

氏 名 ( 本 籍 )                      にし              むら              やす              ひろ  
西              村              安              弘

学 位 の 種 類                      医              学              博              士

学 位 記 番 号                      医   博   第   6 5 0   号

学 位 授 与 年 月 日                      昭 和 4 5 年 3 月 2 5 日

学 位 授 与 の 要 件                      学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 專 門 課 程                      東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 課  
( 博 士 課 程 ) 内 科 学 系 專 攻

学 位 論 文 題 目                      *Rhodopseudomonas spheroides*  
( ロ ド シ ユ ウ ド モ ナ ス ・ ス フ エ ロ イ デ ス ) の  
可 溶 画 分 に 存 在 す る  $\alpha$  - ケ ト グ ル タ ー ル 酸 脱  
炭 酸 酵 素 に つ い て

( 主 査 )

論 文 審 査 委 員 教 授 荒 川 雅 男 教 授 菊 地 吾 郎

教 授 立 木              蔚

## 論 文 内 容 要 旨

R. Spheroides はポリフィリン並びにバクテリオクロフィル合成能が高い事で知られている。R. Spheroides の  $\delta$ -アミノレブリン酸合成酵素は可溶性酵素であり、又本菌の可溶画分にはサクシニール C<sub>0</sub>A 合成酵素も高い活性で存在する。さらに、R. spheroides では通常の  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素とは別で、可溶画分にも  $\alpha$ -ケトグルタル酸からサクシニール C<sub>0</sub>A を形成する酵素系があることが推定されており、R. spheroides の音波処理後の抽出液には、その他に、可溶性のサクシニルセミアルデヒド脱水素酵素および可溶性の  $\gamma$ -ヒドロキシ酪酸脱水素酵素があることが明らかにされている。

そこで著者は現象的には、本菌の音波処理抽出液の 105000 × 9 遠心上清に見出される  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素活性が本来可溶性の独立酵素であるのか、或いは音波処理によつて、クロマトフォアに結合している  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素系から遊離して来たものであるかを鑑別する目的で、本活性の細胞内局在について、さらに詳細な検討を行つた。また可溶画分に見出される本酵素を部分的に精製して、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素の諸性質を調べた。

先づ、本酵素の細胞内局在を明らかにするための実験として、生菌 R. spheroides をリゾチーム処理後、オスモティックショックにより溶菌し、105000 × 9、90 分の遠心で、可溶画分と顆粒画分とに分離した。このような柔軟な方法で分画した 105000 × 9 の遠心上清にも大量の  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素活性があつた。しかもこの場合、一般に顆粒画分にしか存在し得ないとされている。コハク酸脱水素酵素を顆粒成分の指標にして、活性を測定してみると、その混在は極めて少量であり、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素活性に比して、無視し得る程度であつた。次にリゾチーム処理後の 105000 × 990 分の遠心上清を硫酸分画してみると、硫酸飽和度 0.3 ~ 0.4 の所に殆んど  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸活性が集中していた。一方、同じリゾチーム処理後の 105000 × 990 分の遠心沈殿の方を緩衝液に懸濁して、テフロンホモジナイザーで充分破壊した後音波処理し、さらに 105000 × 990 分遠心して得られる上清を硫酸分画してみると硫酸飽和度 0.3 以下の所に  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素活性がかなり大量に回収された。このことは本来顆粒画分に存在する筈の  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素系も顆粒画分を音波処理すると、それが極めて微小に細粉され、遠心 105000 × 990 分の上清にかなりの量が出現してくることを示唆している。

そこで、顆粒画分の音波処理後、105000 × 9 遠心上清に回収された活性が、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素系そのものであるか、あるいはそれがさらに破壊されて、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素を遊離しているのかどうかをしらべるために、この画分の活性を DEAE セルロースカ

ラムを用いて本来の可溶画分に見出される活性と分離比較を試みたが、両者の溶出パターンは全く同一であつた。

以上の事実を総合すると、第一に、本菌には本来可溶性の $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素が存在すると思われること、第二に、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体のサブユニットの一つである $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素と可溶画分に存在する $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素とは極めて性質が似ているか、或いは同じである可能性が強いことが明らかとなつた。

次に、*R. sphaeroides*の $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素の性質を明らかにするために、その部分精製を試みた。菌を音波処理后、 $105000 \times g$ で90分間遠心、その上清を硫酸分画し、DEAEセルロースカラムにかけると、 $105000 \times g$ 上清に比して、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素活性は10倍ないし20倍になつた。本反応の経過を追跡してみると、サクシニクセミアルデヒド生成量は反応時間に対して、120分までは直線的に進行した。本反応の至適pHは7.2であつた。十分な活性を得るにはTPPおよび $Mg^{++}$ の添加が必要であり、反応は過剰の $\alpha$ -ケトグルタル酸によつて若干阻害された。DTT或いは2-メルカプトエタノール等のSH保護剤は $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸活性を高めた。特にDTTは著効を示した。

なお、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素は $\alpha$ -ケトグルタル酸とグリオキシル酸との共役分解をも触媒することが知られた。また、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素の反応は過剰の $\alpha$ -ケトグルタル酸によつて若干阻害されるために、 $\alpha$ -ケトグルタル酸- $1-^{14}C$ の濃度を変えて得られるLineweaver-Burkのプロットは直線にならなかつたが、グリオキシル酸 $10 \mu$  molesの存在下で、 $\alpha$ -ケトグルタル酸- $1-^{14}C$ の濃度を変えて調べた $\alpha$ -ケトグルタル酸・グリオキシル酸カルボリガーゼに関するLineweaver-Burkのプロットでは直線となつた。このことは、グリオキシル酸が存在すると $\alpha$ -ケトグルタル酸の代謝が促進されるのみならず、過剰の $\alpha$ -ケトグルタル酸による反応阻害も失われることを意味する。

## 審 査 結 果 の 要 旨

*Rhodopseudomonas spheroides* (*R. spheroides*) のポルフィリン生合成に関する研究の一部であり、特に *R. spheroides* の可溶分画に  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素の存否およびその由来を重点的に研究したものである。

このために生菌をリゾチーム処理、オスモテック ショックにより溶菌し 10 5,0 0 0 g, 9 0 分遠心し可溶分画と顆粒分画とに分けて、検討するに、可溶分画にも多量の  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素の活性が存在していることがみとめられた。

また上述の遠心上清を硫酸分画して  $\alpha$ -kg 活性をみるに、硫酸飽和度 0.3 ~ 0.4 の部に、集中していた。一方遠心沈澱物をテクロンホモジナイザーにて充分破壊し、更に超音波処理し、ついで 10 5,0 0 0 g, 9 0 分遠心してえられる上清について硫酸分画を行い、 $\alpha$ -kg 活性をみるに、硫酸飽和度 0.3 以下に、大量に集中していることをみとめた。このことは、本来顆粒分画に存在するはずの  $\alpha$ -kg 脱水素酵素系も、顆粒分画を超音波にて処理すると、それがきわめて微小に細分されて、遠心上清にかなりの量として回収されることを示す。

さてこの活性が、 $\alpha$ -kg 脱水素酵素系そのものであるか、またはそれが破壊されて  $\alpha$ -kg 脱炭酸酵素を遊離したものかをみるために、D E A E セルローズで分画を行つてみると、本来可溶分画に存在する  $\alpha$ -kg 脱炭酸酵素と全く同一であるという可能性がたよいと考えられた。

また、更に本当に存在するといわれていた  $\alpha$ -ケトグルタル酸・グリオキシール酸カルボリガーゼ活性は、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素そのものの作用で、低かからないことも判明した。