

氏名	中澤晶子
	なかざわてるこ
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第302号
学位授与の日付	昭和42年5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	酸素添加酵素の反応機構の研究 —— Pyrocatechase の反応における鉄の役割について ——

論文調査委員 (主査) 教授 早石 修 教授 山田 肇 教授 島本 暉朗

論文内容の要旨

酸素添加酵素は分子状酸素を有機物中にとりこみ、核開裂反応や水酸化反応を行なう一群の酵素で、アミノ酸代謝、ホルモン、ビタミンの生合成をはじめ、薬物毒物の代謝など種々の生理的に重要な反応に関与していることが明らかにされている。したがってこのような酵素の反応機構の研究は、これら生体必須物質や薬物毒物の代謝過程の解明に重要な知見を与えるものと考えられる。

ピロカテカーゼは、これら酸素添加酵素の中で最初に発見された酵素であり、カテコールを核開裂して、シス、シスムコン酸を生成する反応を触媒する。本酵素に関しては従来、1分子中に2原子の非ヘム鉄が含まれることが明らかにされていたが、その反応機構、とりわけ鉄の役割については不明の点が多く残されていた。

著者は高度に精製された酵素標品を用いて、唯一の補因子である鉄の存在状態ならびに反応への関与を電子スピン共鳴スペクトルその他の手段により解析し、本酵素の反応機構の研究を行なった。

まず、赤色を呈する精製酵素を用いて電子スピン共鳴スペクトルを測定した結果、g値が4.28に三価鉄に由来すると考えられる鋭いシグナルを認めた。このシグナルは酵素に還元剤を加えると減少し、それに酸素を加えるともとにもどった。さらに種々の処理により酵素を失活させると、褪色に伴ってシグナルの減少が認められた。これらの事実は、酵素蛋白に特異的に結合した三価鉄が活性の発現に重要な役割を持つことを示している。

次に酵素を還元剤および二価鉄キレート剤で処理すると鉄を持たない無色の酵素標品がえられた。この標品はシグナルおよび酵素活性を持たないが、これに好氣的条件下で二価鉄を加えるとシグナル、活性、赤色のいずれも回復した。しかし三価鉄を加えた場合にはこれらの回復は認められなかった。一方嫌氣的条件下で二価鉄を加えると赤色の回復が認められず、酸化剤を加えてはじめて赤色が現われた。従って、鉄はまず二価の状態では酵素蛋白と結合し、次いで酸化されて三価の状態になると考えられる。

本酵素に基質カテコールを加えるとg値が4.28のシグナルは消失し、肉眼的に灰青色を呈した。これ

に酸素を通じてカテコールを消費させると再びもとのシグナルが現われ、色も赤色にもどった。同様の変化はカテコールと同じく本酵素により分解されるメチルカテコールやクロルカテコールによっても認められたが基質とならない他のカテコール類似物質では認められなかった。このように基質を加えた際に認められる電子スピン共鳴スペクトルならびに色の変化は、基質が酵素の活性中心に存在する三価鉄と反応してその電子状態に強く影響していることを示唆する。この推論はさらに、還元剤および二価鉄キレート剤を加えると酵素が失活する際（鉄の酵素蛋白からの脱離）カテコールの添加がこの失活を防ぐという実験事実からも支持される。

以上の実験結果から、ピロカテカーゼは活性中心に三価鉄を有し、それに基質であるカテコールならびに酸素が結合して酵素—カテコール—酸素の三者複合体を形成し、複合体内での電子移動の結果活性化されたカテコールと酸素とが反応してシス、シス—ムコン酸を生ずるという反応機構が考えられる。

従来ピロカテカーゼの活性中心に存在する鉄は二価の状態であると考えられていたが、酸化剤や還元剤に対する安定性その他の性質の中で解釈の困難な点が多くあった。この論文ではじめて活性酵素に含まれる鉄が従来の説と異なり三価の状態であることが明らかにされこれらの諸性質が矛盾なく説明できるようになり、酸素添加酵素の反応機構の解明の上で、新しい重要な知見が提供された。

論文審査の結果の要旨

著者は高度に精製されたピロカテカーゼを用いて電子スピン共鳴スペクトルを測定した結果、 g 値が4.28に三価鉄に由来すると考えられる鋭いシグナルを認めた。

次に酵素を好氣的または嫌氣的条件で還元剤、酸化剤、二価および三価の鉄キレート剤で処理したり、基質カテコールや基質のアナログを加えて $g=4.28$ のシグナルとスペクトルおよび酵素活性を比較することにより、本酵素は活性中心に三価鉄を有し、それに基質であるカテコールならびに酸素が結合して酵素—カテコール—酸素の三者複合体を形成し、複合体内での電子移動の結果活性化されたカテコールと酸素とが反応してシス、シス—ムコン酸を生ずるという反応機構が明らかになった。じゅうらい本酵素の鉄は二価鉄と一般に考えられていたが、以上の所見は本酵素の活性中心にある鉄が三価であることをあきらかにし、さらにその反応機構を解明して、酸素添加酵素の反応機構に重要な知見をもたらした。

本論文は学術上有益にして医学博士の学位論文として価値あるものと認定する。