

氏名	小野克彦 おの かつ ひこ
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第351号
学位授与の日付	昭和43年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科生理系専攻
学位論文題目	プロトカテキユ酸—4, 5—二原子酸素添加酵素の精製とその諸性質

論文調査委員 (主査) 教授 早石 修 教授 島本暉朗 教授 沼 正作

### 論文内容の要旨

芳香族化合物が生体内で酸化代謝される一般的な反応型式は、まず芳香環が水酸化されてフェノールあるいはカテコール誘導体となり、ついで酸化的環開裂反応によって分解される。カテコール誘導体の環開裂の型式には2種あり、一つは2個の水酸基の間の炭素—炭素結合が切れる型（ピロカテカーゼ型）、他は水酸基に隣接する位置の炭素—炭素結合が開裂する型（メタピロカテカーゼ型）であって、両者とも基質に分子状酸素を取り込むいわゆる二原子酸素添加酵素に属する。

著者は、メタピロカテカーゼ型の酸素添加酵素の反応機構を解明するために、材料としてプロトカテキユ酸—4, 5—二原子酸素添加酵素を取り上げ、これをほぼ均一蛋白にまで精製した。そして本酵素は非ヘム鉄を唯一の補因子とする鉄蛋白であり、しかも鉄は二価鉄の状態直接活性に関与していることを明らかにし、さらに反応に関する一般的諸性質について多くの知見を得た。

緑膿菌より抽出した粗酵素を約50倍精製した結果、比活性  $157 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg protein}$  ( $24^\circ\text{C}$ ) の精製標品が得られた。この標品は、超遠心的、電気泳動的にほぼ均一であり、セファデックスゲル濾過法による分子量測定の結果は分子量約150,000、また1モルの酵素中に1グラム原子の鉄を含む。精製酵素の吸収曲線は、 $280\text{m}\mu$  に吸収極大、 $290\text{m}\mu$  に肩を有するのみで可視部領域には何ら吸収は認められず、ヘムあるいはフラビンを含まない。

本酵素は1モルのプロトカテキユ酸と1モルの酸素を消費して1モルの $\alpha$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -カルボキシムコン酸セミアルデヒドを生成する。反応の至適 pH は7.0、プロトカテキユ酸及び酸素に対する  $k_m$  はそれぞれ  $8 \times 10^{-5}$  モル、 $5 \times 10^{-5}$  モルである。基質特異性をみると、プロトカテキユ酸に特異的に作用し、他のベンゼン誘導体を酸化しない。本酵素の安定性の至適 pH は7.5であるが、本酵素活性はこの至適 pH においても極めて不安定で  $0^\circ\text{C}$  あるいは室温何れに保存しても一夜で50%以下に低下する。このようにして失活した酵素は二価鉄あるいは還元剤を添加しても活性を回復しない。そこで酵素活性に対する種々の安定化操作を試みた結果、10%エタノールのみが顕著な保護作用を示した。しかしエタノールは

反応液中に存在すると基質に対する拮抗阻害剤となる。これはエタノールが酵素蛋白の活性中心あるいはその近傍に作用して酵素の安定化剤として働くと同時に反応に際しては、酵素と基質の結合を妨げているためであると考えられる。さらに本酵素はパラクロロ水銀安息香酸やメルサリルなどの SH 試薬あるいは過酸化水素等の酸化剤によって失活するが、後者の場合還元剤により再賦活できる。しかし、本酵素は鉄酵素であるにもかかわらず、オルトフェナントロリン、 $\alpha$ 、 $\alpha'$ -ジピリジル、チロンなどの金属キレート剤による活性の阻害は認められない。これらの事実は鉄が蛋白と強固に結合していることを示唆する。

一方、本酵素は反応中に急速に失活するがこの失活酵素は前述の保存による失活と異なり、嫌気的条件下で二価鉄を添加することにより、その活性を回復する。一般にメタピロカテカーゼ型二原子酸素添加酵素は反応中に失活する傾向があり、その原因は不明であったが、以上の実験結果は、反応中の失活現象が反応に伴った活性中心からの鉄の遊離に起因し、さらに反応中にその蛋白構造及び鉄と蛋白との結合様式に変化の起っていることを示唆する。この反応失活現象は、反応の定常状態においてのみ起ることから、反応に密接な関係があり、活性中心における鉄の役割及び酸素添加反応の機構解明に重要な手がかりを与えるものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

生体内におけるカテコール誘導体の酸化的環開裂反応には2個の水酸基の間で切れるピロカテカーゼ型と今ひとつは水酸基に隣接する二重結合が開裂するメタピロカテカーゼ型があることが知られている。著者はメタピロカテカーゼ型の酸素添加酵素の反応機構を解明するために緑膿菌からプロトカテキユ酸-4,5-二原子酸素添加酵素を精製しその性質や反応機構をあきらかにした。本酵素はすでに1957年 Dagley らによって記載されているが、きわめて不安定であるためその性質があきらかでなかった。著者は10%のエタノールが顕著な保護作用をすることを発見し、粗酵素を約50倍精製した結果、ほぼ超遠心的、電気泳動的に均一な蛋白標品をうることに成功した。分子量は約15万、1モルの蛋白中に1グラム原子の2価鉄を含んでいるが、ヘムやフラビンを認めない。反応速度論的研究および阻害実験等の結果から鉄は蛋白に強固に結合しているが、反応中に鉄が遊離し失活する現象を認めた。

本論文は学術上有益であり、医学博士の学位論文として価値あるものと認定する。