The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	蟻酸活性化反応に関する研究
Author(s)	中川, 八郎
Citation	大阪大学, 1961, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28299
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【39】

氏　名・(本籍)	中川八郎（なかがわはちろう）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 178 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 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**蟻酸活性化反応に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 須田 正巳　(副査) 教授 西沢 義人　教授 天野 恒久

論文内容の要旨

目　　的

蟻酸は ATP の存在下に THFA (TetrahydrofolicAcid) と反応して 10-CHO-THFA となり C-1. 供与体として重要な生体反応に関与していることが最近明らかにされた。此の際下式の如く ATP は，

$$HCOOH+ATP+THFA \xrightleftharpoons{Mg^{++}} 10-CHO-THFA+ADP+Pi \cdots\cdots\cdots\cdots 1)$$

ADP とオルト燐酸とに分割するが，此の反応の機構については，Whiteley 等が細菌から精製した酵素を使用して，先ずATP による THFA のN^{10} の位置の燐酸化，次いで燐酸化された中間物と蟻酸との反応と言う二段階の反応を経て活性化がおこると報告している。

しかし，一般的な脂肪酸の活性化機構をみると，カルボキシル基が ATP により活性化を受け，細菌ではアシル燐酸，動物や酵母ではアシル AMP となるが，蟻酸については，此の種の活性化反応は未だ見出されていない。そこで私は，蟻酸にも一般の脂肪酸と同様で，しかも Whiteley 等の酵素と異なる機構を持つ ATP 関与の蟻酸活性化酵素の存在の可能性を検討したが，実際に此の種の蟻酸活性化反応が大腸菌に存在することをつきとめ，当該酵素の分離精製に成功し，その反応機序をも明らかにした。ここに蟻酸活性化酵素(私共は本酵素をその性質から Formokinase と命名した。) の精製及びその諸性質をも併わせて報告する。

方　　法

酵素源として大腸菌 B株のアセトン乾燥粉末を使用した。蟻酸の活性化はヒドロオキシルアミンの存在下に生じたフオルモヒドロオキサム酸を Schweet の方法によって分光光学的に定量した。燐酸は Fiske and SubbaRow の方法。又ヌクレオタイドは Cohn and Caretr の方法に従って定量した。特に ATP の定量に関しては。新しく考案した Acetokinase 法を併用した。フオルミル燐酸は鈴木（歯，生化）によ

り Dibenzylphosphochloridate と無水蟻酸から合成された標品を使用した。

結　　果

（i）酵素精製。酵素は大腸菌B株のアセトン乾燥粉末から蒸溜水で抽出しこれから次の段階をへて精製した。即ち，(1)アセトン処理(45～60%画分)。(2) 燐酸カルシウムゲル処理。(3) 硫安—セルローズカラムクロマトグラフィー(53～58%飽和画分)及び(4)アセトン処理 (50～55%画分) 等の段階をへて50～60倍に精製することが出来た。

（ii）反応機序。蟻酸の活性化反応には ATP が絶対不可欠であり， GTP が若干の活性を示す以外，UTP，ADP，AMP 等は ATP に代り得ない。

金属の影響は非常に特徴的で Mn^{++} を加えなければ全く活性を示さない。 Mg^{++} は同濃度の Mn^{++}の¼の活性を示すに過ぎず，Zn^{++}，Ni^{++}，Co^{++} 等の Divalent ion の効果は全く認めらたない。

又，Formokinase は所謂 SH 酵素で， 精製酵素については，最大活性を示す為には，還元型グルタチオン，メルカプトエタノール等の SH 化合物の添加を必要とする。又， 粗酵素は PCMB， $HgCl_2$ 等の SH 阻害剤によって阻害される。

至適 PH は6.9である。

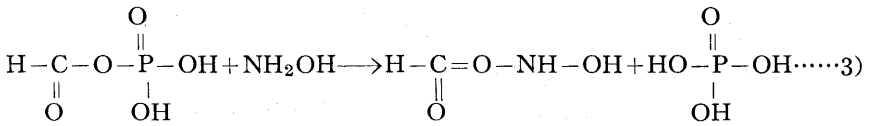
粗酵素を Dowex-1 (cl^-) 或いは活性炭で処理しても失活を見ないから，この蟻酸活性化反応には葉酸や CoA の関与は考えられない。

(iii) 反応中間物の固定。此の酵素反応の中間物の性質を知る為に，先ず蟻酸， ATP 及びヒドロオキシルアミン存在下に生ずる $Fecl_3$ 発色物質の分離をペーパークロマトグラフィーを行って， これがフオルモヒドロオキサム酸であると固定した。このことは中間物がフオルミル燐酸乃至フオルミル AMP であり，これがヒドロオキシルアミン反応してヒドロオキサム酸を形成したことを示唆する。しかし中間物が活性炭に吸着されない，又此の反応の Stoichiometry を調べるとフオルモヒドロオキサム酸の形成量と略々等量の ADP の形成と， 無機オルト燐酸の遊離が認められる。等の実験成績から真の中間物がフオルミル燐酸である事が強く支持された。更に本酵素が化学的に合成されたフオルミル燐酸と ADP からATPを形成する反応を触媒する事を実証しフオルミル燐酸が中間物であることを明確にした。

この逆反応も，正反応と同様に Mn^{++}を必要とする。以上の実験成績から Formokinase は次の反応を触媒することが明らかとなった。

$$HCOOH + ATP \xrightleftharpoons{Mn^{++}} \text{Formylphosphate} + ADP \cdots\cdots 2)$$

この際ヒドロオキシルアミンが存在すると次の様にフオルモヒドロオキサム酸を形成する。



$$H-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-O-\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{OH}{|}}{P}}-OH + NH_2OH \longrightarrow H-\underset{\underset{O}{\|}}{C}=O-NH-OH + HO-\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{OH}{|}}{P}}-OH \cdots\cdots 3)$$

フオルミル燐酸　ヒドロオキシルアミン　フオルモヒドロオキサム酸　燐酸

(iv) 他の諸性質。この精製段階の Formokinase は尚 Acetokinase を混在するが，(1) 精製がすすむに従って両酵素の比活性の比が異なって来ること， (2) 金属の関与の仕方が異なること，等の点から両者は明らかに異なる酵素である。

Formokinase は大腸菌以外でも Aerobacter aerogenes, Pseudomonas fluorescens, Clostridium welchii 等の微生物に広く分布する。

総　　括

(1) 大腸菌B株から葉酸の関与しない新しい型の蟻酸活性化酵素 (Formokinase) を見出し，その部分的精製に成功した。

(2) 本酵素は ATP, Mn^{++} 及び SH 化合物を必要とする。

(3) この蟻酸活性化反応の中間物はフオルミル燐酸であると同定した。

(4) 本酵素は Acetokinase とは異なる酵素である。

論文の審査結果の要旨

蟻酸は所謂 one carbon compound 代謝の中心物質として，生体内で重要な役割をしていることはよく知られていたが，この物質の代謝機構については近年葉酸誘導体が関与することが明らかになった。著者は脂肪酸活性化機構に着目し，蟻酸にも一般の脂肪酸と同様に直接 ATP による活性化反応が存在すると言う想定の下に研究をすすめ，全く新しい型のこの種の酵素反応が存在することを細菌体から分離した酵素を用いて実証すると共に，当該酵素を高度に精製し，その反応機序をも明らかにし，Formokinase と命名した。

著者の研究に使用した酵素源は大腸菌B株のアセトン乾燥粉末であり，これより(1)蒸溜水による抽出。(2)アセトン分画(45～60%分画)。(3)燐酸カルシウムゲル処理。(4)硫安分画(0.53～0.58飽和画分)。(5)アセトン分画(50～55%画分)から或る5段階の処理により，酵素は50～60倍に精製された。

本酵素反応はATP を必要とする。他のヌクレオタイドについては GTP が若干の反応促進効果を有する以外，殆んど影響を示さない。又，金属イオンの関与も特異的で，Mn^{++} は著しい活性促進効果を有するが，同濃度のMg^{++} は Mn^{++}の¼程度の効果を示すに過ぎず，他の Divalent ion (Zn^{++}, Co^{++}, Ni^{++}) は全く影響を表わさない。

本酵素は又，所謂 SH 酵素で精製酵素が最大活性を示すには SH 化合物の添加を必要とする。又，粗酵素は P-chloromercuribenzoate, $HgCl_2$ 等の SH 阻害剤により完全に阻害され，この阻害はシステインの添加により完全に回復する。

Dowex-1 (cl^-) 及び活性炭で処理しても，殆んど失活しないことから考えて，この蟻酸活性化反応には葉酸或いは CoA の関与を否定することが出来る。反応の至適 PH は6.9である。

この反応の中間物の同定は本研究の最も重要な点の一つであるが，著者はヒドロオキシルアミン存在下に生じた蟻酸と ATP の反応物がフオルモヒドロオキサム酸であることをペーパークロマトグラフィーにより同定し，更に酵素反応に於ける stoichiometry を調べ形成されたフオルモヒドロオキサム酸と略々等モルの ADP 形成と無機オルト燐酸の遊離を証明すると共に，ピロ燐酸が認められない実験成績から，反応の真の中間物がフオルミル燐酸であることを裏付けた。一方 Mn^{++} の存在するとき化学的に合成したフオルミル燐酸と ADP から ATP を形成する逆反応も同一酵素によって証明することが出来た。この

実験成績は蟻酸活性化の際に生成する物質がフオルミル燐酸であることを示している。

精製酵素中に尚 Acetokinase を混存するので，本酵素（Formokinase）が独自の酵素であることを主張する為には，両酵素の異同性を明らかにする必要がある。著者の見出した事実によれば (1) Formokinase の精製がすすむに従って Acetokinase の本酵素に対す比活性の比が次第に減少してくる。(2)硫安分画に際して両酵素の分布が異なる。(3) 金属イオンの関与の仕方が異なる。（Acetokinase は Mn^{++} 或いは Mg^{++} の何れによっても同程度に活性化される。）

以上の事実は Formokianse と Acetokinase とは異なる酵素であることを強く示唆する実験成績である。以上著者の研究によって，従来酢酸以上の炭素鎖を有する脂肪酸にのみ認められていた ATP の直接関与する活性化反応が蟻酸にも存在することが明らかにされると共に，蟻酸の活性化反応が見出された以上，蟻酸が如何なる構構で one carbon unit の transfer に関与するかを明らかにする手がかりともなり，今後この方面の発展に重要な知見を提出したものである。