



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 芳香環酸素添加酵素に関する研究                                                                                                                                 |
| Author(s)    | 喜多, 寛                                                                                                                                           |
| Citation     | 大阪大学, 1965, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/28849">https://hdl.handle.net/11094/28849</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">大阪大学の博士論文について</a>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

|           |                                               |
|-----------|-----------------------------------------------|
| 氏 名・(本籍)  | 喜 多 寛<br>き た ひろし                              |
| 学 位 の 種 類 | 理 学 博 士                                       |
| 学 位 記 番 号 | 第 6 3 8 号                                     |
| 学位授与の日付   | 昭 和 40 年 3 月 20 日                             |
| 学位授与の要件   | 学位規則第 5 条第 2 項該当                              |
| 学位論文題目    | 芳香環酸素添加酵素に関する研究<br>(主査) (副査)                  |
| 論文審査委員    | 教授 奥貫 一男 教授 松島 祥夫 教授 佐藤 了<br>教授 成田 耕造 教授 倉橋 潔 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

*Pseudomonas ovalis* の生菌あるいは無細胞抽出液を使つての実験より、p—オキシフェニル醋酸が 3,4—ジオキシフェニル醋酸を経て分解されることを見出した。

p—オキシフェニル醋酸水酸化酵素および、3,4—ジオキシフェニル醋酸—2 : 3—オキシゲナーゼを、*Pseudomonas ovalis* の p—オキシフェニル醋酸適応菌より抽出し、部分精製を行なった。その結果、前の酵素は 2 つの蛋白部分より成り、反応のストイキオメトリーは  $\text{NADH}_2$  存在下に基質 1 モルに対し 1 モルの酸素を消費して、3,4—ジオキシフェニル醋酸 1 モルを生ずる。後の酵素は基質 1 モルに対し 1 モルの酸素を消費し、その際に 3,4—ジオキシフェニル醋酸のベンゼン環の 2, 3 位を酸化的に切つて  $\alpha$ —オキシ— $\delta$ —カルボキシメチルムコン酸セミアルデヒドを生ずる。

3,4—ジオキシフェニル醋酸—2 : 3—オキシゲナーゼを、*Pseudomonas ovalis* の p—オキシフェニル醋酸適応菌のアセトンパウダーより抽出し、硫安分画、アセトン分画、 $\text{C}_{18}$ —カラムクロマトグラフィーを行なって精製し、その結晶化に成功した。酵素は無色菱形板状の結晶としてえられた。結晶酵素は超遠心的に均一で、分子量は約 100,000、5 原子の鉄を含んでおり、クロモフォアを有しない。

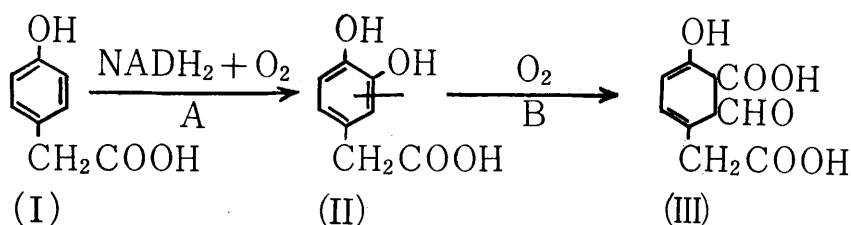
その他、本酵素の性質について報告した。

## 論文の審査結果の要旨

### 「芳香環酸素添加酵素に関する研究」

と題する喜多君の論文は 3,4—ジオキシフェニール酢酸を開裂する新酸素添加酵素を見出し、結晶化していろいろな性質を明らかにしたものである。

p—オキシフェニール酢酸に適応した細菌 (*Pseudomonas ovalis*) の無細胞抽出液に p—オキシフェニール酢酸 (I) を加えておくと次式に示すように  $\alpha$ —オキシ— $\delta$ —カルボキシメチルムコン酸



セミアルデヒド (III) が生じ、さらに代謝されることが知られた。しかし、この抽出液に硫酸アンモニウムを加えて分別塩析すると A, B 両反応を触媒する別個の酵素が得られ、両酵素を混じて定量的に (I) から (III) を生成することができる。

B 反応を触媒する酸素添加酵素が芳香環を開裂するものであるから、まずそれを精製する研究をおこなった。すなわち、上記無細胞抽出液を硫酸アンモニウム分別塩析して得た酵素液に、さらに、冷却アセトンを加えて分別沈澱して酵素をあつめ、トリス緩衝液にとかして、アルミナ C $\gamma$  カラムクロマトグラフィーを施し高純度の酵素液を得て、それに硫酸アンモニウムを少量ずつ添加、氷室に放置すると無色菱形板晶が得られる。この結晶酵素は物理化学的分析によって均一質で、分子量約10万と計算され、5 原子の鉄をふくむ。アミノ酸分析の結果システイン残基8ケのうち—SH 基が6ケ検出された。本酵素は既知酸素添加酵素の基質であるカテコール、ホモゲンチジン酸、プロトカテク酸などには全く作用せず、3,4—ジオキシフェニール酢酸を特異的に酸化するもので、 $K_m = 2.6 \times 10^{-5} \text{M}$ 、至適 pH 8.0 を示した。本酵素はメタピロカテラーゼと似た性質もあるが、それより幾分安定である。窒素中で徐々に失活する場合に、 $\text{Fe}^{++}$  または低濃度のアセトンやエタノールなどを添加すると失活を防止できる。また過酸化水素処理で部分的に失活した酵素に  $\text{Fe}^{++}$  を加えると完全に活性を回復することなどから本酵素作用には二価鉄が必須であると推定される。

化学量論的關係は上式に示したように (II) に対して 1 分子の酸素が消費され、1 分子の反応生成物を生成するのであるが、それが (III) であることを同定するために化学的、物理化学的分析などをおこない、 $\alpha$ —オキシムコン酸セミアルデヒド誘導体であることが推定された。したがって、本酵素の酸化作用はピロカテラーゼ型に属するものではなく、メタピロカテラーゼ型であると考えられ、芳

香環開裂が2 : 3位であるか、4 : 5位であるかを決定する実験に移った。反応生成物を酢酸アンモニウムを飽和した氷酢酸中で処理してピリジン誘導体にみちびき、さらに過マンガン酸カリウムで側鎖の酸化をおこないピリジン—2,5—ジカルボン酸と同定できた。したがって、反応生成物は(Ⅲ)であることが明らかになった。

要するに喜多君の論文は不安定で精製困難とされていた新しい酸素添加酵素を結晶化し、その触媒反応や諸性質を明らかにしたものであるから、酵素化学の知見に貢献するところが大である。参考論文をも考慮して理学博士の学位論文として十分に価値あるものと認める。