The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Benzylalcohol脱水素酵素
Author(s)	赤木, 克子
Citation	大阪大学, 1964, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28586
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、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

【7】

氏　名・(本籍)	赤　木　克　子（あかぎ かつこ）
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　490　号
学位授与の日付	昭和39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	**Benzylalcohol 脱水素酵素**
論文審査委員	(主査) 教授 坂本　幸哉　(副査) 教授 萩原　文二　教授 山野　俊雄

論文内容の要旨

〔目　的〕

Toluene を代謝する Pseudomonas の一種を土壌から分離した。この菌の音波抽出液は，Benzylalcohol と Benzaldehyde 間の酸化還元を触媒する酵素を含み，この酵素は通常の Alcohol 脱水素酵素とは異って，芳香族アルコールに特異的に作用することがわかったので，本酵素をほぼ単一にまで精製し，その諸性質を検討した。

〔研究方法〕

1．酵素の精製，無機塩培地 K_2HPO_4 0.15%，KH_2PO_4 0.05%，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%，NH_4NO_3 0.5% Yeast Extract 0.01%，全量 1.5 l の中に唯一の炭素原として，Toluene 25ml をセロフアンチューブに封入したものを投入し，25°C 40時間振盪培養する。この菌体を集めて，10% Acetone を含む 0.05M 燐酸カリBuffer pH 7.5（以下 Acetone Buffer と略す）の5倍量に浮遊させて 10KC で sonicate し，その遠心上清を Crude Extrac とする。この Crude Extract を Protamine 処理，Acetone 分画，硫安分画して一昼夜 Acetone Buffer に透析し DEAE Cellulose Column で精製した。その結果活性と蛋白量が一致した Chromatogram が得られた。この酵素は Acetone 存在下では非常に安定であるが，Acetone がなければすぐ失活する。したがって燐素の精製保存は10% Acetone 存在下で行なった。

2．超遠心。酵素1%を含むイオン強度 0.1 の Acetone Buffer を 10°C 約6万回転，70分超遠心する。超遠心パターンは単一のピークを示した。以下の実験にはすべて本精製酵素を用いた。

3．酵素反応の条件。Pyrophosphate-Buffer PH 8.5, 50μ moles. Benzylalcohol, 20μ moles. NAD, 1μ mole. 酵素，3～4μg Protein. を水で全量 3ml とし，20°C に於ける最初の15秒間の 340mμ の増加を読み，これから換算して1分間に 1μ mole の NAD を還元する酵素量を1単位とした

〔研究結果〕

1. 基質特異性。Methanol, Ethanol, Propanol の様な低分子のアルコール及び2級の Alcohol には作用せず，Benzylalcohol, Salicylalcohol に最も強く作用し，また Furfurylalcohol に少し働く。Aldehyde 側からの反応も同様の結果であった。酸化還元の補酵素としては，NAD (NADH) が特異的であり，NADP (NADPH) は全くその代用とならなかった。

2. 阻害剤の影響。PCMB に非常に sensitive で10^{-6}M で100%の阻害がある。これは 10^{-3}M の Mercaptoethanol, Cysteine, GSH, を添加すると活性は20%程度回復した。またこの阻害に対しては，基質及び NAD の保護作用は強くなかった。Hydroxylamine は 3×10^{-3}M で22%，Monojodo 酢酸は 10^{-2} Mで15%の阻害を示し，8-OH-Quinoline, α, α'-Dipyridyl は 10^{-3}M で，それぞれ43%，29%の阻害を示す。EDTA10^{-2}M または，o-phenanthroline 10^{-3}M の存在ではかえって賦活される。Fe^{++}(10^{-3}M)Zn^{++}(10^{-3}M) は阻害も賦活も示さなかった。

3. 基質に対する Km. Benzylalchol: 1.6×10^{-4}M. NAD: 6.7×10^{-5} M. Benzaldehyde: 4.4×10^{-5}M NADH: 7.7×10^{-5} M，前2者は pH8.5 Pyrophosphate Buffer. 後2者は PH 6.5 Potassium Phosphate Buffer で測定した。

4.安定性。10% Acetone Buffer 中では十分に安定であるが，Acetone が存在しないと 5°C での半減期は約1時間である。10^{-2}M の NAD. Cysteine. GSH, EDTA, Ascorbic acid などでは，安定化されないが，高濃度の硫安，硫酸ソーダ，または10〜20%の Ethanol は安定化効果をもっている。

〔結　論〕

Psendomonas の一種の菌体の抽出液から Benzylalcohol, Benzaldehyde 間の酸化還元を触媒する酵素をほぼ単一にまで精製し，その諸性質を調べた。この酵素は従来知られている Liver. Yeast などの Alcohnl 脱水素酵素とは全く異って，芳香族 Alcohol に特異的に作用する新しい型式の Alcohol 脱水素酵素であり，この菌に於けるの Toluene 代謝過程に関与するものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

土壌から分離した Pseudomononas (T_2) は，Toluene を代謝して増殖する。この菌による Tolueneの代謝経路は，増殖の際に要求するC原及び Resting Cell の酸素吸収から考えて，

Toluene→benzylalcohol→benzaldehyde→benzoate→

と考えられるが，この代謝経路に関係する酵素の中で benzylalcohol→benzaldehyde 間の酵素を超音波で可溶化することに成功し，これを単一にまで精製，その諸性質を研究したのがこの論文である。

Toluene の代謝は現在までにあまり研究されていず，僅かに1952年に Smith 等が Pseudomonas の一種の生菌を用いて，1957年に Dagley 等がこの菌の無細胞抽出液を用いて，Toluene の誘導体である P-cresol の代謝を研究したが，酵素的研究は未成功で次の経路を生菌による生成物の確認によって予想したにすぎない。

p-cresol→p-hydroxybenzaldehyde→p-hydroxybenzoate→

又 benzylalcohol, benzaldehyde 間の酸化還元を触媒するこの benzylalcohol 脱水素酵素は，通常の

Alcohol 脱水素酵素と全く異った性質を有する新しい酵素である。即ち阻害剤の研究では，Yeast alcohol 脱水素酵素を強く阻害する Monojodo 醋酸，及び Liver alcohol 脱水素酵素に鋭敏に作用する Hydroxylamine ではあまり阻害されず，キーレート試薬でも阻害がない。しかし，p-CMB に 非常に鋭敏に阻害される。基質特異性の研究に於ても，Benzylalcohol 脱水素酵素は，その基質である Benzylalcohol に最も強く働き，通常の Alcohol 脱水素酵素の基質である。Ethanol, Propanol の様な低分子のアルコールには全く作用がなく，Benzylalcohol に構造の類似したアルコールに僅か働くにすぎない。補酵素は NAD 及び NADH が特異的で，NADP, NADPH はまったくその代用とならない。

更に興味あるのは，野崎等の Metapyrocathecase の場合と同じく，この酵素はもともと不安定であるにもかかわらず，アセトンによって強く安定化され，この性質を利用して酵素精製に成功し，Column Chromatogram 及び超遠心に於て殆んど単一のパターンを得る事が出来た。

以上著者の研究は新しい芳香族アルコール脱水素酵素を発見し，Toluene 代謝を明らかにした極めて興味ある研究である。