

Title	芳香族カルボン酸の水酸化反応に関する酵素的研究
Author(s)	足達, 綱三郎
Citation	大阪大学, 1963, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/28516">https://hdl.handle.net/11094/28516</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【 6 】

氏名・(本籍)	足達綱三郎 あ たち こう さぶ ろう
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 377 号
学位授与の日付	昭和 38 年 3 月 25 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	芳香族カルボン酸の水酸化反応に関する酵素的研究
論文審査委員	(主査) 教授 須田 正巳 (副査) 教授 萩原文二 教授 坂本 幸哉

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

アントラニル酸 (AA) 及び安息香酸 (BA) がカテコールを経て代謝される事はすでに須田等及び Stanier が細菌による逐次適応法を用いて明らかにして居る。その後、これ等の代謝経路上の酵素は現在迄に生細胞から分離精製され、その作用機構もほとんど究明されたが AA からカテコール、及び BA からカテコールに至る反応を触媒する酵素のみは多くの研究者の努力にも拘わらず細胞外に取出す事ができなかった。

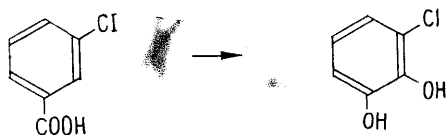
然し最近になって本大学において此等二つの酵素が初めて無細胞状態に得られ、これ等の酵素の性状が明らかにされた。それによると、これ等の酸化には酸素、還元型ピリジンスクレオチド、グルタチオン及び二価鉄が必要であり、又、AA 及び BA からカテコールに至る反応は二原子の酸素を必要とする事が証明された。然しこれ等の酸化酵素標品中にはなほ強力なピロカテカーゼが混在して居り、従って AA 及び BA よりカテコールに至る水酸化反応の機構を詳細に解明する事は不可能であった。この混在するピロカテカーゼを除去する為に酵素精製が種々試みられてきたが、酸化酵素が不安定な為、いずれも成功しなかった。そこで著者は全く異なった観点からこの問題を究明しようと考え、酵素の基質特異性の相異を利用する方法を選んだ。

即ち、AA 酸化酵素及び BA 酸化酵素によって酸化されるが、その酸化生成物がピロカテカーゼの基質となり得ない様な物質を用いて、反応機構の解明を行い、併せてこれ等酵素の基質特異性の検討を行なった。

〔方法並びに成績〕

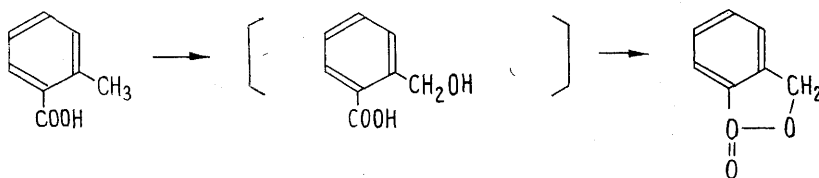
実験に用いた菌株は *Pseudomonas aeruginosa* B-23, *Micrococcus ureae* Et, 及び *Pseudomonas fluorescens* Mb-15 の三種で、AA酸化酵素 (AO) は前二者より、BA酸化酵素 (BO) は上記三者より調製した。此等の菌を AA 又は BA を唯一の炭素源とする合成培地に培養した。実験に用いた酵

素標品は、これ等の菌を超音波爆砕後、その遠心上清をプロタミン処理、硫酸処理、更に透析を行なったものである。BO は BA の他各種の BA 誘導体を酸化し得る。特に興味ある事は、*o*-,*m*-,*p*- 位置換体の中、*m*- 位置換体に対して最も強い活性を示す事である。一方 AO も BO 同様広い基質特異性を示すが BO と異って *p*- 位置換体に最も強い活性を示す。BO を用いて *m*- クロロ BA を酸化させると基質 1 モル当り 1 モルの酸素を消費し、1 モルの CO<sub>2</sub> を放出して反応は停止し、しかも反応液は紫色となる。この事は *m*- クロロ BA の酸化がカテコールの段階で停止して居る事を示す。次に、この蓄積したカテコール体が吸収スペクトル及びペーパークロマトグラフィーを用いて 3-クロロカテコールである事を同定した。更に量的変動を調べた結果、*m*- クロロ BA から定量的に 3-クロロカテコールが形成される事を証明した。



事実、この事は合成した 3-クロロカテコールが BO 中に混在するピロカテカーゼにより全く酸化されない事からも裏書される。又、BO は *o*-メチル BA (*o*-トルイン酸) をも酸化し、その際基質と等モルの酸素消費を伴うが CO<sub>2</sub> を全く放出しない。そこでその反応液を除蛋白後エーテル抽出等の操作を行って白色針状の結晶を得、このものが元素分析、融点、及び吸収スペクトルからフタライドである事を同定した。

即ち、*o*-トルイン酸は BO によって、そのベンゼン核が酸化されないうでメチル基が酸化され *o*-ヒドロキシメチル BA となり、之が恐らくは非酵素的にフタライドを形成すると考へられる。しかも、諸種の実験から、*o*-トルイン酸のメチル基を酸化する酵素は BO それ自体と同一である事が確認され



たので、ベンゼン核を水酸化する機構とメチル基を酸化する機構とは本質的に差がない事になる。

AO は各精製の段階に於て AA と BA に対する活性比は常に一定である故、AO 中に混在する別の酵素が BA を酸化するのではなく、AO それ自体が BA をも酸化すると考へられる。

BO の場合も全く之と同じ関係にある。加えて BO 及び AO は夫々の基質によって誘導され、且その基質特異性がそれぞれ異なって居るので、之等 2 つの酵素が同じものでない事は明らかである。又、反応生成物は同一物質即ち  $\beta$ -ケトアジピン酸で、この事実は AA 及び BA の水酸化される機構が類似して居る事を示唆するものである。

## 〔総括〕

1. *Pseudomonas aeruginosa* B-23, *Micrococcus ureae* Et, *Pseudomonas fluorescens* Mb-15 を用い、アントラニル酸々化酵素を前二者より、安息香酸々化酵素を上記三者より調製し、部分的精製を加えた。
2. 安息香酸々化酵素は各種安息香酸誘導体の中 *m*-位置換体に最も強い活性を示す。之に対し、アントラニル酸々化酵素は *p*-位置換体に最も強い活性を示す。
3. *m*-クロロ安息香酸は安息香酸々化酵素により、3-クロロカテコールとなり、形成された3-クロロカテコールはピロカテカーゼの作用を受けない。
4. *o*-トルイン酸は安息香酸々化酵素により、そのメチル基が水酸化される。
5. 之等酵素の広い基質特異性は、調製された酵素標品中に種々の酵素が混在するのではなく、安息香酸及びアントラニル酸々化酵素そのものが種々の誘導体を酸化するものである事を証明した。

## 論文の審査結果の要旨

著者の『芳香酸カルボン酸の水酸化反応に関する酵素的研究』は次の点で新しい事実を発見して居る。

- i) 安息香酸々化酵素及びアントラニル酸々化酵素は何れも広い基質特異性を有する。且安息香酸々化酵素は安息香酸の *m*-位置換体をよく酸化しアントラニル酸々化酵素は安息香酸の *p*-位置換体に強い活性を有する。
- ii) 安息香酸々化酵素とアントラニル酸々化酵素はその反応機構が類似して居るが明らかに別個の酵素である。
- iii) 安息香酸々化酵素は本来ベンゼン核の水酸化酵素であるにも拘わらず *o*-トルイン酸の側鎖を水酸化する。

安息香酸々化酵素アントラニル酸々化酵素共に不安定な酵素で且強力なピロカテカーゼが混入して居る為水酸化反応のみを追及する事は今迄不可能であった。第一の点の基質特異性に関する著者の研究で安息香酸々化酵素アントラニル酸々化酵素共に広い基質特異性を有する事が解った。又著者は安息香酸の *m*-位置換体の大部分が安息香酸々化酵素によりカテコールのレベルで反応が停止する事を発見して居る。更にかかる誘導体の一つである *m*-クロロ安息香酸について詳細に検討した結果、安息香酸々化酵素はこの物質を酸化して3-クロロカテコールとし且3-クロロカテコールはピロカテカーゼの基質となり得ない。従って基質特異性を利用する事により反応系を単純化する事ができ水酸化反応の研究に一つの新しい方法を見出して居る。

第二の点は第一の事実を確認する上に重要な事であるが安息香酸々化酵素アントラニル酸々化酵素何れも現在迄精製が困難である故に証明し得なかった。著者は此等の酵素に部分的精製を加える事に成功しその知見及び基質特異性等より此等両酵素が別個のものである事を証明した。

第三に安息香酸々化酵素が *o*-トルイン酸のベンゼン核を水酸化せず側鎖のメチル基を水酸化する事を著

者は確認して居る。いわゆる “double hydroxylation” を触媒する酵素がメチル基をも水酸化し得ると言う事実は今迄に全く例を見ない知見で水酸化反応機構の解明に新しい端緒を開くものとして今後の期待される。以上著者の論文は水酸化反応に関し幾つかの重要な新知見を得たもので医学博士の学位論文として充分の価値あるものと認める。