を証明することになった。

以上の結論は本酵素の反応機作を探求する上において、寄与するところが大きいと評価される。