

Title	細菌の安息香酸々化酵素の誘導機作
Author(s)	山王, 義一
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/28750">http://hdl.handle.net/11094/28750</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名・(本籍)	山	王	義	一
	さん	のう	よし	かず
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6	8	7
	号			
学位授与の日付	昭和40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	細菌の安息香酸々化酵素の誘導機作			
	(主査)		(副査)	
論文審査委員	教授 須田 正己	教授 天野 恒久	教授 川俣 順一	

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

細菌がある化学物質と接触することによって、それを特異的に代謝する酵素系を形成することは、適応酵素の問題として古くから研究されている。誘導基質に対し、その生物がどのような機序で反応するかということは、生物現象を研究するひとつの手がかりでもある。当研究室では、土壤菌による Tryptophan と Mandelate 代謝系のいわゆる“逐次的誘導形成”に関する一連の研究を行ってきた。Micrococcus ureae において *P*-クロロ安息香酸 (*P*-CIBA と略す) が安息香酸々化酵素の誘導能力を持ちながらそれ自身は代謝されない即ち non-metabolizable inducer の性質を持っていることを当研究室で見出して以来、これを利用して誘導機作の解析を進めて来た。本論文もこの研究方針に基づいて行なわれたものである。

#### 〔方 法〕

- (1) 酵素活性の測定 - Chloramphenicol 存在下で基質として Carboxyl 基ラベルの  $C^{14}$ -安息香酸を用い、誘導菌によって脱炭酸された  $C^{14}$ -炭酸ガスを  $BaCO_3$  として回収し、放射能を測定する。
- (2) 菌の培養並びに酵素誘導の条件—菌体は、予め Difco の Nutrient Broth で overnight growth したものをを用いる。誘導基質として最終濃度  $5 \times 10^{-5} M$  の *P*-CIBA を Citrate 合成培地に添加して、菌体を  $30^\circ C$  で incubate する。

#### 〔成 績〕

- (1) 酵素誘導の時間曲線—20分の Lag phase の後、酵素の誘導が始まり、1時間目以後はほぼ一定速度で、少なくとも4時間以上継続する。この間、菌体濃度にはほとんど変化が見られない。
- (2) Acetate による酵素誘導形成の抑制—誘導培地として、Citrate 合成培地に代えて培養培地と同じ Nutrient Broth を用いると、誘導基質が存在するにもかかわらず、誘導が抑制される。以上の事

実から、生理的な条件下で酵素の誘導形成を抑制する物質が Nutrient Broth 中にあるのではないかと考えられる。いくつかの炭素源について検討したところ、Glucose, Pyruvate, Succinate に較べて、Acetate が存在すると誘導形成が強く抑制されることが見出された。即ち、Citrate 合成培地に最終濃度  $10^{-2}M$  の Acetate を添加して 3 時間 incubate すると、基質があるにもかかわらず、酵素の誘導形成はほとんどない。

(3) 阻害剤の影響 — 阻害剤は基質と共に incubation の初めから添加した。用いた阻害剤の中、6-Azauracil は RNA 成分の uracil の Analog であり、6-Azathymine と 5-Bromouracil は DNA 成分の Thymine の Analog である。得られた阻害度は、 $200 \mu g/ml$  の 6-Azauracil で 90% 以上、 $100 \mu g/ml$  の 6-Azathymine で 100%、 $250 \mu g/m$  の 5-Bromouracil で約 70% であった。6-Azathymine による阻害は、P-CIBA に対して拮抗的である。

(4) “Coinducer” による酵素誘導の促進 — *Micrococcus ureae* では、Tryptophan か或いは Catechol を誘導基質と共在させると、酵素の誘導が強く促進される。即ち、 $4 \times 10^{-3}M$  の最終濃度で Tryptophan か Catechol を誘導基質と共在させると、酵素の誘導形成は 4 倍から 10 倍にわたって促進される。しかし基質が存在しないと酵素の誘導は起らない。このように基質そのものとして作用するのではなく、基質による誘導を促進するところから、Tryptophan と Catechol を “Coinducer” と呼ぶ。

(5) “Coinducer” の作用 — Coinducer は基質と共在する時ばかりでなく、一定時間基質と incubate してから、基質を洗浄除去し、培地に基質のない状態でも、Coinducer を添加すれば誘導を促進して、新たな酵素活性の増加が得られる。このように Coinducer の存在下で再び incubate することを “2nd incubation” と呼ぶ。“2nd incubation” の零時間の酵素活性を 100% とすれば、30 分で最高 140~200% に達する。*Micrococcus ureae* に誘導基質の能動的濃縮機構が存在しないことは、すでに当研究室で明らかにされている。それ故、Coinducer が基質の濃縮機構に関係している可能性は小さい。さらに、安息香酸自身も、“2nd incubation” に於いて、Coinducer としての作用をもつことが証明された。

(6) Coinducer と阻害剤の関係 — 阻害剤は “2nd incubation” の初めから添加した。P-CIBA の Antagonist である *O*-クロロ安息香酸と蛋白合成阻害剤の Chloramphenicol は完全阻害を示した。従って “2nd incubation” で得られた酵素活性の増加は、de novo の蛋白合成によるものであり、微量の P-CIBA が依然として関与していることが推論される。6-Azathymine と 6-Azauracil とでは阻害態度に大きな違いが見られた。即ち、“2nd incubation” で得られる酵素活性の増加は、 $100 \mu g/ml$  の 6-Azathymine では阻害されないのに対して、 $200 \mu g/ml$  の 6-Azauracil では約 60% の阻害が見られた。このことから、Coinducer の作用点が、6-Azauracil の作用点より前にあり、6-Azathymine の作用点に近いかそれより後にあることが示唆される。

#### 〔総括〕

- (1) P-CIBA による安息香酸々化酵素の誘導形成は、Acetate によって強く抑制される。
- (2) Coinducer の作用点が、基質の菌体内への濃縮機構にある可能性は小さい。
- (3) Coinducer の作用点は、RNA 塩基の Analog である 6-Azauracil の作用点より前にある。このことは現在の蛋白合成の scheme に従えば、Coinducer の作用点が Ribosome より前の段階にあ

ることを示唆している。

(4) 以上の成績を、“Repressor theory” によって説明するために、repressor に二つの Effective site を考える。即ち、“Inducer site” と “Coinducersite” である。“Coinducer site” に Coinducer が結合することによって、その allosteric 効果は “Inducer site” に対する基質の親和性を高める。従って、基質洗浄後の “2nd. incubation” に於いても酵素合成は起り、Coinducer 存在下では基質と拮抗する 6-Azathymine による阻害は解けるものと考えられる。

### 論文の審査結果の要旨

本論文の目的は、須田研究室に於いて独自に開発されてきた細菌の誘導酵素系を用いて、誘導基質の果す役割を明らかにすることである。

*Micrococcus urede* において *P*-クロロ安息香酸 (*P*-CIBA) が安息香酸タ化酵素 (BAO) の non-metabolizable inducer であることが見出されて以来、この誘導機作の解析を進めてきた。その結果、Tryptophan, Kynurenine, Catechol が *P*-CIBA と共存することによって、BAO の誘導形成を強く促進することが見出された。これらの物質のみでは誘導能力をもたず、基質と共存することによってのみ酵素誘導を促進するところから、“Coinducer” と名づけられた。

次に基質である *P*-CIBA と Coinducer とが、如何なる機作によって酵素の誘導形成という、現象を起すのかを明らかにすることが次の課題となった。

この問題に対して、著者は Base Analogue である 6-Azauracil と 6-Azathymine を巧みに使いわけることによって、Coinducer の作用点を推論することに成功した。それによると、Coinducer の作用点は、Ribosome より前の段階にあり、基質の菌体内への濃縮機構ではないと、現在のところいうことができる。6-Azathymine が基質と拮抗的に働くことが、さらに明らかにされた。もう一つ重要な点は、Natural inducer である安息香酸が Coinducer としての作用をもつことも確められた。

以上の成績を “Repressor theory” によって説明するために、Repressor に “Inducer site” と “Coinducer site” という二つの Effector site を想定した。“Coinducer site” に Coinducer が結合することによって、基質の “Inducer site” に対する親和性を高める。この allosteric 効果によって、これまでに得られた実験成績をすべて説明することができる。

また、“Catabolite repression” がこの誘導系にも存在することを明らかにしたことも意義のあることといえる。即ち、安息香酸の最終産物の一つである、Acetate による抑制がそれである。