The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | インドール化合物の核酸化に関する研究　6-Hydroxyindole酪酸の酵素的形成について |
| Author(s) | 那須, 範三 |
| Citation | 大阪大学, 1961, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/28285 |
| 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。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【41】

| | |
|---|---|
| 氏　名・(本籍) | 那　須　範　三（な す はん ぞう） |
| 学位の種類 | 医　学　博　士 |
| 学位記番号 | 第　180　号 |
| 学位授与の日付 | 昭和36年3月23日 |
| 学位授与の要件 | 医学研究科生理系<br>学位規則第5条第1項該当 |
| 学位論文題目 | **インドール化合物の核酸化に関する研究**<br>6-Hydroxyindole 酪酸の酵素的形成について |
| 論文審査委員 | (主　査)<br>教授 早石　修　(副　査)<br>教授 今泉　礼治　教授 須田　正巳 |

## 論文内容の要旨

研究目的

1931年市原らが Scatorylhydantoin を家兎に投与すると，その尿が酸性のままで Diazo 反応赤色を呈することを認め，最近酸性 Diazo 反応赤色は 5-及び 7-Hydroxyindole 化合物に発現し特に 7-Hydroxyindole 化合物に特異的であることが認められ，且つ Indole 醋酸を基質にしたときに 7-Hydroxyindole 醋酸が酵素的に形成されることが報告されている。

一方最近 J.B. Jepson らは我々の成績を追試し，Tryptamine から 6-Hydroxytryptamine が形成されることを Paperchromatography で認めている。

著者は更にインドール化合物の核酸化及び酸性 Diazo 反応の本体を明らかにするために Indole 酪酸（IBAと略す）を基質にし，これに健常家兎の肝臓より調製した酵素液を作用させその反応液中より酸性 Diazo 反応赤色呈色物質を結晶の形に分離し同定した結果，その本体は6-Hydroxyindole 酪酸（6-OHIBAと略す）であることが明らかとなった。

尚このインドール核の水酸化に関係する酵素系は，肝臓ミクロソームに存在し，Mitoma らの認めた TPNH を必要とする非特異的水酸化酵素であり，生体内解毒代謝に関与しているものと考えられる。

研究方法

1．酵素液の調製：健常家兎を完全脱血死させ，肝臓剔出後海砂で磨砕，M/15 Tris-buffer (PH7.8) で1時間抽出，600xg10分間遠沈の上清部を更に18.000xg 30分間遠沈の上清部を酵素液として用いた。尚肝臓剔出後の操作は凡て低温で行った。

2．酵素反応の条件：酵素液100mlに対し反応基質として IBA 500mg を加え，更に TPNH generating system の基質として Citrate 20mg を加え，37°C 30分間振盪しながら反応を行った。

3．反応生成物の処理：反応液は PCA で除蛋白し，エチル・エーテル抽出，エーテル層を蒸発乾固，再

び水に溶かし，この水溶液とクロロホルムとで向流分配操作法を応用して精製を行い，エタノールと水とで結晶化及び再結晶を行った。

研究結果

3g の IBA から約20mg の反応生成物の結晶を得ることが出来た。この結晶は緑色を帯び粉末状で融点164°Cであり，このものと合成 6-OHIBA とについて種々の性質の比較検討を行った。

各種溶媒による Paperchromatography では両者の Spot は全く同じ Rf 値を示し，共に酸性 Diazo 反応で直ちに赤色を，Ehrlich 氏 aldehyde 反応で直ちに青色を，Folin-Ciocalteu 氏 phenol 試薬で青色を，又アルカリ性 $AgNO_3$ の還元反応を示した。又 Amberlite IRC-50 (H型) を用いて Columnchromatography を行ったが，夫々の溶出される Fraction の位置は全く一致した。著者の得た結晶の元素分析値は Hydroxyindole 酪酸の理論値とよく一致し，又赤外スペクトルでは Imino 基，Carboxyl 基及び Benzene 部に更に置換基を有していることが認められた。

発色試薬として酸性 Diazo 液及び Ehrlich 氏 adehyde 液で発色させた溶液の可視部の吸収曲線をみると酵素的生成物も合成 6-OHIBA も共に 525m$\mu$(赤色)及び 615m$\mu$ (青色) に最大吸収を示し，5-及び 7-Hydroxyindole 化合物の発色とは多少態度を異にしている。又種々の Hydroxyindole 化合物の紫外部吸収曲線（縦軸を log$\varepsilon$ で表す）を比較した結果，著者の得た標品と合成 6-OHIBA とは全く同じ特徴（277.5m$\mu$ と 297m$\mu$ とに極大吸収をもつ）をもち，明らかに4-，5-及び7-Hydroxyindole 化合物の紫外部吸収曲線のもつ特徴とは異っていることが確められた。

結　　論

1. IBA を基質にし，これに健常家兎の肝臓より調製した酵素液を作用させ反応液中より酸性 Diazo 反応赤色呈色物質を結晶状に分離することに成功し，そのものの同定を行った。

2. 著者の得た結晶が 6-OHIBA であることを合成標品と比較した結果明らかにした。このことから酵素的に IBA の Benzene 部の6位に水酸化がおこることが明らかになり，又酸性 Diazo 反応は 6-Hydroxyindole 化合物にも発現することがわかった。

## 論文の審査結果の要旨

1931年市原らは Scatorylhydantoin を投与した家兎尿が酸性のままで Diazo 反応赤色を呈することを認め，最近 7-Hydroxyindole 化合物がこの反応に特異的であることを報告し，更に Indole 酢酸を基質にしたとき 7-Hydroxyindole 酢酸が酵素的に形成されることを認めた。一方 J.B.Jepson は Tryptamine から酵素的に 6-Hydroxytryptamine が形成され，且つこれが酸性 Diazo 反応を発現することを報告している。そこで著者は Indole 化合物の核酸化及び酸性 Diazo 反応の本体をより明らかにするために，Indole 酪酸を基質にし，これに家兎肝酵素を働かせた場合に形成される酸性 Diazo 反応赤色呈色物質を結晶の形に分離し同定を行った。

酵素反応は Indole 酪酸を反応基質にし，これに家兎肝抽出液を加え，更に TPNH generating system の基質として Citrate を添加して37°C，30分間振盪しながら反応を行い，その反応除蛋白液よりエチル

・エーテル抽出，クロロホルムと水による向流分配操作により精製を行い,最後にエタノールと水により，3gm の Indole 酪酸より約 20mg の酸性 Diazo 反応赤色呈色物質の結晶を得た。

分離結晶は緑色を帯びた不定形の粉末状で，融点164°であり，エタノール，エチル・エーテル，醋酸エチル，アセトンによく溶け，ベンゼン，石油エーテルには不溶である。元素分析では Hydroxyindole 酪酸の理論値とよく一致，赤外スペクトルでは合成 6-Hydroxyindole 酪酸のそれとよく一致した。Paper-chromatography では合成6-Hydroxyindole 酪酸と比べて Rf 及び各種呈色反応は全く一致し，Amberlite IRC-50 による Columnchromatography でも合成標品と全く同じ態度を示した。酸性 Diazo 反応及び Ehrlich 氏 Aldehyde 反応で発色した溶液の可視部吸収は共に酸性 Diazo 反応では 525mμ，Ehrlich 氏 Alldehyde 反応では615mμに最大吸収をもち，且つ吸収曲線の形が一致する所から同じ発色態度を示していると考えられる。紫外部吸収は 6-Hydroxyindole 化合物に特有の曲線を示し，且つ合成6-Hydroxyindole 酪酸の紫外部曲線と全く一致した。

以上の結果を総括すると，Indole 酪酸を基質にした場合，酵素的に形成される酸性 Diazo 反応赤色呈色物質は，種々の点で合成 6-Hydroxyindole 酪酸に一致する。このことより周知の 5-Hydroxyindole 化合物以外に 6 位の核酸化が酵素的に行われることを明らかにした。