



|              |  |
|--------------|--|
| 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          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/35053">https://hdl.handle.net/11094/35053</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|         |                                       |         |         |        |
|---------|---------------------------------------|---------|---------|--------|
| 氏名・(本籍) | はそ<br>細                               | かわ<br>川 | みき<br>幹 | お<br>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)<br>教 授 枝井雅一郎                     |         |         |        |
|         | (副査)<br>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、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 以外に、Ethylhydroperoxide (EHP)などがあり  $\text{AH}_2$ 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。Cumene hydroperoxide (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、アセトフェノ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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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の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うことにより、ほど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考える。