

Title	アントラニル酸水酸化酵素の研究 : 特に安定化と精製について
Author(s)	中田, 陽造
Citation	大阪大学, 1962, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28396
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

【26】

氏名・(本籍)	中 田 陽 造 なか た よう ぞう
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 295 号
学位授与の日付	昭 和 37 年 3 月 26 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	アントラニル酸水酸化酵素の研究 —特に安定化と精製について—
	(主 査) (副 査)
論文審査委員	教授 須田 正己 教授 今泉 礼治 教授 吉川 秀男

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

アントラニル酸はトリプトファンの重要な中間代謝産物の一つである。それを基質としてカテコールを生成するアントラニル酸水酸化酵素については、すでに早石、坂本、竹田等の報告があるが、その不安定性のために十分な研究がなされていなかった。このような酵素活性の不安定性は、近時重要性を認められてきた酸素添加酵素群によくみられる現象であって、持続的な酵素の安定化条件を見出すことがこういった諸酵素の研究を押し進めて行く上の先決問題であろう。本研究は *pseudomonas aeruginosa* の一種から得たアントラニル酸水酸化酵素を、そのような安定化の条件を探求しつつ精製し、その性質を明らかにすることを目的としている。

〔方法並びに成績〕

酵素材料としては、アントラニル酸を含む培地に16~20時間、30°Cで培養した*Pseudomonas aeruginosa* から超音波破碎により得た Tris buffer extract を用いた。

活性測定は、pH=7.2の燐酸緩衝液中で行ない、TPNH または DPNH の存在を必要とする。

定量法は、(1)アントラニル酸の減少：ジアゾ化法 (2) 酸素消費と炭酸ガス発生：検圧法 (3) アンモニア発生：ネスラー法とインドフェノール法

この酵素の比活性は、超音波破碎後、低速遠沈により得た粗抽出液を出発点として、ストレプトマイシンまたはプロタミン硫酸塩処理を行い、高速遠沈(100,000×g; 60分)の上清分画をとり、燐酸カルシウム・ゲル処理することにより、全活性の損失なしに、約10倍前後に上昇した。しかしこの標品のアントラニル酸水酸化酵素活性は、熱、酸性、有機溶媒、中性塩等による活性阻害が認められるので、これらを精製手投として利用し難い上に、酸素の存在下で容易に不活性化されて行く、といった事情で、より純度の高い標品を必要量だけ得ることが非常に困難であった。

さて、この段階の標品にはまだ強力なピロカテカーゼ活性が含まれているが、アントラニル酸からカテコールへいたる過程には還元型のピリジンヌクレチオド助酵素と分子状酸素を要求し、 CO_2 並びに NH_3 の発生を認めた。なお、この間の中間物質は見出されていない。至適 pH は 7.2 であり、アントラニル酸に対する見かけの k_m は $5 \times 10^{-4} \text{M}$ である。また、所謂稀釈効果が認められる。Nitroso-R, o-phenanthroline, DDC, KCN, EDTA, p-CMB および重金属 (Hg^{++} , Ag^{++}) 等で阻害される。なお、o-phenanthroline 阻害に対しては Fe^{++} が、また、p-CMB 阻害に対しては G. SH が恢復効果を有していることから、-SH および Fe^{++} が活性に関係しているようである。

ところで、この Fe^{++} による o-phenanthroline 阻害の恢復効果を見ていた間に、 Fe^{++} の添加によって酵素活性が阻害剤を加える前のレベル以上に上昇するという結果が得られた。かかる効果は他の金属キレート剤を用いた場合には起らないこと、また低濃度の o-phenanthroline 添加による活性の賦活は僅かしか認められないことから、o-phenanthroline (O-P.) と Fe^{++} との錯化合物 $[\text{Fe} \cdot (\text{O-P.})_3]^{++}$ に極めて特異的であることが考えられた。そしてこの錯化合物には極めて著しい酵素安定化作用のあることが認められた。即ち、嫌気的処理をしないと 0°C で 1~4 日後にはその残存活性の半減する本酵素標品に、このものを $3.3 \times 10^{-4} \text{M}$ 添加することにより約 2 週間後に於ても 70% の活性を残存させ得たのである。また透析操作による失活に対しても保護効果を有し 0°C 6 時間の処理に耐えさせた。が、尿素、蛋白分解酵素、凍結—融解等による失活、並びに塩類による阻害には無力であって、酵素蛋白の構造維持に直接的寄与をしているとは考え難い。ところで、酵素液を $[\text{Fe} \cdot (\text{O-P.})_3]^{++}$ あるいは Fe^{++} を含む Tris buffer に透析する時は失活が著しく防がれること、さらに活性測定時に前者に Fe^{++} を、後者に $[\text{Fe} \cdot (\text{O-P.})_3]^{++}$ を加える時はより活性の上昇を認めることから、酵素活性に関与する Fe^{++} に対する貢献が考えられる。なお、2, 3 のヘム蛋白質やヘミンには効果のないこと、他方 $[\text{Ni} \cdot (\text{O-P.})_3]^{++}$ にも同様の効果のあること、等々から配位坐の完全にみだされた安定な O-P. Complex がその陽性荷電により酵素蛋白質上に結合し、以て活性中心の保護にあたっているものと考えられる。

そこで、 $[\text{Fe} \cdot (\text{O-P.})_3]^{++}$ 存在下にセルローズ誘導体を支持体とし、上記部分精製酵素標品を電気泳動した所、粗抽出液に比べ比活性 200 倍 (回収率 56%) なる標品を得ることができた。

〔総括〕

本研究はアントラニル酸水酸化酵素の性質を明かにするとともに、その安定化因子の一つとして特異的な錯化合物を見出し、その作用機序を考察すると同時に、それを利用して精製の歩を進めたものである。

論文の審査結果の要旨

トリプトファン代謝に重要な位置を占める。アントラニル酸水酸化酵素については、その著しい不安定性のために、まだ十分な研究がなされていなかった。このような酵素活性の不安定性は近時重要性を認められてきた酸素添加酵素群によくみられる現象であって、酵素の持続的安定化条件を見出すことが、こういった諸酵素の反応機構の研究を押し進めて行く上の先決問題である。本研究は、*Pseudomonas aeruginosa* の一種から得たアントラニル酸水酸化酵素の性質を明らかにするとともに、その安定化条件を追求し、その一有効因子として、特異的な金属錯化合物 ($[\text{Fe} \cdot \text{o-phenanthroline}_3]^{++}$) を見出し、その作用機序を考察すると同時に、それを利用して精製の歩を進めたものである。