

Title	微生物におけるPhenylalanineの代謝：とくに Phenylpyruvate decarboxylaseについて
Author(s)	麻川, 武雄
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29152
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

【 1 】

氏名・(本籍)	麻 川 武 雄 あさ かわ たけ お
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 1 3 6 号
学位授与の日付	昭 和 4 2 年 3 月 2 8 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	微生物における Phenylalanine の代謝—とくに Phenylpyruvate decarboxylase について—
論文審査委員	(主査) 教 授 山 野 俊 雄 (副査) 教 授 萩 原 文 二 教 授 吉 田 博

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

フェニールアラニン (Phe) は動物においてチロジン (Tyr), Homogentisate を経て分解される経路が主経路である。しかしながら Phenylpyruvate (以下 Phe-Pyr と略す) を経て Phenylacetic acid (Phe-AA と略す) への経路の存在も考えられ、とくに Phe からへ Tyr の反応が欠除した Phenylketonuria においては多量の Phe-Pyr, Phe-AA, Phenylacetyl-glutamine が尿中に排泄されること、等からは Phe 脱アミノされた後 Phe-Pyr が脱炭酸反応をうけて Phe-AA になる経路の存在が考えられている。この Phe-Pyr から Phe-AA への経路に関しては動物のみならず微生物においてもほとんど報告がない。1962年 Seidenberg 等は Proteus 菌の菌体懸濁液と Phe を incubate すると medium から Phenylacetaldehyde が検出されることを報告した。私は細菌を用いて上記経路を確立し酵素的に解明することを目的とした。

〔 方 法 〕

1) 実験に用いた細菌は Phe を唯一の炭素源として土壤中より分離した *Achromobacter eurydice* である。培養培地の組成は 0.2% Phe, 0.05% KH_2PO_4 , 0.15% K_2HPO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5% NH_4NO_3 である。

2) Phenylacetaldehyde (以下 Phe-Ald と略す) の定量

詳細は省略するが、2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH と略す) で 2,4-DNP-Hydrazone として Phe-Pyr と Phe-Ald を分別定量する方法を確立した。

又酵素的測定としては本菌に存在する Phe-Ald dehydrogenase を用いた。すなわち本菌の粗抽出液をアルカリ性硫酸溶液に対して透析することにより Phe-Pyr 脱炭酸酵素をアポ化し、40°C 5分加熱し Phe-Pyr 脱炭酸酵素を失活させた Sample を用いた。

3) アミノ酸の菌体内への“とりこみ”は Millipore filter を用いて菌体を集め、ガスフローカウンターで測定した。

〔成績〕

I 無細胞抽出液における代謝

本菌の静止菌はほぼ理論値の O_2 uptake を示して Phe を完全に酸化分解するが、その無細胞抽出液には Phe から Phe-AA を形成する酵素系が存在することを認めた、すなわち Phe は Transaminase によって Phe-Pyr となり、Phe-Pyr は Thiamine pyrophosphate (以下 TPP と略す)、 Mg^{++} を補酵素とする Phe-Pyr decarboxylase によって非酸化的に脱炭酸されて Phe-Ald となり、さらに Phe-Ald は NAD を補酵素とする Phe-Ald dehydrogenase によって Phe-AA に酸化されることを明らかとした。さらに Phe-AA の酸化系を無細胞状態にとり出すべく種々検討したが成功しなかった。

II Phe-Pyr decarboxylase の精製及びその諸性質

a) 精製；本菌を石英砂で磨碎して $10,000 \times g$ の上清を粗酵素液とした。これを硫酸分画し $105,000 \times g$ 上清を用い、Cholate 処理、熱処理 ($40^\circ C$ 10分)、硫酸分画、プロタミン処理、ECTEOLA-cellulose によるカラムクロマトグラフィーを行ない約60倍精製した。本酵素は粗酵素液においても不安定であったが、 $10^{-4} M$ TPP の存在により安定化され、 $30^\circ C$ 24時間活性の低下が認められなかった (PH 6.3, タンパク 0.5 mg/ml)。従って本酵素の精製は TPP 存在下に行なわれた。しかしながら DEAE-cellulose, Calcium phosph. gel, Alumina C_γ などのイオン交換体により吸脱着を行なうと、活性の回収率は10~20%ときわめて低下した。この原因は現在明確ではない。ECTEOLA-cellulose では約50~60%の回収率を示し、他のイオン交換体よりも有効であった。

b) 反応生成物の同定；基質として Phe-Pyr を用い、反応生成物を 2,4-DNP hydrazone として上記 (方法の項) に述べた方法により分別抽出し、酢酸エチル、アルコール (アルコール 5 容, 水 7 容) などを用いて橙色結晶を得た。同様に合成品の Phe-Ald を用い、その 2,4-DNP hydrazone を結晶に得て、Authentic Sample とした。

		C	H	N
元素分析	理論値	56.00%	4.03%	18.60%
	Authentic	55.70	3.90	18.39
	反応生成物	55.45	4.39	17.11
融点	Authentic	121.5°C	反応生成物	121.0~122.5°C
赤外吸収スペクトル	反応生成物と Authentic Sample とは一致した			

以上の結果より反応生成物は Phe-Ald と同定された。

c) Stoichiometry；基質である Phe-Pyr の減少量と Phe-Ald の生成量、 CO_2 発生量とが一致した。さらに反応は時間と共に直線的に進行した。

d) 補酵素；本酵素は60%硫酸溶液 (pH 9.7, $5^\circ C$) に対して透析することにより完全にアポ化され、これに TPP を添加すると80~90%活性が回復した。又金属に関しては酵素標品を $10^{-2} M$ EDTA に対して透析すると活性は50%に低下したがこの標品に $10^{-3} M$ Mg^{++} を添加すると活性は回復した。他の金属は効果なく Cu^{++} , Zn^{++} は強力な阻害を示した。

e) 基質及び補酵素の K_m ;

Phe-Pyr に対する K_m は $5.1 \times 10^{-5} M$, TPP に対しては K_{mapp} $1.0 \sim 1.5 \times 10^{-6} M$

f) 基質特異性;

Phe-Pyr 100%, p-Hydroxyphe-Pyr 0%, Indole pyruvate 50%, α -Keto- γ -methiobutyrate, α -Keto- γ -ethiobutyrate, α -Keto-caproate は夫々約30%の活性を有し, α -Keto-isocaproate 5%, α -Keto- β -methylvalerate, pyruvate, α -Kgはいずれも0%であった:これらの結果より炭素鎖6個以上の α -Keto酸が基質となると考えられる。

III 生菌における代謝

基質特異性の所で示した如く, Phe に生育させた本菌において上記3つの酵素はPhe, Phe-Pyr, Phe-Ald の他, Try, Indole pyruvate Indole Acetaldehyde に対しても夫々約50%の活性を有していた。従ってこの菌において Try も Phe と同様の経路で分解される可能性がある。そこでこの菌を Try を唯一の炭素源として生育させた所 Phe 生育菌と同様にその菌体抽出液に Transaminase, Decarboxylase, Dehydrogenase が存在し Try も Phe と同様に Indoleacetate まで代謝されることが判明した。そこでこの菌の resting における Phe, Try の分解を調べるために酸素電極法で O_2 uptake を調べると両者に差異が認められた。すなわち Phe 生育菌では Phe によって著明な O_2 uptake を認めるが Try では全く O_2 uptake を認めず逆に Try 生育菌では Try で著明な O_2 uptake を認めるが Phe で全く O_2 uptake を認めなかった。従って菌体内における Try, Phe の分解経路は同一であるに拘らず生菌において細胞内への基質の透過性が異なっていることが考えられた。そこで Phe- ^{14}C , Try- ^{14}C を用いて菌体内へのとりこみを調べたところ, Phe 生育菌, Try 生育菌の両者でやはり差異が認められ, またそのとりこみは $10^{-3} M$ 2,4-DNP で完全に阻害されることが認められた。このような現象の説明として permease の関与を仮定すると Phe 生育菌と Try 生育菌とでは夫々 Phe 或いは Try に対する異なった permease が誘導されていることが示唆された。

〔総括〕

土壤中より分離した *Achromobacter eurydice* を用いて Phe が Phe-Pyr, Phe-Ald を経て Phe-AA へ分解される経路を明らかにし Phe-Pyr 脱炭酸酵素について酵素学的にその性質を明らかとした。さらに本菌において Try も Phe と同様に Indole Pyruvate, Indole acetaldehyde を経て Indoleacetate に分解されることを明らかにした。さらにその際 Phe 生育菌と Try 生育菌とでは共通の酵素によって Phe-AA, Indole acetate まで代謝されるが両アミノ酸の細胞内へのとりこみの機構は両者で異なっている可能性が認められた。

論文の審査結果の要旨

本論文は微生物 (*Achromobacter eurydice*) を用いて, Phenylalanine の代謝経路を明らかにし, とくに Phenylpyruvate decarboxylase について精製を行ない, その諸性質を明らかにしたものである。Phenylalanine は動物においては, Tyrosine, Homogentisate を経て分解される経路が主経路であるが, Phenylpyruvate を経て Phenylacetate となる経路の存在も考えられる。とくに, Phenylketonuria では尿中に多量の Phenylpyruvate, Phenylacetate, Phenylacetylglutamine などが排泄されることが知られている。著者は動物における, この酵素系の解明を最終目標として, まず細菌における Phenylpyruvate の代謝系の解析を行なった, その結果 Phenylpyruvate は非酸化的に脱炭酸されて Phenylacetaldehyde となり, さらに NAD を補酵素とする dehydrogenase によって酸化されて Phenylacetate となり, さらに静止菌においては容易に炭酸ガスと水に分解されることを証明した。Phenylpyruvate decarboxylase および Phenylacetaldehyde dehydrogenase の段階は可溶化された。このうち前者について種々な精製法を試み, 約50倍の精製をみた。

本酵素は Thiamine-Pyrophosphate, Mg^{++} を補酵素とし1分子の Phenylpyruvate から1分子の Phenylacetaldehyde と CO_2 を stoichiometrically に生成した。本酵素の精製過程で見いだされたことは精製するにつれて酵素の不安定さを増すことであった。本酵素精製で有効であったのは Cholate 処理であり, 本酵素が lipid とかなり密接な関係を有して存在している可能性が強く示唆された。著者は精製と共に次第に不安定化する原因として lipid 部分の解離を想定している。イーストのピルビン酸脱炭酸酵素をふくめて, α -ケト酸の脱炭酸酵素の精製は困難であり, 上記のような性質が共通にあると考えられ, その意味においても本論文の意義は大きいと考える。