

Title	ビタミンB6の分解に関する酵素 : 2種のN-アセチルアミド加水分解酵素の精製と性質について
Author(s)	資延, 美智子
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34998
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/>

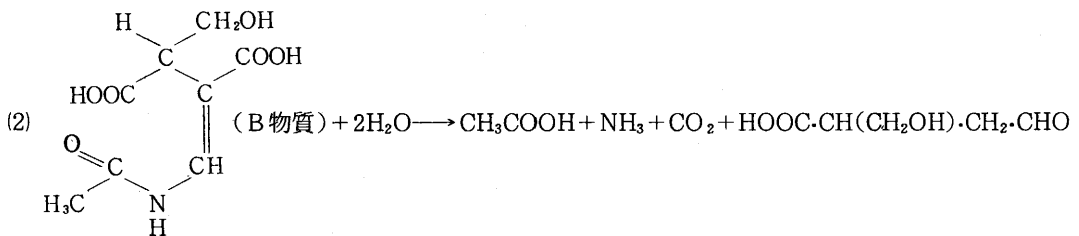
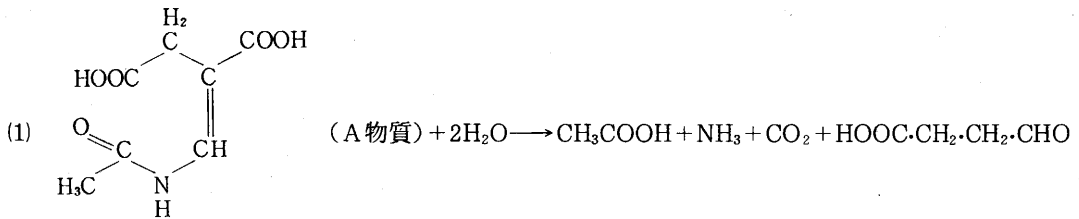
Osaka University

氏名・(本籍)	すけ のぶ みちこ 資 延 美 智 子
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 6 9 1 1 号
学位授与の日付	昭 和 6 0 年 5 月 8 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	ビタミンB ₆ の分解に関する酵素 — 2種のN-アセチルアミド加水分解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 坂本 幸哉 教授 和田 博

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

2種の異なるピリドキシン分解経路が、ピリドキシンを唯一の窒素及び炭素源として生育する数種類の細菌に見い出されている。α-(N-アセチルアミノメチレン)コハク酸(A物質と略す)は、Pseudomonas MA-1に生じる経路において、最初に検出されるピリジン環が開環した分解産物である。α-ヒドロキシメチル-α'-(N-アセチルアミノメチレン)コハク酸(B物質と略す)はPseudomonas IAとArthrobacter Cr-7に生じるもう1つの経路中で最初の開環物質である。これらは、(1)と(2)の反応により、それぞれ酸加水分解をうける。



両物質は各々の細菌から部分精製された酵素標品によって加水分解され、これらと同様の生産物が生じたが、この反応が単一の酵素によるものかどうか、まだ明らかではない。この問題を明らかにするため、私達はPseudomonas MA-1からA物質加水分解酵素を、Arthrobacter Cr-7からB物質加水分解酵素を純粋になるまで精製し、性質を検討、比較した。

(方 法)

Pseudomonas MA-1とArthrobacter Cr-7は0.2%ピリドキシンを唯一の窒素及び炭素源として含む培養液中で、30°Cで培養した。

A物質加水分解酵素と、B物質加水分解酵素はPseudomonas MA-1とArthrobacter Cr-7から、それぞれ、超音波によって細胞を破壊した後、硫酸アンモニウムによる分画、ポリミンP、又は、デキストランT500とポリエチレングリコール6000の水性二相分配による核酸除去を経て、DE52カラム、セファデックスカラム、フェニルセファロースカラムなどを用いて精製した。

両酵素活性は、A、B両物質が紫外部に強い吸収をもち、生産物には、そこに吸収がないことを利用して、A物質加水分解酵素については、50mM MES緩衝液、pH 6.5中で261 nmにおける吸収の減少を、B物質加水分解酵素については50mM Tris溶液、pH 7.0中で262.5 nmにおける吸収の減少を25°Cで経時的に測定した。A及びB物質の各々の波長における分子吸光係数は、それぞれ $18,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と $17,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。

(成 績)

両加水分解酵素は、SDSポリアクリルアミド電気泳動と蛋白変性なしのディスク電気泳動で単一のバンドを示すまで精製された。

A物質加水分解酵素は、単量体で分子量は約32,500であり、そのN末端アミノ酸はAspである。B物質加水分解酵素は、おそらく6個の相同なサブユニットからなる多量体で、分子量は、約205,000サブユニットの分子量はSDS電気泳動より約36,600であり、そのN末端アミノ酸はGlyである。この2種の酵素は全く異なるアミノ酸組成を示すが、どちらもAsxとGlxを多く含み、Trpを欠いている。どちらもpH 5以下で不安定で70°Cで1分間熱処理しても安定である。A物質加水分解酵素の等電点は4.4で、pH 6.5、25°CにおけるKmは3.3 μM 、Vmaxは3.1 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ であり、A物質以外には、類似の基質は見出されていない。B物質加水分解酵素の等電点は4.2で、pH 7.0、25°CにおけるKmは25 μM 、Vmaxは3.8 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ であり、この酵素はA物質もゆっくりと加水分解する。両酵素は亜硫酸に強く阻害されるが、その機序は、まだわかっていない。また、どちらの酵素も、ジ及びトリカルボン酸で拮抗的に阻害され、中でも、基質と考えられる反応中間体と構造の似たイタコン酸が最も強い阻害を示す。両酵素とも、セリン蛋白分解酵素阻害剤では、阻害されないが、水銀化合物に対する感受性は、A物質加水分解酵素の方がはるかに高い。純粋な、A物質加水分解酵素による、A物質の加水分解のストイキオメトリーは、酸加水分解のそれと全く同じであった。

(総 括)

A及びB物質加水分解酵素を単離することによって、それぞれの加水分解反応は単一の酵素によって生じること、そして、その生産物は酸加水分解による生産物と同じであることがわかった。これらの加

水分解反応によって、初めて、分解経路中に、代謝に利用される一般的な物質、すなわち、酢酸、アンモニア、二酸化炭素、コハク酸セミアルデヒド又はその α -ヒドロキシメチル誘導体が生じ、これらの細菌は、ピリドキシンを唯一の窒素及び炭素源として利用し、生育することができる。

これら2種の加水分解酵素は、異なる細菌に生じ異なる基質特異性や、分子量を示すが、サブユニットの大きさ、等電点、pHや温度に対する安定性、実験をおこなった条件下でのターンオーバー数などは類似している。以上より両酵素は、その構造が大きく異なっているにもかかわらず、反応や性質は高度に類似しているといえる。

論文の審査結果の要旨

微生物における2種類のビタミンB₆酸化分解経路の最後の段階を触媒する加水分解酵素は、酵素学的にも不明な点が多かったので、Pseudomonas MA-1から α -(N-アセチルアミノメチレン)コハク酸加水分解酵素を、Arthrobacter Cr-7から α -ヒドロキシメチル- α' -(N-アセチルアミノメチレン)コハク酸加水分解酵素をそれぞれ単離精製し、その性質を明らかにした。これにより、微生物における2種のビタミンB₆酸化分解経路のほぼ全様が明らかとなった。

この報告は、学位に値するものとして評価できると考えられる。