

| | |
|--------------|---|
| Title | カタラーゼの有機過酸化物依存ペルオキシダーゼ活性について |
| Author(s) | 細川, 幹夫 |
| Citation | 大阪大学, 1986, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/35053 |
| 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

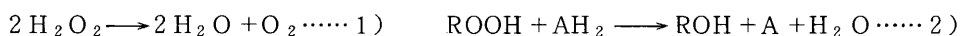
<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

| | | | | |
|---------|------------------------------|---------|---------|--------|
| 氏名・(本籍) | ほそ 細 | かわ 川 | みき 幹 | お 夫 |
| 学位の種類 | 薬 | 学 | 博 | 士 |
| 学位記番号 | 第 | 7062 | 号 | |
| 学位授与の日付 | 昭和61年1月8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 | カタラーゼの有機過酸化物依存ペルオキシダーゼ活性について | | | |
| 論文審査委員 | (主査) | | | |
| | 教授 柘井雅一郎 | | | |
| | (副査) | | | |
| | 教授 | 池原 森男 | 教授 | 佐々木喜男 |
| | | | 教授 | 富田 研一 |

論文内容の要旨

カタラーゼは、カタラーゼ活性と呼ばれる1)の反応を触媒する。また、ペルオキシダーゼ活性と呼ばれる2)の反応も触媒することが知られている。



このROOHには、 H_2O_2 以外に、Ethylhydroperoxide (EHP) などがあり AH_2 としては、メタノール、ヒドロキシルアミンなどが知られている。反応機構としては中間体としてCompound I (ROOH - Catalase) を形成するところの Ping - Pong メカニズムであるとされている。Cumenehydroperoxide (CHP) や、tert - Butylhydroperoxide はカタラーゼの可視吸収スペクトルの変化の測定によりCompound I の形成が認められないことから、過酸化物として利用できないとされてきた。一方、カタラーゼがCHPを利用してアミノピリンを酸化し、ホルムアルデヒドを生成するという報告もされている。そこで、

- 1) カタラーゼが本当にCHPを利用してアミノピリンを酸化できるのか。
- 2) 利用できるとしたら、どのような反応機構で行なわれるのか。
- 3) 他の基質では、どのように反応するのか等を明かにするためにカタラーゼのペルオキシダーゼ活性の詳細を検討した。

Beef liver から抽出した市販のカタラーゼ数種類についてCHP依存アミノピリン酸化活性、カタラーゼ活性、メタノール酸化活性について比較した。その結果、カタラーゼ活性とメタノール酸化活性は、再結晶品が高く、一方CHP依存アミノピリン酸化活性は、凍結乾燥品が高かった。再結晶品、凍結乾燥品および凍結乾燥品をアルカリ処理(pH11.9)したカタラーゼについてゲルろ過を行った。再結晶品は、分子量約240000

に相当する部分に紫外吸収のピークが観察され、凍結乾燥品では 240000 以外に、分子量約 60000 に相当する部分にショルダーが観察され、アルカリ処理した直後のカタラーゼでは、このショルダー部分が増加した。アルカリ処理後、pH を 7.45 にして 30 分放置したカタラーゼでは、このショルダーは消失していた。カタラーゼ (四量体) をアルカリ処理すると、単量体になるという報告がすでになされているが、このショルダーが単量体である可能性が考えられる。再結晶品、凍結乾燥品のそれぞれをアルカリ処理したところ、カタラーゼ活性、メタノール酸化活性のいずれも低下したが、アミノピリン酸化活性は上昇した。再結晶品のアミノピリン酸化活性の上昇率の方が凍結乾燥品より大きくアルカリ処理後のアミノピリン酸化活性の値は、両者の間にあまり差がなかった。アルカリ処理後、pH を 7.45 にして 2 時間放置後、活性を測定すると、再結晶品でカタラーゼ活性は 30%、メタノール酸化活性は、ほぼ 100% まで回復し、かつアミノピリン酸化活性は、高い値を保持していた。以上の事より、アミノピリン酸化活性は、カタラーゼの四量体によるものであることがわかった。

カタラーゼの CHP 依存アミノピリン酸化反応において、反応中間体としてアミノピリンカチオンラジカルを ESR で検出することができた。また、アミノピリンの酸化反応生成物として、ホルムアルデヒドが、CHP の還元生成物として 2-Phenyl-2-propanol (クメノール) が、検出された。但し、ホルムアルデヒドとクメノールの生成量は、1 : 1 とならなかった。アミノピリンカチオンラジカルが生成するところから一電子酸化であると思われるが、クメノールしか検出できず、アセトフェンは検出されなかったこと、メチルラジカルも検出できなかったことなどから、クミルオキシラジカルが反応の Driving-force ではないと思われる。カタラーゼ活性の阻害剤であるアジ化ナトリウムを、カタラーゼ活性を 93% 阻害する量添加しても、CHP 依存アミノピリン酸化活性は、30% しか、阻害されなかった。アミノピリンを加える前に、CHP をカタラーゼ溶液に加えると、アミノピリン酸化活性を阻害するが、CHP を H_2O_2 を加える前にカタラーゼ溶液に加えても、カタラーゼ活性に影響を与えない。

カタラーゼ活性について、その反応機構は、Compound I を形成するところの Ping-pong メカニズムであるといわれているが、阻害剤の影響の違いなどにより、アミノピリン酸化活性は、その反応機構が異なるのではないかと考えた。そこで、生成するアミノピリンカチオンラジカル吸光度の時間変化を測定し、生成速度を求め、Lineweaver-Burk のプロットより、反応機構を検討した。その結果直線が一点に交るところから、三者複合体を形成する Sequential な機構であることがわかった。(Ping-Pong では、直線群が、平行になる。

CHP の代わりに、過酸化フェニル酢酸 (以下 PPAA と略す。) を用いたところ、主生成物は、フェニル酢酸であり、ベンジルアルコール (以下 BA と略す。) は、2.5% しか生成しなかった。カタラーゼが存在しなくても、PPAA とアミノピリンは、反応するが、その時は BA は、添加した PPAA に対して 7% 生成する。PPAA との反応においてもカタラーゼを介する一電子酸化であることがわかった。アミノピリンの代わりに、ジメチルアニリン類を用いて反応を行ったところ、アミノピリンと異なり、クメノールとホルムアルデヒドの生成比は、1 : 1 となった。また、カチオンラジカルを ESR で観察することができ、ホルムアルデヒドの生成より Lineweaver-Burk のプロットを行ったところ、一点で交ったことから、ジメチルアニリンでも三者複合体を形成する Sequential な機構であることがわかった。

論文の審査結果の要旨

本論文は、従来より各種の説が出されていて反応機構が渾沌としていた表題の問題について、主としてクメンハイドロパーオキサイドとアミノピリンを使用し、カタラーゼの処理法による検討から始め、一電子酸化生成ラジカルのESRによる測定、速度論的手法を用い、さらに基質を変えて検討を行なうことにより、ほぼその全容を知り得たものであり、学位論文として評価出来るものとする。