

| | |
|--------------|---|
| Title | アントラニル酸々化酸素に関する研究 |
| Author(s) | 細川, 桂一 |
| Citation | 大阪大学, 1961, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/28302 |
| 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。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

| | |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 細川桂一 はす かわ けい いち |
| 学位の種類 | 医学博士 |
| 学位記番号 | 第 187 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 | アントラニル酸々化酸素に関する研究 |
| 論文審査委員 | (主査) (副査) 教授 須田 正巳 教授 西沢 義人 教授 天野 恒久 |

論文内容の要旨

目 的

1948年以来、須田等の発見した逐次適応現象、或は Stanier の同時適応現象の概念を応用して、トリプトファンからカテコールを経て β -ケトアデピン酸に至る代謝経路が明かにされた。

然し、此の代謝路の中で、アントラニール酸からカテコールに到る代謝反応のみは、多くの研究者の努力にも拘らず酵素レベルで証明する事が出来なかった。従って、その実在性に就ては、適応法による分析からの推測の外何等の実験的証明はなかった。私はアントラニール酸酸化酸素を適応生菌体より cell-free に取出すべく試みて遂に成功し、部分的な精製を行い、若干の反応機作を明にしたので報告する。

方 法

研究に用いた菌は、土壤中の一種の緑膿菌 *pseudomonas fluorescens*, B-23株で、アントラニール酸を C源N源とする合成培地を用いて分離した。此の菌を同培地に大量培養し、集菌後凍結保存したものを酵素源として用いた。

酵素精製は次の4段階の処理によって行った。(1) 蒸留水による超音波抽出。(2) プロミタン処理。(3) 硫酸処理により0.33~0.45飽和画分 (Fraction A-1) 及び0.45~0.55飽和画分 (Fraction B-1) に分画。(4) Fr. A-1はアルミナ C_r 処理 (Fraction A-2), Fr. B-1は磷酸カルシウムゲル処理 (Fraction B-2)。但し、アンモニアの定量の場合は、硫酸処理を行わない標品を使用した。

酵素活性は Warburg 検圧計を用いて酸素吸収により測定した。アントラニール酸の定量は、310m μ の紫外外部吸収を Beckman Model DU Spectrophotometer により測定、又は Bratton-Marshall のデアゾ反応の変法によった。 β -ケトアデピン酸の定量は、Stanier の4-アミノアンチピリンを用いる方法又、同定は、ペーパークロマトグラフィによった。アンモニアは Lubochinsky-Zalta 法の変法によって定量した。

結 果

先ず、反応生成物の同定であるが、反応後生成物を 2, 4-dinitrophenylhydrazone となし、濾紙クロマトグラフ法により β -ケトアデピン酸である事を確認した。

反応の量的変動を調べると、アントラニール酸の減少：酸素消費：脱炭酸： β -ケトアデピン酸の生成＝1：2：1：1のモル比で定量的に行はれる。一方、カテコールを基質とすると、2原子の酸素吸収を示して等モルの β -ケトアデピン酸を生成するから、アントラニール酸よりカテコールに至る反応は、2原子の酸素を必要とする。

硫安処理酵素を用いて、本酵素の cofactor 要求性を調べると、還元型グルタチオン、TPNH⁻ 生成系（グルコース-6-一磷酸脱水酵素）及び DPN の添加が必要で、これらの何れが欠けても活性を示さない。一方 DPNH⁻ 生成系としてアルコール脱水酵素を用いた場合は、これに TPN を添加しても活性を示さない。所が、生成系としてグルコース脱水酵素を用いると、何れのヌクレオチドでも有効である。此の場合の至適 PH は、共に7.5附近であるが、DPNの方がTPNに対照してPH依存性を強く顕す。更に何れのヌクレオチドを用いた場合も、基質と等モルの β -ケトアデピン酸の生成が認められる。尚、其の際等モルのアンモニアの遊離が見られる。以上の事実は、アントラニール酸の酸化にはピリジンヌクレオチドの特異性がない事を示している。

阻害剤として、アサイド、シアン、或は、 α' -デピリゲルや0-フェナントロリンの様な chelating agent は強い阻害を示すので、金属の関与が考えられる。事実、0-フェナントロリンの阻害は、Fe⁺⁺ によってのみ回復され、他の金属イオンは効果がない。此の時使用した阻害剤の濃度、10⁻³M は、ピロカテカーゼの活性を抑制するのに充分でないから、二価鉄がアントラニール酸の酸化に関与していると考えられる。更に精製を進めた酵素でも二価鉄の添加効果が明らかに認められた。

アミノプテリンは 10⁻³M でも全く影響がみられないから、プテリジン誘導体の関与は考えられない。

安息香酸、ザリチル酸、2,3-デオキシ安息香酸、プロトカテキユ酸、アニリン、0-アミノフェノールは何れも中間物でない。

分光学的に反応過程を追跡すると、反応初期に 248m μ 附近に極大吸収が認められる。これが中間物に基くものであるか否かは今後の解析をまたねばならない。

本酵素は、精製によって二つの component (Fr. A-2 及び B-2) に分けられ、夫々単独では殆んど活性を示さないが、両者を合すると始めて十分な活性の増大がみられる。尚二つの component が共に適応的につくられる点は興味が深い。

これらの事実は、アントラニール酸よりカテコールに至る過程が決して単純なものでなく、二段階或はそれ以上の複雑な反応を含む事を示唆している。酵素の二つの component が如何なる役割を果すかについては不明であるが、生成系のない場合或は嫌気的条件下では、反応が全く進行しない事から、酸素と DPNH (TPNH) の存在下にベンゼン核の水素化が第一段階として起り、次いで脱炭酸とアンモニアの遊離がおこってカテコールが生成すると考えられる。

総 括

1. 土壌より分離した緑膿菌 *Pseudomonas fluorescens*, B-23 株のアントラニール酸適応菌体より、ア

ントラニール酸々化酵素を無細胞状態に抽出し、部分的精製を加えた。

2. アントラニール酸の酸化には、DPNH-(又は TPNH) 生成系、還元型グルタチオン及び二価鉄が cofactor として必要である。

3. アントラニール酸々化反応の量的変動を調べると、基質の消失：酸素消費：脱炭酸：アンモニアの遊離： β -ケトアデピン酸の生成=1:2:1:1:1のモル比で行はれる。一方カテコールを基質とすると、等モル(2原子)の酸素を消費して β -ケトアデピン酸を形成するから、アントラニール酸からカテコールに至る反応には2原子の酸素が必要である。

4. 本酵素は精製によって、二つの component に分けられ、夫々単独では殆んど活性を示さないが、両者を合して始めて十分な活性の増大がみられる。 以上

論文の審査結果の要旨

1948年以来、須田等の発見した逐次適応現象、或は Stanier の同時適応現象の概念を応用して、トリプトファンからカテコールを経て β -ケトアデピン酸に至る代謝経路が明らかにされた。

然し、此の代謝路の中で、アントラニール酸からカテコールに到る反応のみは、多くの研究者の努力にも拘らず酵素レベルで証明する事が出来なかった。従って、その实在性に就ては、適応法による分析からの推測の外何等の実験的証明はなかった。著者は、アントラニール酸酸化酵素を適応生菌体より cell-free に取出すべく試みて遂に成功し、部分的な精製を行い、若干の反応機作を明にし得た。

研究に用いた菌は、土壤中の一種の緑膿菌 *Pseudomonas fluorescens*, B-23株で、アントラニール酸をC源N源とする合成培地を用いて分離した。此の菌を同培地に大量培養し、集菌後凍結保存したものを酵素源として用いた。

酵素精製は次の4段階の処理によって行った。(1)蒸留水による超音波抽出。(2)プロミタン処理。(3)硫酸処理により0.33~0.45飽和画分(Fraction A-1)及び0.45~0.55飽和画分(Fraction B-1)に分画。(4) Fr. A-1はアルミナ Cr処理(Fraction A-2), Fr. B-1は燐酸カルシウムゲル処理(Fraction B-2)。但し、アンモニアの定量の場合は、硫酸処理を行わない標品を使用した。

先ず、反応生成の同定であるが、反応後生成物を2,4-dinitrophenylhydrazone となし、沝紙クロマトグラフ法により β -ケトアデピン酸である事を確認した。

反応の量的変動を調べると、アントラニール酸の減少：酸素消費：脱炭酸： β -ケトアデピン酸の生成=1:2:1:1のモル比で定量的に行はれる。一方、カテコールを基質とすると、2原子の酸素吸収を示して等モルの β -ケトアデピン酸を生成するから、アントラニール酸よりカテコール酸に至る反応は、2原子の酸素を必要とする。

硫酸処理酵素を用いて、本酵素の cofactor 要求性を調べると、還元型グルタチオン、TPNH- 生成系(グルコース-6-燐酸脱水素酵素)及び DPN⁺ の添加が必要で、これらの何れが欠けても活性を示さない。一方 DPNH- 生成系としてアルコール脱水素酵素を用いた場合は、これに TPN を添加しても活性を示さない。所が、生成系としてグルコース脱水素酵素を用いると、何れのヌクレオチドでも有効であ

る。此の場合の至適 PH は、共に7.5附近であるが、DPNの方が TPN に対照して PH 依存性を強く顕す。更に何れのヌクレオチドを用いた場合も、基質と等モルの β -ケトアデピン酸の生成が認められる。尚、其の際等モルのアンモニアの遊離が見られる。以上の事実は、アントラニール酸の酸化にはピリジンヌクレオチドの特異性がない事を示している。

阻害剤として、アザイド、シアン、或は、 $\alpha\alpha'$ -ジピリジルや *o*-フェナントロリンの様な chelating agent は強い阻害を示すので、金属の関与が考えられる。事実、*o*-フェナントロリンの阻害は、 Fe^{++} によってのみ回復され、他の金属イオンは効果がない。此の少使用した阻害剤の濃度、 $10^{-3}M$ は、ピロカテカーゼの活性を抑制するのに充分でないから、二価鉄がアントラニール酸の酸化に関与していると考えられる。更に精製を進めた酵素でも二価鉄の添加効果が明らかに認められた。

アミノプテリンは $10^{-3}M$ でも全く影響がみられないから、プテリジン誘導体の関与は考えられない。

安息香酸、サリチル酸、2,3-デオキシ安息香酸、プロトカテキユ酸、アニリン、*O*-アミノフェノールは、何れも中間物でない。

分光光学的に反応過程を追跡すると、反応初期に $248m\mu$ 附近に極大吸収が認められる。これが中間物に基くものである否かは今後の解析をまたねばならない。

本酵素は、精製によって二つの component (Fr. A-2 及び B-2) に分けられ、夫々単独では殆んど活性を示さないが、両者を合すると始めて十分な活性の増大がみられる。尚二つの component が共に適応的につくられる点は興味が深い。

これらの事実は、アントラニール酸よりカテコールに至る過程が決して単純なものではなく、二段階或はそれ以上の複雑な反応を含む事を示唆している。酵素の二つの component が如何なる役割を果すかについては不明であるが、生成系のない場合或は嫌氣的条件下では、反応が全く進行しない事から、酸素と DPNH (TPNH) の存在下にベンゼン核の水素化が第一段階として起り、次いで脱炭酸とアンモニアの遊離がおこってカテコールが生成すると考えられる。

以上、本研究は、従来困難とされていたアントラニール酸々化酵素の cell-free 化によって、アントラニール酸からカテコールに至る反応が酵素レベルで証明出来た点、及び、安息香酸々化酵素の場合と同様、ベンゼン核の "double hydroxylation" の機構解明の上で意義を有するものである。