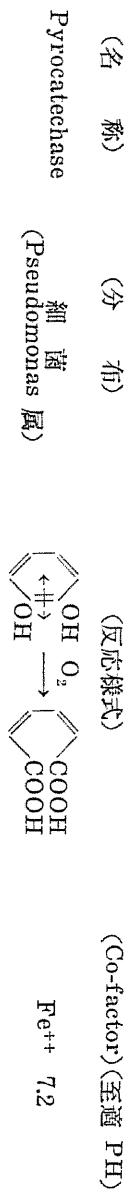


医学博士市原硬君及び医学博士須田正巳君の「二、三アミノ酸の中間代謝及び之に関する酵素の研究」に対する授賞審査要旨

一 Oxygenase への架け橋

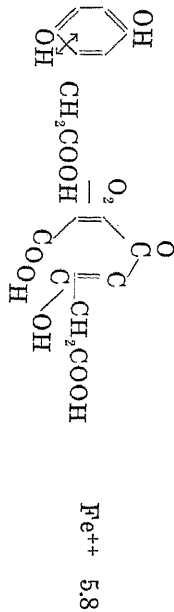
基質の酸化に、直接、分子状酸素が関与する酵素反応の発見は、この数年來のことである。この進展をもたらした原因は二つの方向から考えられる。第一は、従来の酸化還元酵素の諸性質——特殊な Prosthetic group に基づく Spectral analysis、色素還元能、特殊阻害剤による分析——を全く具備しない Aerobic な酸化酵素の発見と、第二は、 $O_2$  を利用しての反応解析である。

この分野で、先鞭をつけたのは、須田正巳君等の見出した二種類の酵素であった (Pyrocatechase, Homogenisticase)。彼等は最初、微生物の基質適応能を利用して、物質代謝経路を追跡する方法 (Successive Adaptation Technique) を考案し、これによつて、芳香族アミノ酸である Tryptophan 及び Phenylalanine の代謝経路を研究中、前者は Anthranil 酸-Catechol をへて、後者は Homogentisin 酸をへて、おのづからインゼン核が酸化的核開裂を受けることを知った。分離精製された二つの核開裂酵素についての知見は次のようであった。



Homogentisicase

類 菌 (Pseudomonas 属)  
及び哺乳動物の肝臓



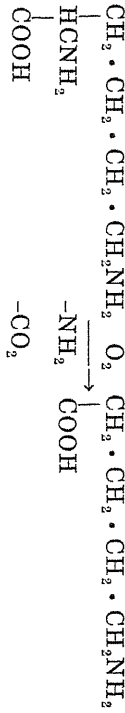
この酵素の発見の意義と、Fe<sup>++</sup> の役割について述べてみると

- ① 生物体内でメンゼン核が酵素的に開裂する事実の最初の報告であること。
- ② 酸化反応であるが、従来の生体酸化還元酵素の特性は全く無く、分子状酸素が介入すること。
- ③ 二価鉄を唯一の Co-factor として、酵素反応中、鉄イオンは二価の状態にとどまり、Fe<sup>++</sup> Fe<sup>+++</sup> のエレントロン授受の反応は無い。
- ④ 基質と分子状酸素の存在下に、反応中の Fe<sup>++</sup> は、酵素蛋白質との結合状態が変化し、外部から与えた Fe<sup>+++</sup> と Exchange し、その速度は、酵素反応速度と比例する。この事実は、Fe<sup>++</sup> が普通の Metal Enzyme のように、基質と Apoenzyme を結合する Bridge として作用するのではなく、酸素を活性化する機構と結びついていることを示している。
- ⑤ Fe<sup>++</sup> は、両酵素共、酵素蛋白質の Tyrosine 残基と関連があり、基質は Fe<sup>++</sup> の結合基とは別の場所で即ち -SH 基と、酵素と結合するといわれる。
- ⑥ Pyrocatechase は単一蛋白質にまで純化され、分子量八四、〇〇〇、分子内の Fe<sup>++</sup> 対蛋白質の比は 1:1 である。

する。

これらの成績は、須田君らが一九五〇年以來続行したものであり、ことに  $Fe^{+}$  の必要性については、内外共に疑問視された時期もあったが、その後、3-Hydroxyanthranil 酸、或は Homocatechur 酸等のインゼン核開裂酵素が外国研究者によって報告され、これらは須田君らの研究に基づいて、 $Fe^{+}$  を Co-factor とする事実を認めており、現在では、少なくともインゼン核の酸化的な開裂には、すべて  $Fe^{+}$  と Co-factor とする酵素が関与すると言つてよい。

現在、芳香族化合物の核酸化、核開裂に関与する酵素に対して、Oxygenase 及び Hydroxylase なる名称が与えられているが、この反応は必ずしも芳香族化合物の酸化だけではない。須田君らは最近、L-Lysine に対して適応させた細菌体から、その酸化酵素を分離精製し、この酵素が、L-Lysine を、分子状酸素と酸化し、 $\delta$ -Aminovalerian 酸になることを証明した。



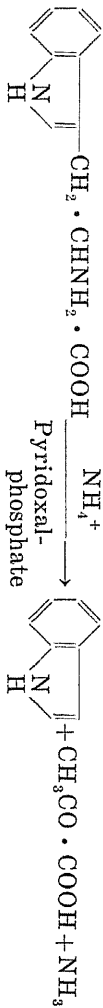
本酵素にも、従来の酸化還元酵素の諸性質が全く認められない上、京大、早石教授らとの協同研究( $O_2$ )を使って、反応終産物を分析するに依り、 $\delta$ -Aminovalerian 酸の  $\text{COOH}$  基に  $O^{18}$  が転入してゐることも明らかとなつたので、一種の Oxygenase とするものは間違いない。

## 二 核分離反応の発見

市原硬君は Tryptophan から Indole を形成する酵素を大腸菌より分離する研究中、Indole の母体となる物質は、生菌体内で Tryptophan の栄養的代償をする誘導体、例えば L(+) Indole 乳酸、及び Tryptophan 自体であるのに注目し、恐らく Indole は Tryptophan から直接 Indole 核が分離するのでもう一つ早くから想定していたが(一九三七年)、この酵素の分離精製によって現在定説になつた Tryptophanase 反応が明らかになつた。

なお L(+) Indole 乳酸の分離は市原君の発見による。従来の Tryptophan に *Oidium lactis* を使たらせて得られた Indole 乳酸は栄養的に不活性で且つこれからは Indole は形成されず、市原君がはじめて分離した Indole 乳酸は栄養的に Tryptophan の代償をおこなひ、又 Indole を形成した。

本酵素の高活性な Sample が得難い原因は、単なる助酵素部分 (Pyridoxalphosphate) の離脱ではなくして、 $\text{NH}_4^+$  が、Tryptophanase の Co-factor となつており、微量のこの陽イオンを添加しないと、反応は殆ど進行しないという重要な知見を見出したのは市原君らの業績による。



この酵素の構成要素が早く市原君らにより研究されたため、精製された Apo-enzyme を用ひ、Tryptophanase 反応を利用して逆の Co-enzyme である Pyridoxalphosphate を酵素的に定量する方法を確立することができた。

この方法のすぐれた点は微量定量法であり、Apo-enzyme が容易に得られる点にあり、わが国のみならず各国の研究  
者によって利用されている。

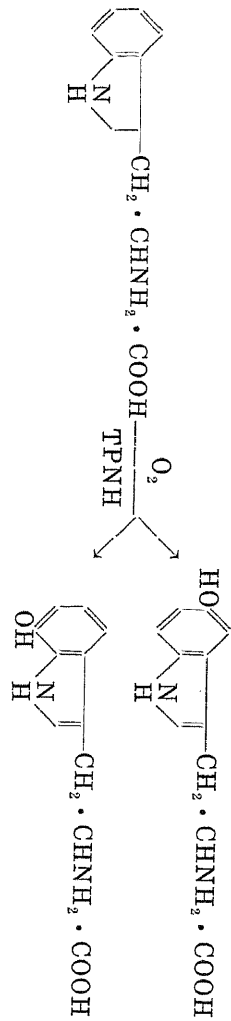
この直接の、核分離反応の知見に立って、市原君らは同じく大腸菌を用い、Tyrosine から Phenol 形成反応を酵  
素的に証明し、 $\beta$ -Tyrosinase と命名した。精製された本酵素も又 Co-factor として、Pyridoxalphosphate 及び  
 $\text{NH}_4^+$  を必要とし、Phenol は Tyrosine から直接に形成される。



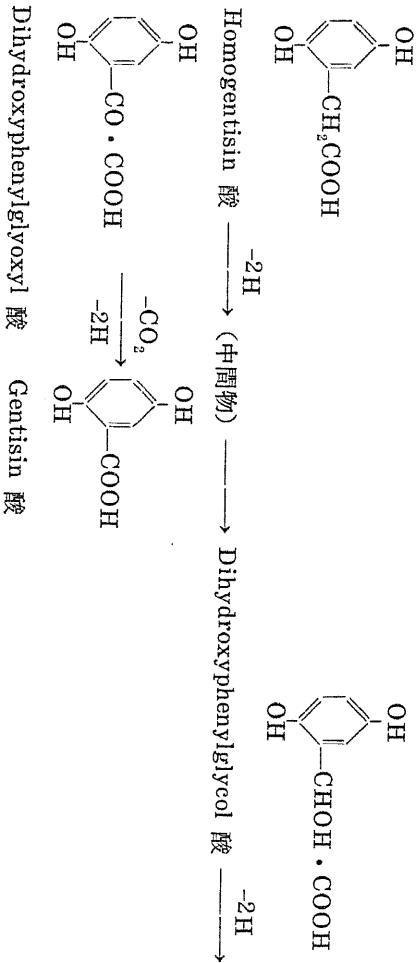
O—或は m-Tyrosine は基質となり得ないことも明らかにされた。以上二つの酵素に関する研究は、核分離反応  
の酵素的解明として専ら、市原君らに負うものである。

### III Tryptophan, Tyrosine の異常代謝

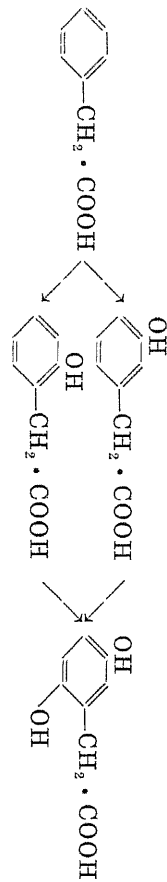
市原君らは、Tryptophanhydantoin を尿に投与し、その尿が強い酸性 Diazo 反応を呈すること、及び Tryptophan のインゼン核部分(五、及び七位)に—OH 化されると、この反応を与えること、更に発色時間の著明な差  
から、5-Hydroxy 及び 7-Hydroxy-Tryptophan を分別定量出来ることを見出した。が、キヌレンは Serotonin は五  
位が—OH 化されているが、七位が—OH 化された Tryptophan 誘導体の証明は初めてである。Indole 化合物を  
化学的ならしし肝臓から分離した Hydroxylase や TPNH 存在下に酸化すると、五位又は七位が Hydroxyl 化され  
るが、両方へ同時に—OH が入る事はないのである。



市原君らは、先天性及び実験的 Alcapton 尿中の Homogentisin 酸以外の Gentisin 酸が存在するものと、肝臓に於て Homogentisin 酸を Gentisin 酸とする酵素が存在するものとを知り、Tyrosine 代謝の正常中間物質である Homogentisin 酸の一部が、この副道を行つて側鎖の炭素が短縮して Gentisin 酸になることを述べた。



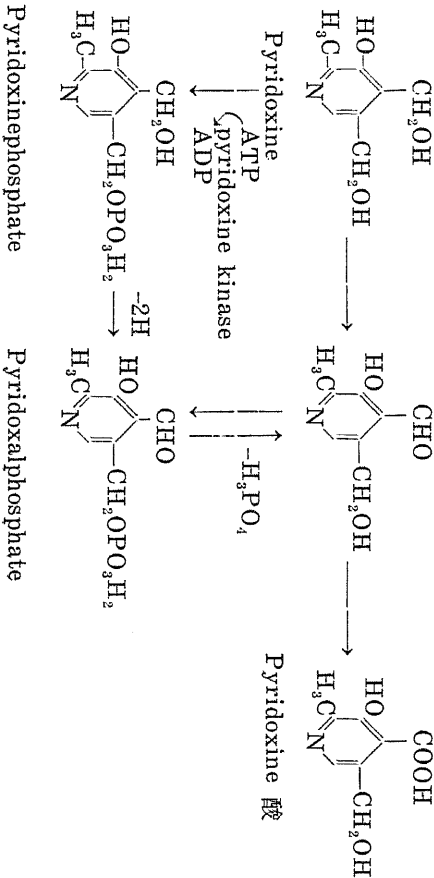
又、市原君らは、肝臓抽出液に TPNH を加え、Phenyl 醋酸から、O-或は m-Hydroxyphenyl 醋酸をくづし、Homogentisin 酸に至る反応があることを証明した。



須田君らは、Sealock (一九四一年) の、ビタミンC欠乏のモルモットに Tyrosine を与えず、実験的 Alcapton 尿を誘発させる報告を検討し、ビタミンC欠乏状態のモルモットの肝臓について、前述の Homogentisicase の活性を測定した。尿に Homogentisin 酸が増加するにつれて、肝臓の当該酵素活性は低下するが、この低下した活性は *in vitro* で本酵素の Co-factor である  $Fe^{++}$  を加えることによって著しく活性が回復する事実、及び  $Fe^{++}$  と錯塩を形成し、本酵素の特殊阻害剤である  $\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl をモルモットに注射すると、たとえビタミンCを投与しても動物は著明な Alcapton 尿を呈するところを明らかにした。この時期の肝臓から Homogentisicase を分離すると活性は著しく低下したが、*in vitro* で  $Fe^{++}$  を加えると正常の活性を回復する。以上の諸事実は、ビタミンC欠乏に基づく Alcapton 尿の本態が、Homogentisicase の Apo-enzyme 部分の不活化にあるのではなく、その Co-factor としての  $Fe^{++}$  level の肝臓内維持機構に関与性を示すものであることを示していると共に、実験的 Alcapton 尿の原因を明らかにしたものである。

### 四 Pyridoxal 燐酸の生成機作と生理的意義の拡張

市原君らは、Tryptophanase 反応を明らかにする研究を進めるうちに前述のように本酵素の Apo-enzyme 部分を容易に分離する方法を確立し、これによつて、逆に、その Co-enzyme である Pyridoxal phosphate の微量定量を Tryptophanase 活性から測定する道をひらいた。これによつて、市原君らは、動物肝臓及びビタミン B<sub>6</sub> から Pyridoxal phosphate が合成される酵素を分別し、次のような反応によることを明らかにした。即ち Pyridoxine は Kinase によつて、その 4-位が燐酸化され、その後、4位の -CH<sub>2</sub>OH が酸化され Pyridoxal phosphate となる反応が主道である。Pyridoxal が燐酸化される可能性は少ない。





というのは、Pyridoxine → Pyridoxal の反応は、Pyridoxine 燐酸 → Pyridoxal 燐酸の反応に比して極めて弱いことが、酵素反応上明らかになられたからである。

一方、須田君らは、白鼠の小腸還流実験 (in vivo) 及び反転した小腸管による方法 (in vitro) に基づいて、L-アミノ酸の吸収機作を研究し、天然型アミノ酸は、濃度勾配に反して積極的に吸収され、非天然型は Diffusion による吸収であるが、前者の場合 Pyridoxalphosphate が直接に関与することを明らかにした。この助酵素が、主としてアミノ酸代謝に重要な役割を果たしていることは、よく知られた事実であるが、L-アミノ酸の腸管からの Active な吸収反応に関与するという事実は、ビタミン B<sub>6</sub> の生理的意義が一層拡張されたことを意味する。