



Title	ウロカニン酸の酸化分解 同位体トレーサーを用いてのウロカニン酸酸化分解機構の研究
Author(s)	垣内, 史朗
Citation	大阪大学, 1960, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28300
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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

【 1 】

氏 名・(本籍)	垣 内 史 朗 かき うち し ろう
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 120 号
学位授与の日付	昭 和 35 年 5 月 4 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	ウロカニン酸の酸化的分解 同位体トレーサーを用いてのウロカニン酸酸 化分解機構の研究 (主 査) (副 査)
論 文 審 査 委 員	教 授 市 原 硬 教 授 須 田 正 己 教 授 今 泉 礼 治

論 文 内 容 の 要 旨

梗 概

Histidine は脱アミノして UCA^(*)となり、これは更に水解的に IPA^(*), FAG^(*)を経てグルタミン酸に分解することが知られているが、これとは別に当教室では細菌及び肝酵素を用いて UCA が酸化的に分解することを発見した。その酸化分解生成物として市原, 須田, 内田, Brown 等は琥珀酸ウレイド, HAA, KGAA, HPA^(*)等を単離し、又酸化分解の機構について市原らはH₂O₂にて prime される Peroxidase 様 Oxidase の関与を推定する成績を得た。著者は a) 高比放射能 UCA 2-C¹⁴ の調製法を考案しこれを用いて b) 酸化が IPA からおきること c) その酸化分解成物の一つの Type は KGAA+蟻酸+NH₃ 形成であり、他の Type は Imidazole 核 2-C の酸化でその際上述のHAA, HPA ではない何か未知のCarbamyl deriv. が生じることを明らかにした。更に d) 酸化機転にCu⁺⁺の関与することを菌酵素を用いて見出した。

方 法

肝酵素は猫肝を磨碎して水抽出, PH4.7等電点沈澱後硫酸塩析, 63°C 1'熱処理後再塩析。

菌酵素は *Pseudomonas aeruginosa* アセトン粉末を水抽出, 熱処理, 塩析, DEAE Cellulose 処理, 塩析。

Radioactivity measurement は gas flow counter により行い、自己吸収は同一条件の対照にて補正した。

paper 上の定量は chromatogram を ¼"巾づつ直接にカウントし、同定は同時に展開した carrier の発色により行った。

*) 略字 ; UCA, urocanic acid; IPA, imidazolone propionic acid; FAG, α-L-formamidinoglutamic acid; HAA, hydantoin acrylic acid; KGAA, α-Ketoglutaric acid amide; FIG, formyl-isoglutamine; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt; DDC, diethyl dithio carbamate; DEAE cellulose, diethylaminoethyl cellulose.

結 果

a) UCA-2-C¹⁴調製は L-Histidine-2-C¹⁴ に過量の Deaminase を作 用させてから三塩化醋酸で除蛋白し、IR112H⁺ カラムを用いて anionic Impurities を除き（水洗）吸着した UCA-2-C¹⁴ は NH₄OH で溶出し更にこれを IRC50H⁺ カラムを通して cationic Impurities を吸着せしめ、通過液を集めて減圧濃縮して粉末状の UCA-2-C¹⁴ を得た。（16μC/mg）

b) UCA-2-C¹⁴10r を種々の条件で肝酵素と反応させその生成物の Distribution を paper 上で定量した。（高圧滲紙電気泳動法及び2種の paperchromatography の三者を併用した。）

熱処理前の肝酵素を用いた時は嫌氣的にも好氣的にも FAG 生成は100%でこれが終末産物である。熱処理を施した肝酵素では FAG の生成は見られず代って FIGが生成し、殊に嫌気条件下では UCA 分解量の75%に達した。UCA→FAG の中間物質として IPA が想定され、これは数十分の半減期で非酵素的に FIG に加水されることが知られているので著者の成績は熱処理にて IPA→FAG の間が遮断せられ、蓄積した IPA が速やかに FIG になったものと解される。この熱処理肝酵素を用いて好氣的に反応を行わせると FIG 生成に代って Radioactivity は数ケの新しい spot にわかれて（Ⅰ）、更に paper 上の全 counts は理論値の58%に減少した。即ち 2-C¹⁴ に由来する揮発性物質生成（Ⅱ）が考えられる。（Ⅰ）（Ⅱ）が UCA-2-C¹⁴ の酸化分解生成物で IPA に shunt を有するものと推定される。

c)（Ⅱ）は CO₂ か蟻酸と推定したので UCA-2-C¹⁴15r を同様好気条件下で反応させた後直ちに lyophilize し、NaOH sol. に捕促された volatile Radioactivity は HCOONa 及び Ba CO₃ を carrier として dilution 法で定量された。誤差の範囲で全部の（Ⅱ）が蟻酸であることが証明された。一方同一条件で反応液中の KGAA（ヒドラゾン法）及び free NH₃（微量拡散法）を定量して蟻酸との間に当量関係を得た。この Group は常に UCA 分解量の略45%を占める。

次に（Ⅰ）は HAA 或は HPA ではないかと考えられたのでこの両者の他に Carbamyl glutamic acid を carrier として夫々反応液に加えて paper 上多次元展開法及超展開法により精製した所各 carrier は放射能 free となった。即ち HAA, HPA の反応液中における direct Occurrence は否定された。しかし反応液を HCl にて boil した時に HAA に label の入るのが確認された。この成績は先に当教室で単離した結晶 C₆ H₈ N₂ O₅ の性質によく合致する。一方（Ⅰ）を paper 上で精製単離してその性質を調べた所少くともその2つの spot は NaOH 加水分解処理で尿素を形成し且これに label の入るのが見られた。以上のことから反応液中に反応生成物として存在する Carbamyl pre-cursor が推定されたので目下追究中である。

d) 菌部分的精製酵素による UCA 分解の際に見られる酸素消費がその粗酵素の Ultrafiltrate 及びその灰化物の添加にて増加した。逆に EDTA 及び DDC の添加、殊に後者では添加後に透析を行った後に於いても酸素消費は全く抑えられている。この DDC 添加透析酵素に種々の金属を添加した所 Cu⁺⁺の 10⁻⁵M添加のみが有効で100%以上の Recovery を示した。この微量金属の作用は酸化機構における H₂ O₂-Generating system に関係するものではなかろうかとの見解を有している。（梗概参照）

論 文 の 審 査 結 果 の 要 旨

L-Histidineは脱アミノして urocanin酸（UCA）となり、これは更に水解的に L-glutamin 酸に分解

することは周知の事実であるが、市原らはこれとは別に UCA が酸化的に分解することを発見し、続いて二三の研究室においてその酸化分解生成物とみなされる物質が次々と単離同定された。しかしこれらの物質の形成の機作、即ち UCA 酸化分解経路の成り立ちについては殆んど得られた知見がない。そこで著者は L-histidine-2-C¹⁴ より酵素的に UCA-2-C¹⁴ を調製し、これをトレーサーとして UCA 酸化分解機構に検討を加えた。

〔A〕L-histidine-2-C¹⁴ に大量の histidine deaminase を作用させ、生じた UCA-2-C¹⁴ をイオン交換樹脂のカラムを組合せて用い、反応液より分離、純化することにより比放射の高い UCA-2-C¹⁴ を好収量に得た。

〔B〕現在 UCA の水解的分解は $\text{UCA} \rightarrow \text{Imidazolonepropion酸} \rightarrow \alpha\text{-L-formamidinoglutar酸} \rightarrow \text{L-glutamin酸}$ の如くに進むものと考えられているが、この第一段の反応で生じた imidazolonepropion 酸は極めて不安定な物質で速やかに非酵素的に加水分解され、その半減期は中性溶液で数十分と言われる。この非酵素的加水分解の結果 N-formylisoglutamine が出来ることが確められている。

そこで UCA-2-C¹⁴ の猫肝酵素による分解産物について、UCA, L-formamidinoglutar 酸、及び imidazolonepropion 酸の代りに N-formylisoglutamine を定量することにより、(i) 肝塩析酵素、肝 Ca-gel 酵素によっては UCA から定量的に L-formamidinoglutar 酸が生成し、この時には酸素消費を伴わないが、(ii) この酵素に熱処理(63°C 1 分間)をほどこすとはじめて酸化的に UCA を分解するようになりこの時 imidazolone propion 酸と L-formamidinoglutar 酸の間が遮断されているのを認めた。従って UCA の酸化的分解は共通の中間物、imidazolone propion 酸からおきているものと推断した。

〔C〕UCA-2-C¹⁴ の猫肝熱処理酵素による酸化分解生成物を検討した結果揮発性物質(Ⅰ)と非揮発性物質(Ⅱ)とを認めた。前者(Ⅰ)を同位体希釈法で定量、同定した結果その全部が蟻酸よりなることが証明出来た。

一方すでに UCA 酸化分解産物として単離同定されている $\alpha\text{-Ketoglutar 酸アミド}$ の生成量を free NH₃ 生成量と共に定量して蟻酸生成との間に当量的関係を認めたので、UCA 酸化分解の一つの Type は $\alpha\text{-Ketoglutar 酸アミド} + \text{NH}_3 + \text{蟻酸}$ 形成であることを決定した。

〔D〕この他に酸化分解産物として hydantoin acryl 酸、hydantoin propion 酸が知られている。しかし、猫肝熱処理酵素を用いた場合には、著者はトレーサー法を用いてこの両者の反応液中における direct occurrence を否定した。代って、先に述べた(Ⅱ)のアルカリ加水分解にてその label が尿素中に入ることを認め、且つ反応液を HCl で処理すると hydantoinacryl 酸中に label の入ることを認め、後者の precursor が反応液中に存在することを証明し得た。

即ち UCA 酸化分解の第2の Type imidazolone-2-C の酸化であり、それは hydantoin acryl 酸 precursor の生成であることを確認した。

〔E〕UCA 酸化分解は微量の H₂O₂ で prime される peroxidase 様 oxidase によって行われるものと考えられている。著者は Pseudomonas aeruginosa 部分的精製酵素を用いて、metal catcher による阻害、透析添加実験等から、この酸化分解機構に微量の Cu⁺⁺ が関与していることを見出した。

以上、著者の研究は UCA 酸化分解を同位体、トレーサー、等を用いて追究しその機構を明らかにしたものである。