

Title	土壌菌によるサイクロヘキサン・ジオールの代謝 (I)
Author(s)	弓狩, 康三
Citation	大阪大学, 1962, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28426
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

【 8 】

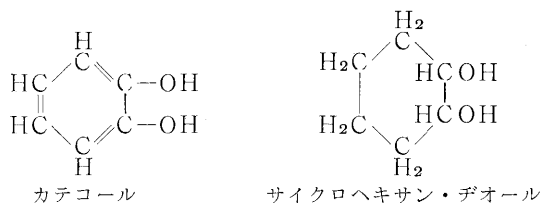
氏名・(本籍)	弓 狩 康 三 ゆ がり やす み
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 252 号
学位授与の日付	昭 和 37 年 2 月 2 日
学位授与の要件	医学研究科 生理系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	土壌菌によるサイクロヘキサン・デオールの代謝(I)
論文審査委員	(主 査) (副 査) 教 授 須 田 正 巳 教 授 川 俣 順 一 教 授 天 野 恒 久

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

私共の研究室においては、さきにカテコールのベンゼン核を酸化的に開裂してシス・シス・ムコン酸を形成する酵素(ピロカテカーゼ)を発見し、精製を行いこの酵素の性質を明らかにした。

そこで、このカテコールと構造が類似しているが不飽和結合をもたないサイクロヘキサン・デオールが、類似の機作で代謝されるか否かを検するために以下の実験を行なった。



このサイクロヘキサン・デオールは石油の一成分として知られているが、ある種の土壌菌はこれを炭素源として利用することがわかったので、逐次適応法を用いて以下のごとく代謝パターンを明らかにした。

〔方法並びに成績〕

菌株 サイクロヘキサン・デオールを唯一の炭素源として増殖する *Pseudomonas* sp. を分離使用。

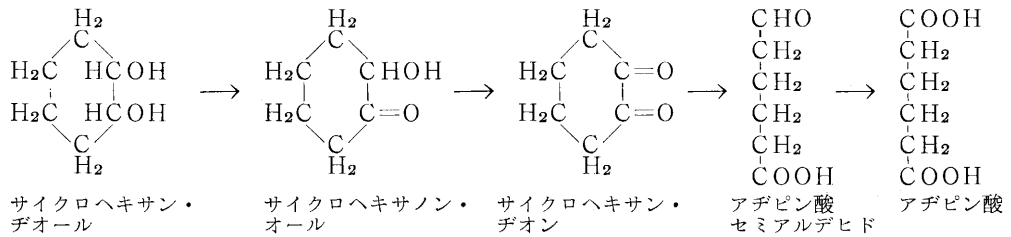
酵素液の調製 サイクロヘキサン・デオールを 0.25% に添加したペプトン・肉汁培地に 14 時間増殖させた菌を集菌し、アルミナ磨砕し、その遠心上清を粗抽出液とし、以後核酸除去、硫酸分劃、燐酸カルシウムゲル等により部分的に精製した。

各酵素活性の測定方法は実験の項に示す。

(1) 生菌による代謝追跡

サイクロヘキサン・デオール適応菌の生菌浮游液は、サイクロヘキサノール・オン、サイクロヘキサン・

デオン, アデピン酸セミアルデヒド, およびアデピン酸を lag なしに代謝する。このようにして, 次の代謝系列が確かめられた。



(2) 適応菌体より各酵素の抽出並びに性質

サイクロヘキサン・デオールがアデピン酸に代謝されていくまでの間に少くとも 4 種の酵素が関与しているが, これらを次のように呼ぶ。

- I サイクロヘキサン・デオール脱水素酵素
- II サイクロヘキサノン・オール脱水素酵素
- III サイクロヘキサン・デオン加水酵素
- IV アデピン酸セミアルデヒド脱水素酵素

I サイクロヘキサン・デオール脱水素酵素

この酵素は DPN を補酵素とし, TPN では置換できない。至適 PH は, 7.8~8.0 (ピロ燐酸緩衝液) にあり, PCMB で阻害されグルタチオンで回復する。前述の除核酸液を硫酸で分別したところ 0.33~0.45 飽和の分割に存在する。この反応は $\text{DPN}/\text{DPNH} = 3/2$ で平衡する (PH 8.0)。反応生成物として得られる物質がサイクロヘキサン・デオンであることは, 次のようにして証明される。

- (i) 反応液は, 脂肪族 dioxo 化合物の反応陽性となる。
- (ii) 反応の進行と平行して 260m μ の吸光度が増加し, 反応平衡に達したときは, DPN, DPNH の量およびそれぞれの吸光度, サイクロヘキサン・デオンの吸光度 ($\epsilon_{260\text{m}\mu} = 6.5 \times 10^3$) および生成量から算出される吸光度に近似する。
- (iii) $\text{DPN}^+ \rightarrow \text{DPNH} + \text{H}^+$ による脱水素反応の過程で生成する DPNH を *Cl. sporogenes* の抽出液で酸化し, 酸素吸収として観察するとき, サイクロヘキサン・デオール 1 モルにつき, 1 モルの酸素が吸収される。

同じ酵素によりサイクロヘキサノールも脱水素されるが, イノシトールは脱水素されない。

II サイクロヘキサノン・オール脱水素酵素

合成したサイクロヘキサノン・オールは, 粗抽出液により, DPN, TPN 存在下でも脱水素反応は起らず酸素吸収, 酸形成等も認められない。部分的に精製したサイクロヘキサン・デオール脱水素酵素も, これを基質となし得ない。デオール脱水素酵素が一挙に 4H を脱うというよりか, 2H づつを脱水素する 2 種の酵素によりデオンになると考えられるので, このサイクロヘキサノン・オール脱水素酵素の存在が推測されるが詳細は今後の研究によりたい。

III サイクロヘキサン・デオン加水酵素

サイクロヘキサン・デオンは、粗抽出液により酸素吸収を全く示すことなく、重曹緩衝液中では、1モルから 1/2 モルの CO₂ を発生する。この粗抽出液は、透折により失活し、透折外液の添加により完全に回復する。この酸形成は、還元性物質の生成とほぼ平行するから、生成物はアデピン酸セミアルデヒドと考えられる。このセミアルデヒドは、反応液中からヒドラゾンとしてペーパークロマトにより証明される。

硫酸 33~45% 飽和の分割にサイクロヘキサン・デオンを加えるとき、サイクロヘキサン・デオンの特異的な吸収 (260 m μ) は速かに低下し、約 50% に至って平衡する。平衡に達する速度は蛋白量により異なるが、平衡に達したときは、蛋白量と無関係に約 50% の吸収減少がみられる。また、反応平衡に達したとき、NH₂OH を加えサイクロヘキサン・デオンのデオキシムの生成 (吸収の peak : 290 m μ) を検すると、初め加へたデオンに相当するデオキシムの生成がみられる。また 260 m μ 吸収減少の活性は、硫酸 33~45% 飽和分割に 74% が回収される故に、デオンが酵素的に変化させられているものと考えられるが、生成物についてはまだ証明はない。

この反応平衡に達した後に透折外液を添加するとき 260 m μ の吸収は再び急速に低下し、初めの 5~0% となる。この第 2 段の反応でサイクロヘキサン環が開裂してアデピン酸セミアルデヒドが生成するものと考えられるが、透折外液中の補酵素については、目下検索中である。

IV アデピン酸セミアルデヒド脱水素酵素

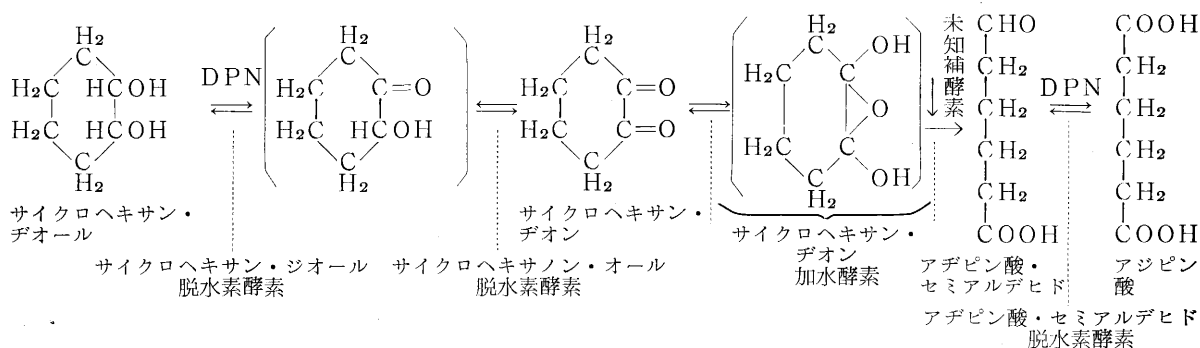
この酵素は、サイクロヘキサン・デオール適応菌抽出液にあり、未適応菌体からは得られない。DPN を補酵素とし、硫酸 55~70% 飽和分割から 73% の活性が回収される。至適 PH は 8 附近にあり、DPN/DPNH が大略 1/1 で平衡する。反応生成物はアデピン酸である。

〔総括〕

以上の実験より、サイクロヘキサン・デオールは、これら新しい諸酵素によりアデピン酸になることは明らかである。従って、サイクロヘキサン・デオールの酸化過程は、DPN に依存する脱水素反応が主役を演じ、環状結合は、加水的に切れるものであり、その点で Pyrocatechase のごとく酸素加により切れるのと異なる。

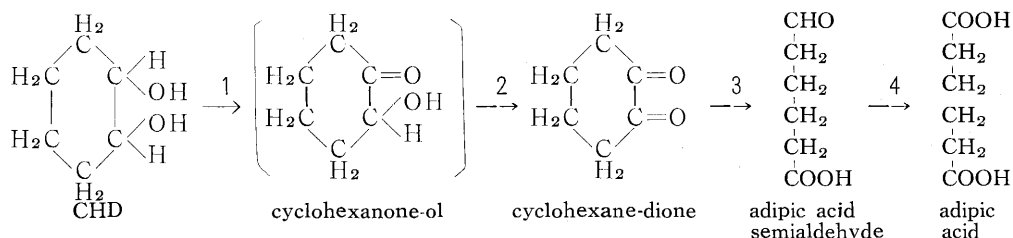
また、この加水分解反応は非可逆的であるためアデピン酸からサイクロヘキサン・デオールが形成されることはない。

以上の代謝経路を総括すると次のようになる。



論文の審査結果の要旨

著者の論文は、*Pseudomonas* sp. に属する細菌を用い、Cyclohexane-diol-(1,2)-trans (CHD) の代謝経路を、逐次適応法によって、追跡し、かつ、適応菌体から各代謝ステップの酵素を分離することによって、代謝経路を確認している。現在、ベンゼン核の酸化的開裂は、2 価鉄を co-factor とする oxygenase によるものであるとされてお著者はこの研究を試みた意図として、それならば CHD のような、飽和六員環の化合物が開環する酵素反応はどのような形式かという点も考慮しているわけである。解明された代謝経路は



この経路上で cyclohexanone-ol が中間物質であるかは、まだ酵素的に確認されていないが、CHD→cyclohexane-dione に到る間は、DPN を助酵素とする脱水素反応であり、step3 の開環反応は、oxygenase type のものではなく加水分解反応によるもので、未知の co-factor を必要とすることが明にされ、step4 は矢張り DPN を助酵素とする脱水素反応である点も確認された。

以上の著者の論文は、有機化学的にも興味ある物質を代謝する酵素をそれぞれ分離することに成功したもので、反応物質の同定にも苦心が払はれており、酵素化学上、新発見を加えたものとして、ここに博士論文として推す次第であります。