

氏 名	堀 和 子 ほり かずこ
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医 博 第 450 号
学位授与の日付	昭 和 48 年 11 月 24 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	Kinetic studies on the reaction mechanism of dioxigenases (二原子酸素添加酵素の反応機構についての速度論的研究)

論文調査委員	(主 査) 教 授 沼 正 作	教 授 佐 野 晴 洋	教 授 早 石 修
--------	--------------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

芳香族化合物の酸素添加酵素による核開裂反応は殆んどすべて2原子の酸素分子を基質へ導入する二原子酸素添加酵素に属している。O-ジヒドロキシフェニル化合物を開裂する二原子酸素添加酵素には水酸基の間を開裂してムコン酸誘導体を生成してオルト型又は *intradiol* 型と呼ばれるものと水酸基の隣りを開裂して α -ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド誘導体を生成しメタ型又は *extradiol* 型とよばれるものの2型がある。前者は3価鉄を唯一の補因子とし後者は2価鉄を唯一の補因子としているので、鉄の荷電状態と2基質即ち有機基質と酸素との関係については議論がなされてきた。そこで両型の酵素について2つの基質の反応順序を明らかにする為に定常状態における速度論的解析を行った。

オルト型の酵素としては、p-ヒドロキシアニソ酸を唯一の炭素源として生育させた *Pseudomonas aeruginosa* より約30倍精製した結晶酵素プロトカテキン酸 3,4 オキシゲナーゼを、メタ型としては安息香酸を含む培地で生育させた *Pseudomonas arvilla* より精製結晶化したメタピロカテカーゼを用いた。

両酵素を用いてそれぞれの基質濃度を变化させた初速度解析から速度と基質の関係を逆数プロットすると、いずれの場合も一点に集まる交叉線群が得られた。この結果はいずれの酸素も反応中間体として酵素、有機基質、酸素の三者複合体を形成する事を示唆する。

そこで反応順序を決めるため、有機基質のアナログを *dead end inhibitor* として用い阻害様式をしらべた。*dead end inhibitor* として、メタピロカテカーゼに対してはオルトニトロフェノールおよびメタフェナントロリンを、プロトカテキン酸 3,4 オキシゲナーゼに対してはプロトカテキアルデヒドを用いた。いずれの酵素の場合も阻害剤は有機基質に対しては拮抗的に、酸素に対しては非拮抗的に阻害し、阻害剤の濃度に対する勾配及び最大速度の逆数のプロットは直線になった。これらの結果は両酵素ともに有機基質が先に酵素と反応し、次いで酸素と反応して三者複合体を形成し反応生成物を生ずるという反応様式と矛盾しない。

次に、反応生成物による阻害を調べた結果、メタピロカテカーゼの場合は有機基質、酸素いずれの基質

に対しても非拮抗的に阻害し、反応生成物に対する勾配及び最大速度の逆数のプロットはいずれも放物線状になった。この結果は反応生成物が活性中心のみならず他の部位にも何らかの機序で結合している事を示唆する。一方プロトカテキン酸 3,4 オキシゲナーゼについては非常に高濃度の反応生成物を用いても顕著な阻害はみられなかった。従ってこれら反応生成物阻害の実験結果からは Rapid equilibrium random 機構の可能性は完全には否定出来なかった。しかし、メタピロカテカーゼについては野崎らの結合実験より又、プロトカテキン酸 3,4 オキシゲナーゼについては、藤沢らによる分光学的解析より、遊離の酵素が有機基質と反応して基質酸素複合体を形成する事が報告されている。一方あらゆる試みにも拘らず遊離の酵素と酸素の相互作用を示唆する実験結果は得られていない。これらを考え合わせると補酵素の鉄の荷電状態に拘らず両型の酵素とも先ず有機基質と反応して基質酸素複合体を形成し次いで酸素と反応して三者複合体を形成し反応産物を生ずる反応機構 (Ordered Bi Uni 機構) が最も妥当であると推定される。

論文審査の結果の要旨

カテコール体の核開裂反応を触媒する二原子酸素添加酵素には二価鉄を含むものと三価鉄を含むものがある。このような鉄の荷電状態の差により酵素の反応機構に差があるか否かは議論の多い点であった。著者は二価鉄を含むメタピロカテカーゼおよび三価鉄を含むプロトカテキン酸 3,4 二原子酸素添加酵素を用い、反応定常状態における速度論的解析より両酵素の反応機構の比較検討を行った。

いずれの酵素反応においても基質濃度を変化させた初速度解析からの速度と基質の逆数プロットが一点に集まる交叉線群を与えること、ならびに基質とならない有機基質類縁体 (dead end inhibitor) が有機基質に対して拮抗的に、酸素に対して非拮抗的に阻害することから、いずれの酵素の場合も有機基質が先ず酵素と結合し、ついで酸素と反応して酸素化型三者複合体を形成し反応生成物を生ずるという反応機構を想定した。

生理的に重要な働きをしている酸素添加酵素の反応機構ならびに酸素活性化機構が注目を集めている今日、本研究成果はこれらの問題点を解明する一つの糸口ともなるものである。

よって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。