

311

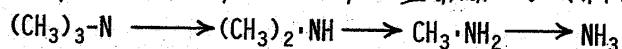
アミン類の微生物による酸化分解 — *Aspergillus niger* のアミン酸化酵素のたんぱく化学的性質ならびに酵素の固定化

(京大食研) ○熊谷英彦, 岸本憲明, 山田秀明

(愛知コロニー研究所) 鈴木春男

(京大工化) 虎谷哲夫, 藤村元輝, 福井三郎

1. 目的 アミン類は, 有機窒素化合物の中でも生理活性の強い物質であり, 中には肝臓などの臓器障害の原因となったり, 発ガン性の示唆されているものもある。演者らは土壤分離菌, *Candida* WY-3株が, N-メチルブチルアミンまたはトリメチルアミンなどの, 2級または3級アミン類を単一窒素源として良好に生育することを見い出した。本菌はこれらアミン類を酸化的に脱メチル化し, 1級アミンとしたのちさらにこれを酸化的に脱アミノ化し, 生成するアンモニアを窒素源として利用していることを明らかにした。(次式参照)



この分解過程の最終段階を担っているアミン酸化酵素は, 演者らが *Aspergillus niger* のカビ類に見い出し, 結晶状に単離している。本報告は, このアミン酸化酵素を用いて有害なアミン類を分解除去することを目的とし, その原理的研究を行なったものである。

2. 方法・結果 i) アフィニティークロマトグラフによる精製; 種々の鎖長のジアミンとCNBrセファロース4Bと結合させて得たω-アミノアルキル-セファロースのうちで, ω-アミノヘキシルセファロースに本酵素は特異的に吸着され, 基質ブチルアミンを含む緩衝液により溶出された。酵素の活性部位を予めMBTH, フェニルヒドラジン等のカルボニル試薬で修飾するか, あるいは, $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ で還元すると吸着能を失ったことから, 吸着は生化学的親和力によるものと考えられる。この担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより, 粗酵素液を約9倍に精製できる。

ii) たんぱく化学的性質; 以前, 沈降平衡法により測定した本酵素の分子量は252,000であったが, 今回ゲル過渡法により得た値は約260,000であった。塩酸グアニジン塩酸存在下での超遠心分析において本酵素たんぱくは単一性を示し, サブユニットの分子量は約137,000であった。SDS存在下での超遠心およびDisc電気泳動においても, 本酵素は単一たんぱくとして挙動し, SDS-Disc電気泳動法により求めたサブユニットの分子量は125,000であった。また本酵素は分子量/20,000あたり1原子の銅を含むことが, 原子吸光法により確認された。さらに, カルボキシペプチターゼAによるC-末端分析により, C-末端にはロイシンが, またDNP化法により, N-末端にはアラニンが, それぞれ1分子あたり2分子存在することが明らかになった。これらの結果はいずれも本酵素が分子量120,000~130,000の同一のサブユニット2つから成るダイマーであることを示唆している。アミノ酸分析の結果, 本酵素はサブユニットあたり約1000個のアミノ酸残基から成ることが明らかになった。サブユニットあたりのシステイン残基の数は, 12~13であり, そのうち5~6残基がフリーのシステインとしてSH試薬により滴定された。

iii) 固定化とその応用; 本酵素をCNBr-セファロース4Bと反応させて得た固定化アミン酸化酵素は, Nativeな酵素とほぼ同様の基質特異性を示した。また本固定化酵素のカラムにアミン溶液を通過させることにより, 溶液中のアミンを定量的に分解しうることを明らかになった。