



アニリン誘導体の微生物代謝：4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸の微生物代謝

折居, 千賀

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2006-03-25

(Date of Publication)

2016-02-29

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3560

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003560>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

アニリン誘導体の微生物代謝：
4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸の微生物代謝

平成 18 年 1 月

神戸大学大学院自然科学研究科

折居千賀

目 次

序 論	1
第1章 <i>Bordetella</i> sp. 10dにおける4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝・ 酵素系の解析	
第1節 序	4
第2節 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸分解酵素系の解析	4
第3節 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸分解酵素系の生産特性	12
第4節 要約と考察	19
第2章 <i>Bordetella</i> sp. 10dの生産する2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミ アルデヒドデアミナーゼの精製および特性解析	
第1節 序	20
第2節 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド分解酵素の酵素活性 測定法の確立	20
第3節 酵素の精製	22
第4節 精製酵素の特性解析	28
第5節 酵素反応機構の解析と2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド デアミナーゼの命名	37
第6節 要約と考察	44
第3章 <i>Bordetella</i> sp. 10dの生産する2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼの精製および特性解析	
第1節 序	50
第2節 酵素の精製	50
第3節 精製酵素の特性解析	55
第4節 酵素反応生産物の分離・同定および反応機構の解析	61
第5節 要約と考察	63
第4章 <i>Bordetella</i> sp. 10dの生産する4-オキサロクロトン酸 タータメラーゼ の精製および特性解析	
第1節 序	67
第2節 酵素の精製	67
第3節 精製酵素の特性解析	73
第4節 酵素反応生産物の分離・同定および反応機構の解析	83
第5節 要約と考察	85

第5章	<i>Bordetella</i> sp. 10d の生産する 4-オキサロクロトン酸デカルボキシラ 一ゼおよび 2-オキソペント-4-エン酸ヒドラターゼの精製および特性 解析	
第1節	序	89
第2節	酵素の精製	89
第3節	精製酵素の特性解析	99
第4節	酵素反応生成物の分離・同定および反応機構の解析	109
第5節	要約と考察	114
第6章	代謝経路	
第1節	序	118
第2節	4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝における最終代謝産物の分離・同定	118
第3節	<i>Bordetella</i> sp. 10d における 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝経路 の決定および既報の代謝系との比較	120
総括		124
Summary		128
参考文献		131
謝辞		134

序 論

芳香族アミン類の代表的な化合物であるアニリンは染料、溶剤、樹脂、医薬品の原料として利用されている工業化学製品であり、化学合成法により年間約 21.4 万トン（平成 11 年）生産されている¹⁾。また、アニリン誘導体である 2-アミノフェノールおよびその誘導体もまたアゾ系および硫化染料の原料、毛皮や毛髪の色染剤の合成中間体等に用いられる重要な工業化学製品¹⁾であり、製品や廃液を通して環境中に放出・蓄積されることが予想される。そこで、このような化合物の微生物分解の行方「metabolic fate」、つまり無機化への分解機構を明らかにし、自然界における炭素および窒素循環サイクルに組み込むことは環境保全の面から重要である。しかしながら、アニリンおよび 2-アミノフェノール以外にその微生物分解経路に関する詳細な報告は少ない。

2-アミノフェノールおよびそのメチル、クロロ、カルボキシ誘導体^{2)~6)}はいくつかの例外^{8)~10)}を除いてニトロベンゼンおよびその誘導体の微生物代謝における代謝中間体であるとされている。ニトロベンゼン資化性菌 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 株を含む数種の菌株においてニトロベンゼン類はニトロ基の還元および酵素的な Bamberger rearrangement を経て 2-アミノフェノール類に変換されて代謝される^{4, 5, 7, 10)}。当研究室では 2-アミノフェノール資化生菌 *Pseudomonas* sp. AP-3 株における 2-アミノフェノールの代謝に関与する酵素系およびその遺伝子群の解析を進めてその代謝系を明らかにした¹¹⁾。同代謝経路は既報のカテコールのメタ開裂経路 (Fig. 6-2(B))³⁹⁾とは異なり、アミノ基が遊離することなくベンゼン環の開裂や酸化ステップが見られた。この代謝系における key 酵素は初発酵素である 2-アミノフェノール 1,6-ジオキシゲナーゼとアミノ基の遊離を触媒する 2-アミノムコン酸デアミナーゼであり^{11, 13, 14)}、これら 2 つの酵素は酵素化学的諸性質およびアミノ酸配列においてカテコール代謝に関与する酵素系とは相違が見られた。以上のことから 2-アミノフェノールの代謝経路は既報のカテコールのメタ開裂とは異なり変則的であることから「modified meta-cleavage pathway」(Fig. 6-2(A))と命名した^{11, 13, 14)}。

Pseudomonas sp. AP-3 株や、*P. pseudoalcaligenes* JS45 株は 2-アミノフェノールを 2-アミノムコン酸 6-セミアルデヒドを経て 4-オキサロクロトン酸に変換する^{11, 13, 14)}。4-オキサロクロトン酸は 2-アミノフェノールの変則的なメタ開裂経路およびカテコールのメタ開裂経路の両方において見られる代謝中間体であるが、4-オキサロクロトン酸の代謝様式は互いに異なっている。つまり、2-アミノフェノールの代謝系には 2-ヒドロキシムコン酸ハイドロラーゼおよび 4-オキサロクロトン酸タータメラーゼは存在しないことが酵素および遺伝子の解析より明らかとなっている。その後、ニトロベンゼン資化生菌 *Pseudomonas putida* HS12 株および 2-ニトロ安息香酸資化性菌 *Pseudomonas fluorescens* KU-7 株における代謝遺伝子群の解析もなされ、これらの菌株は AP-3 株と類似した代謝系にて 2-アミノフェノール類を代謝することが報告された^{6), 15)}。しかし、2-アミノフェノール類に対する完全な代謝経路や脱アミノ反応後の代謝に関与する酵素の特性についての詳細な報告はほとんどなく、AP-3 株における 2-アミノフェノール代謝系においてのみ代謝に関与する酵素系

およびその遺伝子群の解析が行われている。

当研究室では4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸を唯一の炭素源、窒素源およびエネルギー源として生育する4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸資化性菌 *Bordetella* sp. 10d 株を分離し、初発のベンゼン環開裂酵素である4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼの精製およびその特性解析、遺伝子解析について報告した^{16, 17)}。10d 株由来のジオキシゲナーゼは既報の芳香族化合物代謝関連酵素とは異なる新規の酵素であった。4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 (Fig. 0-1, Compound I) は代謝系における初発酵素である4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼによってベンゼン環の開裂を受け、2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド (Fig. 0-1, Compound II) へと変換される¹⁶⁾。しかしながら、*in vitro*において非酵素的に2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドが2,5-ピリジンジカルボン酸 (Fig. 0-1, Compound III) に変換されるため¹⁶⁾、脱アミノ反応を含む2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド以降の代謝系は明らかになっていない。

そこで、本研究では4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸資化性菌 *Bordetella* sp. 10d 株における代謝系においてベンゼン環開裂以降、脱アミノ反応を含む代謝・酵素系を明らかにすることを目的とした。まず、4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝に関与する酵素系を検索した。さらに、見出した酵素の精製および特性解析を行い、反応機構の解析を行った。代謝および酵素系の解析により本菌における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝経路を明らかにし、既報の芳香族化合物代謝に関与する酵素系および代謝系の比較を行った。

本論文は、序論、第1章から第6章、総括により構成される。第1章では *Bordetella* sp. 10d 株において本菌が生産する4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝に関与する酵素系の検索について述べる。第2章～第5章では見出した同菌株由来の分解酵素の精製と特性解析、他酵素との比較について述べる。第6章では本菌における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝における最終代謝産物を同定し、第2章から第5章で明らかにした代謝および酵素系をまとめ、*Bordetella* sp. 10d 株における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝経路について述べ、既報の芳香族化合物代謝経路との比較を行う、最後に総括において総合的に考察する。

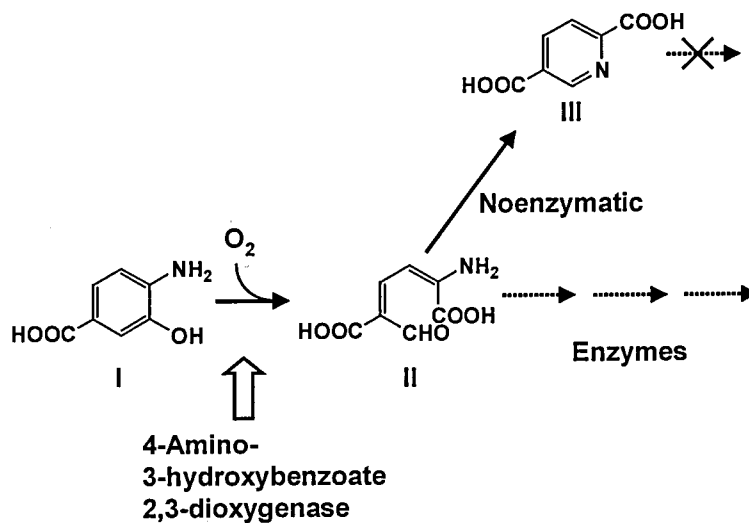


Fig. 0-1. Proposed pathway of 4-amino-3-hydroxybenzoate metabolism in *Bordetella* sp. strain 10d.

Proposed pathway of 4-amino-3-hydroxybenzoic acid in *Bordetella* sp. strain 10d¹⁶⁾. I, 4-amino-3-hydroxybenzoic acid; II, 2-amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde; III, 2,5-pyridinedicarboxylic acid.

第1章 *Bordetella* sp. 10dにおける4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝・酵素系の解析

第1節 序

当研究室において4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸を唯一の炭素源、窒素源およびエネルギー源として生育する4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸資化性菌 *Bordetella* sp. 10d 株を土壌より分離した¹⁶⁾。本菌において4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸は、初発酵素である4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼによりベンゼン環の開裂を受け、2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドに変換される¹⁶⁾。しかし、それ以降の代謝・酵素系はいまだ明らかではない。本章では2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド以降の代謝に関与する酵素系の検索を目的とする。

4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地で培養して得た菌体より無細胞抽出液を調製し、4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸との反応を行い、分光光学的変化より同代謝系を推定する。また、既報の芳香族化合物の代謝系より推定される代謝中間体を基質として反応を行い、4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝に関与する酵素系も推定する。さらに、比較対照として4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸を添加しない完全合成培地にて培養して得た菌体より無細胞抽出液を用いて、見出した各酵素の生産特性も明らかにする。

第2節 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸分解酵素系の解析

<方法>

1. 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地での培養

(1) 種菌スラントの調製

唯一の炭素源、窒素源、エネルギー源として0.12% (w/v) 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸(東京化成工業, 東京)を含む固体培地(Table 1-1)を用いて *Bordetella* sp. 10d 株を30°Cで3日間培養し、種菌とした。A液およびB液はオートクレーブにて別々に殺菌し、C液は濾過除菌装置を用いて除菌した。

(2) 前培養

6.7 ml の0.12% (w/v) 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸液体培地(Table 1-1)に(1)の種菌より *Bordetella* sp. 10d 株を1白金耳植菌し、30°Cで24時間振とう培養を行った。

(3) 本培養

(2)で得られた培養液25 mlを1% (w/v) 肉エキスを含有する0.12% (w/v) 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地400 ml (3 L 振盪フラスコ, Table 1-1)に接種し、同フラスコ6本を用いて、30°Cで16時間振盪培養した。遠心分離(8,000×g, 10分)により菌体を回収し、0.8% (w/v) NaCl 溶液で2回洗浄した後-20°Cで保存した。

Table 1-1. 4-Amino-3-hydroxybenzoic acid medium for *Bordetella* sp. 10d.

A) Buffer solution (100 ml, pH 6.8)	
KH ₂ PO ₄	0.45 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.80 g
NaCl	0.10 g
Yeast extract	0.04 g
Agar	3.00 g
B) Metal solution (30 ml)	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.10 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.10 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.10 mg
ZnCl ₂	0.10 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.10 mg
C) Substrate solution (70 ml, pH 6.8)	
4-Amino-3-hydroxy benzoic acid	0.24 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.60 g

2. 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸を基質とした際の酵素反応

無細胞抽出液の調製、および硫酸分画におけるすべての操作は4°C以下で行った。遠心分離は全て、13,000×g, 10分間の条件で行った。

(1) 無細胞抽出液の調製

湿菌体1gあたり10mlの20mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0, 以下buffer A)を加えて懸濁後、KUBOTA model 201 M Isonator (クボタ商事, 東京)を用いて菌体懸濁液(10ml)を180 W, 5分間で2回超音波処理した。得られた破砕液を遠心分離し、上清を無細胞抽出液とした。

(2) 除核酸操作

無細胞抽出液に、20% (w/v) 硫酸ストレプトマイシン溶液を終濃度が1% (w/v) となるように攪拌しながら添加した。30分間攪拌した後、遠心分離により沈殿した核酸を除き、上清を得た。

(3) 硫安分画

(2) の酵素液に磨砕した硫安を 35%飽和になるように攪拌しながら加えた。添加後 30 分間攪拌し、遠心分離によりタンパクの沈殿を除去した。得られた上清に硫安を 75% 飽和となるように加え、30 分間攪拌後に遠心分離により沈殿を回収した。沈殿を buffer A 2 ml に溶解し、粗酵素液とした。

(4) 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸と粗酵素液との反応

Table 1-2 に示した反応液を用い、24°Cで 10 分間反応を行った。硫安分画後の粗酵素液を添加することにより酵素反応を開始した。反応開始後、2 分おきに反応液の 200~500 nm における吸収スペクトルの変化を Beckman DU 650 分光光度計 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) を用いて測定した。その後、酵素反応液に 5 mM NAD⁺溶液 0.1 ml を添加し、2 分おきに吸収スペクトルの変化を測定した。

Table 1-2. Reaction mixture for enzyme assay.

100 mM Sodium-potassium phosphate (pH 7.5)	2.90 ml
5 mM 4-Amino-3-hydroxybenzoic acid	0.10 ml
Enzyme	0.10 ml
Total	3.10 ml

3. 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを基質とした際の酵素反応

<方法>

(1) 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドの合成

児玉らの方法に従い¹⁸⁾、アニリン資化性菌 *Pseudomonas* sp. AW-2 株由来のトランスポゾン変異株 Y2 株の休止菌体を調製し、カテコールより 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを調製した。その方法を以下に示す。

(i) 種菌スラントの調製

抗生物質を添加した LB 固体培地 (Table 1-3) に Y2 株グリセロールストック溶液を塗抹し、30°Cで 1 日間培養後、現れたコロニーを次の前培養用種菌とした。

(ii) 前培養

同 LB 液体培地 (5.7 ml/tube) に (1) の前述の平板培地上から 2~3 コロニーを移植し、30°Cで 24 時間振盪培養を行った。

(iii) 本培養

Y2 株本培養の培地組成を Table 1-4 に示す。A 液 (50 ml/500 ml コルベン) と C 液はオートクレーブにて別々に殺菌した。B, D, E, F 液はそれぞれ濾過除菌装置を用いて滅菌した。B 液 80 ml に対して C 液 (4.8 ml), D 液 (4.8 ml), E 液 (4.8 ml), F 液 (0.96 ml) を加えて混合し、同混合液 10 ml をコルベン (A 液) に分注した。(ii) で

得られた培養液 5 ml を本培養培地（フラスコ 4 本）に接種し、30°C で 15 時間振盪培養した。遠心分離（8,000×g, 10 分）により菌体を回収し、0.8% (w/v) NaCl 溶液で 2 回洗浄した。得られた菌体を再び 0.8% (w/v) NaCl 溶液にて濁度 (OD₆₆₀) が 6~8 となるように懸濁し、基質合成のための休止菌体として用いた。

(iv) 休止菌体を用いた 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドの合成

0.02% (w/v) のカテコール（和光純薬，大阪）を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8.8）100 ml に対して金属溶液（0.01% (w/v) MgSO₄·7H₂O, 0.001% (w/v) CaCl₂·2H₂O, 0.01% (w/v) FeCl₃·6H₂O）を 0.5 ml 添加し、反応用の短管（17.5×130 mm）に 1.5 ml ずつ分注した。その後、休止菌体懸濁液を 0.3 ml ずつ添加し、30°C, 150 rpm で 45 分間振とうした。遠心分離（13,000×g, 10 分）により菌体を除き、2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド溶液を得た。同溶液を 100 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液（pH 7.5）にて 375 nm における吸光度が 1.2~1.3（モル吸光係数[4.4×10⁴]¹⁹⁾ から 0.027 mM~0.030 mM に相当する。）となるように希釈することにより基質溶液とした。

Table 1-3. LB medium for strain Y-2.

Polypepton	1.0 g
Yeast extract	0.5 g
NaCl	1.0 g
0.1% (w/v) Streptomycin sulfate solution	0.15 ml
0.01% (w/v) Neomycin sulfate solution	0.03 ml
Agar	1.5 g
H ₂ O (pH 6.8~pH 7.1)	100 ml

Table 1-4. Medium for 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde production by strain Y-2.

A) Sodium succinate solution (400 ml, pH 6.5)	
Succinic acid disodium salt	4.80 g
Urea	0.048 g
Meat extract	0.48 g
H ₂ O	400 ml
B) Substrate solution (80 ml)	
Anilium chloride	0.48 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.048 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.48 g
K ₂ HPO ₄	0.895 g
KH ₂ PO ₄	0.523 g
H ₂ O	80 ml
C) Metal solution (4.8 ml)	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.048 g
H ₂ O	100 ml
D) Vitamin solution (4.8 ml)	
Biotin	0.1 mg
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	10 mg
Riboflavin	10 mg
Calcium pantothenate	20 mg
Nicotinic acid	20 mg
Pyridoxine hydrochloride	20 mg
Tiamine hydrochloride	20 mg
Inositol	20 mg
H ₂ O	100 ml
E) 0.1% (w/v) Streptomycin sulfate	4.8 ml
F) 0.05% (w/v) Neomycin sulfate	0.96 ml

(2) 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドと無細胞抽出液との反応

Table 1-5 に示した反応液を用い、24°C で反応を行った。まず、2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを含む反応液に無細胞抽出液を加えて反応を開始した。3 分後さらに NAD⁺ を添加した。375 nm における吸光度の変化を日立 U-2000 形ダブルビーム分光光度計（日立製作所、東京）を用いて測定した。コントロールは酵素液のかわりに水を用いた。

Table 1-5. Reaction mixture for enzyme assay.

100 mM Sodium-potassium phosphate buffer (pH 7.5)	2.80 ml
5 mM NAD ⁺	0.10 ml
0.88 mM 2-Hydroxyomuconic 6-semialdehyde	0.10 ml
Enzyme	0.05 ml
Total	3.05 ml

<結果>

4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地で培養して得られた菌体より調製した粗酵素液を反応液中に添加すると、基質（4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸）由来の 264 nm および 294 nm における吸光度の減少とともに 375 nm における吸光度が増加した (Fig. 1-1 (A))。さらに反応を 10 分間続けたが 375 nm に吸収を示す化合物はさらに変換されることなく、蓄積したままであった。同化合物は分光光学的²⁰⁾に 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドの蓄積によるものであると予想した。そこで、補酵素類を反応液に添加することで以降の代謝酵素系の検索を行なった。反応液に NAD⁺ を添加すると、NAD⁺ の還元をしめす 340 nm の吸光度の増加とともに 375 nm における吸光度の減少が見られた (Fig. 1-1 (B))。つづいて、2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドをカテコールより酵素法にて調製し、基質として酵素反応を行った。反応液に無細胞抽出液のみを添加した場合は基質由来の 375 nm における減少は見られなかった。しかし、反応開始 3 分後に NAD⁺ を添加すると同時に 375 nm における吸収の減少が見られた (Fig. 1-2)。

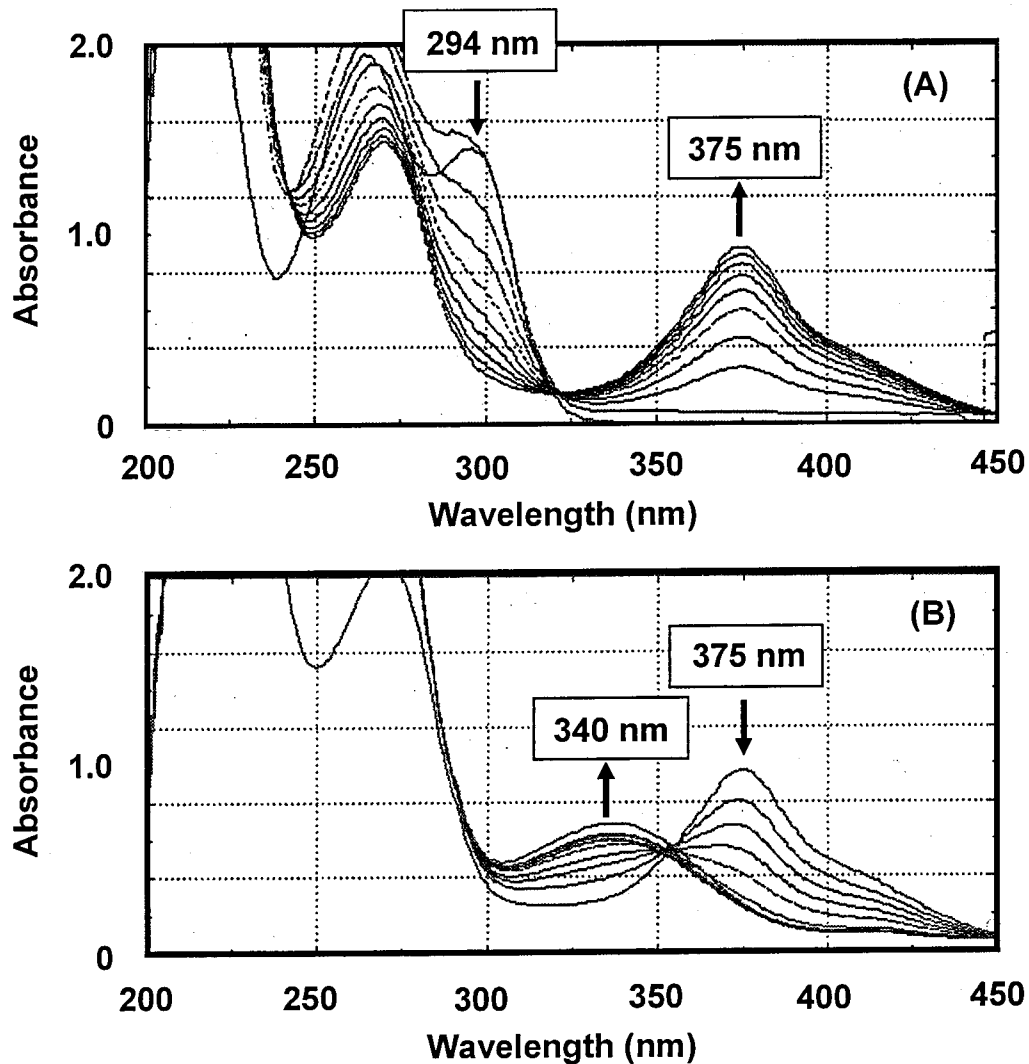


Fig. 1-1. Absorption spectra of the reaction products from 4-amino-3-hydroxybenzoic acid in an assay with crude extract.

(A) The reaction mixture consisted of 2.9 ml of 100 mM sodium-potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.1 ml of 5 mM 4-amino-3-hydroxy benzoic acid, and 0.05 ml of the crude extract (35-75% ammonia sulfate saturation) ($61 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). The reaction was started by adding the enzyme solution. After incubation at 24°C the sample was scanned with a spectrophotometer and spectra were recorded every 2 min. (B) After 10 min incubation, 0.1 ml of 5 mM NAD^+ was added to the reaction mixture.

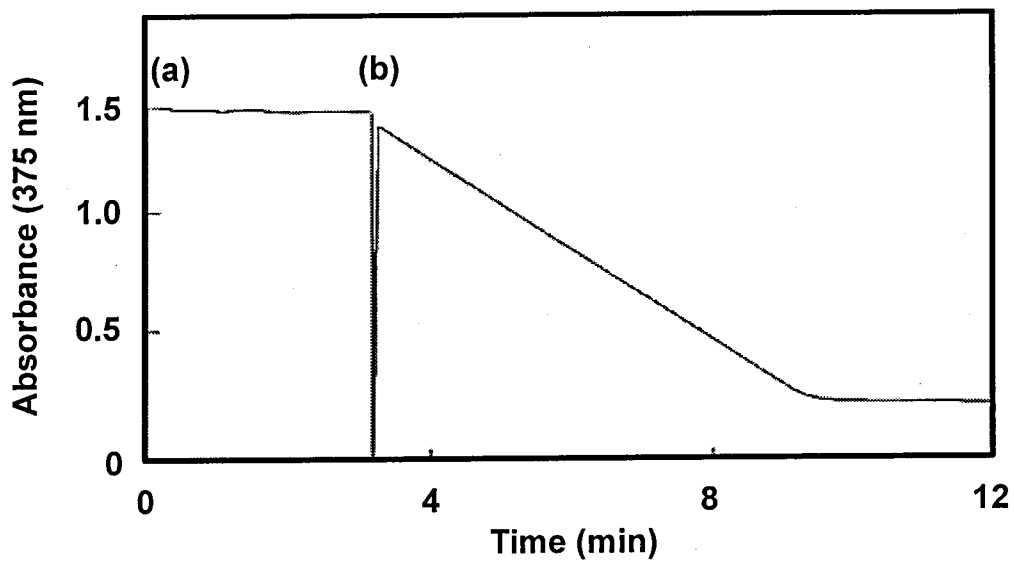


Fig. 1-2. Conversion of 2-hydroxyruconic 6-semialdehyde by cell extracts of *Bordetella* sp. 10d in the absence (a) and the presence of NAD⁺ (b).

The reaction mixture contained 2.65 ml of 100 mM sodium-potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.15 ml of crude extract (11.8 mg·ml⁻¹), and 0.1 ml of 0.88 mM 2-hydroxyruconic 6-semialdehyde. The reaction was started by the addition of crude extract. (a) After 3-min incubation, 0.1 ml of 5mM NAD⁺ was added. (b) The absorbance was measured on a Hitachi U-2000 spectrophotometer.

第3節 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸分解酵素系の生産特性

<方法>

4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地における本菌の培養は第2節で述べた方法に従った。また、4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸の代わりに炭素源としてコハク酸二ナトリウムおよびグルコース、窒素源として NH_4NO_3 を含む培地で本菌を培養した。

1. コハク酸-グルコース培地での培養

(1) 種菌スラントの調製

Bordetella sp. 10d 株を Table 1-6 に示した 1% (w/v) の肉エキスを含む肉汁スラント (pH 6.8) で 30°C, 1 日培養し、種菌とした。

(2) 前培養

4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸の代わりに炭素源として 1% (w/v) コハク酸二ナトリウム (ナカライテスク, 東京) および 1% (w/v) グルコース (和光純薬, 大阪), 窒素源として 0.04% (w/v) NH_4NO_3 (関東化学, 東京) を含む液体培地 (Table 1-7) に (1) の種菌スラントから 1 白金耳植菌し, 30°C で 12 時間振盪培養を行った。

(3) 本培養

(2) で得られた培養液 25 ml を前培養培地と同じ組成の培地 400 ml (3 L 振盪フラスコ) に接種し, 同フラスコ 2 本を用いて, 30°C で 12 時間振盪培養した。遠心分離 (8,000 $\times g$, 10 分) により菌体を回収し, 0.8% (w/v) NaCl 溶液で 2 回洗浄した後, -20°C で保存した。

(4) 無細胞抽出液の調製

無細胞抽出液の調製は第2節の方法に従った。

Table 1-6. Nutrient medium.

Polypepton	1.0 g
Meat extract	0.5 g
NaCl	0.5 g
Agar	1.5 g
H ₂ O (pH 6.8~7.1)	100 ml

Table 1-7. Glucose-succinate medium for *Bordetella* sp. 10d.

A) Substrate solution (170 ml, pH 6.8)	
D-Glucose	2.0 g
Succinic acid disodium salt	2.0 g
NH ₄ NO ₃	0.08 g
NaCl	0.10 g
Yeast extract	0.04 g
KH ₂ PO ₄	0.45 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.40 g
H ₂ O	170 ml
B) Metal solution (30 ml)	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.10 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.10 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.10 mg
ZnCl ₂	0.10 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.10 mg
H ₂ O	30 ml

2. 基質合成法

代謝酵素系の解析のために使用した基質の合成法を示す。

(1) 2-アミノ-5-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドの合成

4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸と部分精製した 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾ を添加して反応させることで調製した。詳細は活性測定法にて述べる。

(2) 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドの合成

2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドの合成は第2節で述べた方法に従った¹⁹⁾。

(3) 2-ヒドロキシムコン酸の合成

(i) 2-ヒドロキシムコン酸ジエチルの合成

Wiley らの方法にしたがった²¹⁾。100 ml ナス型フラスコに蒸留済みジエチルエーテル 50 ml を入れ、ナトリウムエトキシド 3.4 g とシュウ酸ジエチル 7.3 g を加えて攪拌した。混合液にエチルクロトン酸 5.7 g を添加後、還流冷却器を同ナス型フラスコに接続し、さらに攪拌を続けた。混合液が液体（橙色）から粘性の高いムース状（黄色）となるまで反応を続けた。吸引ろ過器を用いて石油エーテルにて未反応の化合物

をろ液と残渣 (2-ヒドロキシムコン酸ジエチル) に分けた。未反応のナトリウムエトキシドを分解するため、ろ液に 5 ml の蒸留エタノールを加え減圧乾固した。吸引ろ過器を用いて得られた残渣を石油エーテルにて洗浄し。前述の残渣とともに真空デシケーター内で保存した。

(ii) 2-ヒドロキシムコン酸ジエチルのけん化

(i) で調製した 2-ヒドロキシムコン酸ジエチル 0.472 g を乳鉢にて磨砕後、30% (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液を 2 ml 加えて攪拌し、室温で 3 時間インキュベートした。つづいて同溶液を 100 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液 (pH 7.5) にて 295 nm における吸光度が 1.2~1.3 となるように希釈 (3600 倍) することにより基質溶液 (2-ヒドロキシムコン酸溶液) とした。同化合物は緩衝液中で非酵素的にケト・エノール体として平衡化するため要時調製とした。

(4) 4-オキサロクロトン酸の合成

4-オキサロクロトン酸は 2-ヒドロキシムコン酸のケト体である (Fig. 6-1)。 (3) に従い 2-ヒドロキシムコン酸ジエチルをけん化後、100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) にて希釈し。2-ヒドロキシムコン酸溶液とした。同溶液を室温で 30 分間インキュベートし、ケト・エノール複合溶液とした。酵素活性測定直前に 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) にて同複合溶液を 4-オキサロクロトン酸由来の 235 nm における吸光度が 1.2~1.3 となるように希釈し、基質溶液とした。

(5) 2-オキソペント-4-エン酸の合成

Collinsworth らの方法に従い²²⁾、100 ml 三角フラスコに 100 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液 (pH 8.5) 27 ml, DL-アリルグリシン ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 1 ml, カタラーゼ ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 0.3 ml, L-アミノ酸オキシダーゼ ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, 以上シグマアルドリッチジャパン, 東京) 2 ml を加え、25°C で 30 分間インキュベートした。つづいて同溶液を 100 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液 (pH 8.5) にて 265 nm における吸光度が 1.2~1.3 となるように希釈し、基質溶液 (2-オキソペント-4-エン酸溶液) とした。

3. 酵素活性測定法

それぞれの酵素活性測定法について以下に示す。なお、比活性はタンパク質 1 mg あたりの unit 数で決定した。4-オキサロクロトン酸タータメラーゼ活性のみ Beckman DU 650 分光光度計 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) を用い、他の酵素活性については日立 U-1100 形分光光度計 (日立製作所, 東京) を用いて測定し、定量した。

(1) 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ

前々報¹⁶⁾ に従い、Table 1-8 に示した反応液にて 24°C で 10 分間反応を行った。酵素液を添加することにより反応を開始し、酵素活性は基質 (4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸) 由来の 294 nm における吸収の減少を測定し、定量した。100 mM リン酸ナトリウムカリウム緩衝液 (pH 7.5) における 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸のモル吸光係数は 7.53×10^3 であった¹⁶⁾。本酵素 1 unit は、24°C で 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の 4-アミノ-3-ヒドロキシ安

息香酸を 1 μmol の酵素反応生産物に変換する酵素量と定義した。

Table 1-8. Reaction mixture for 4-amino-3-hydroxybenzoate 2,3-dioxygenase assay.

100 mM Sodium-potassium phosphate (pH 7.5)	2.90 ml
5 mM 4-Amino-3-hydroxybenzoic acid	0.10 ml
Enzyme	0.10 ml
Total	3.10 ml

(2) 2-アミノ-5-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デアミナーゼ

同活性測定法の確立は第2章にて述べる¹⁹⁾。Table 1-9 に示した反応液を用い、24°Cで10分間反応を行った。4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸を含む反応液に酵素液を添加後、部分精製した4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾ (0.08 unit) を添加し、酵素反応を開始した。酵素活性は酵素反応生産物由来の 375 nm における吸収の増加を測定し、定量した。100 mM リン酸ナトリウムカリウム緩衝液 (pH 7.5) における酵素反応生産物のモル吸光係数は 4.4×10^4 であった¹⁹⁾。このとき本酵素 1 unit は、24°C において 1 分間に 1 μmol の 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドから 1 μmol の 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドに変換する酵素量と定義した¹⁹⁾。

Table 1-9. Reaction mixture for 2-amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde deaminase assay.

100 mM Sodium-potassium phosphate (pH 7.5)	2.90 ml
5 mM 4-Amino-3-hydroxybenzoic acid	0.10 ml
0.08 U 4-Amino-3-hydroxybenzoate 2,3-dioxygenase	0.10 ml
Enzyme	0.10 ml
Total	3.20 ml

(3) 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ

Table 1-10 に示した反応液を用い、24°Cで10分間反応を行った。酵素液を添加し、反応を開始した。酵素活性は基質 (2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド) 由来の 375 nm における吸収の減少を測定し、定量した。100 mM リン酸ナトリウムカリウム緩衝液 (pH 7.5) における 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドのモル吸光係数は 4.4×10^4 であった¹⁹⁾。本酵素 1 unit は、 NAD^+ 共存下にて 24°Cで1分間に 1 μmol の 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを 1 μmol の酵素反応生産物に変換する酵素量と定義した。

Table 1-10. Reaction mixture for 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde dehydrogenase assay.

100 mM Sodium-potassium phosphate (pH 7.5)	2.80 ml
5 mM NAD ⁺	0.10 ml
0.88 mM 2-Hydroxymuconic 6-semialdehyde	0.10 ml
Enzyme	0.05 ml
Total	3.05 ml

(4) 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド ไฮドロラーゼ

Table 1-10 に示した反応液の組成において、NAD⁺のかわりに 100 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液 (pH 7.5) を等量添加し、24°C で 10 分間反応を行った。酵素液を添加することにより反応を開始した。酵素活性は基質 (2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド) 由来の 375 nm における吸収の減少を測定し、定量した。2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドにおけるモル吸光係数は前述のとおりである。本酵素 1 unit は、24°C で 1 分間に 1 μmol の 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを 1 μmol の酵素反応生産物に変換する酵素量と定義した。

(5) 4-オキサロクロトン酸 タータメラゼ

Table 1-11 に示した反応液を用い、24°C で 10 分間反応を行った。酵素液を添加することにより反応を開始した。酵素活性は基質 (2-ヒドロキシムコン酸) 由来の 295 nm における吸収の減少を測定し、定量した。100 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液 (pH 7.5) における 2-ヒドロキシムコン酸のモル吸光係数は 2.41×10^4 であった²³⁾。本酵素 1 unit は、24°C で 1 分間に 1 μmol の 2-ヒドロキシムコン酸を 1 μmol の酵素反応生産物に変換する酵素量と定義した。

Table 1-11. Reaction mixture for 4-oxalocrotonate tautomerase assay.

0.055 mM 2-Hydroxymuconic acid solution ^{a)}	3.00 ml
Enzyme	0.03 ml
Total	3.03 ml

a) in 100 mM Sodium-potassium phosphate buffer (pH 7.0)

(6) 4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼ

Table 1-12 に示した反応液を用い、24°Cで10分間反応を行った。酵素液を添加することにより反応を開始した。酵素活性は基質(4-オキサロクロトン酸)由来の235 nmにおける吸収の減少を測定し、定量した。100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) における4-オキサロクロトン酸のモル吸光係数は 6.58×10^3 であった²³⁾。本酵素1 unit は、 Mg^{2+} 共存下にて24°Cで1分間に1 μmol の4-オキサロクロトン酸を1 μmol の酵素反応生産物に変換する酵素量と定義した。

Table 1-12. Reaction mixture for 4-oxalocrotonate decarboxylase assay.

0.19 mM 4-Oxalocrotonic acid solution ^{a)}	2.70 ml
3 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.30 ml
Enzyme	0.01 ml
Total	3.01 ml

a) in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)

(7) 2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼ

Table 1-13 に示した反応液を用い、24°Cで10分間反応を行った。酵素液を添加することにより反応を開始した。酵素活性は基質(2-オキソペント-4-エン酸)由来の265 nmにおける吸収の減少を測定し、定量した。100 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液 (pH 8.5) における2-オキソペント-4-エン酸のモル吸光係数は 1.0×10^4 であった²²⁾。本酵素1 unit は、 Mg^{2+} 共存下にて24°Cで1分間に1 μmol の2-オキソペント-4-エン酸を1 μmol の酵素反応生産物に変換する酵素量と定義した。

Table 1-13. Reaction mixture for 2-oxopent-4-enoate hydratase assay.

0.14 mM 2-Oxopent-4-enoic acid solution ^{a)}	2.70 ml
3 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.30 ml
Enzyme	0.01 ml
Total	3.01 ml

a) in 100 mM Sodium-potassium phosphate buffer (pH 8.5)

3. タンパク質の定量

タンパク質はLowry法²⁴⁾により定量した。標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いた。

<結果>

Table 1-14. Analysis of 4-amino-3-hydroxybenzoate-metabolizing enzymes from *Bordetella* sp. 10d.

Enzyme (Specific activity (U·mg ⁻¹))	Growth substrate	
	4-Amino-3-hydroxy- benzoic acid	Sodium succinate
1: 4-Amino-3-hydroxy- benzoate 2,3-dioxygenase	0.083	0
2: 2-Amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde deaminase	0.005	0
3: 2-Hydroxymuconic 6-semialdehyde dehydrogenase	0.011	0.007
4: 2-Hydroxymuconic 6-semialdehyde hydrolase	0	0
5: 4-Oxalocrotonate tautomerase	0.580	0.053
6: 4-Oxalocrotonate decarboxylase	0.081	0
7: 2-Oxopent-4-enoate hydratase	0.103	0.063

4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸およびコハク酸-グルコース培地で培養して得た菌体からそれぞれ無細胞抽出液を調製し、推定した基質に対する酵素活性を調べた (Table 1-14)。4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地で培養して得た菌体の無細胞抽出液は 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸を含む 6 種類の基質に対して顕著な活性を示した。 (Table 1-14)。しかし、同酵素液は NAD⁺無添加では 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドに対して全く活性を示さなかった。コハク酸-グルコース培地で培養して得た菌体から調製した無細胞抽出液は、4-オキサロクロトン酸および 2-オキソペント-4-エン酸にたいしてわずかに活性を示したものの他の基質に対して全く活性を示さなかった。

第4節 要約と考察

4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地にて *Bordetella* sp. 10d 株を培養し、得られた菌体より無細胞抽出液を調製後、4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸との酵素反応を行なった。酵素反応時における吸収スペクトルの変化を調べたところ、基質の減少とともに新たな極大吸収の出現とその消失が観察された。本菌の4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝系において、まず同基質がベンゼン環開裂酵素 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼによりベンゼン環の開裂を受け、2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドとなることを述べた¹⁶⁾。よって、吸収スペクトルの変化から本菌の無細胞抽出液中には、2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドをさらに代謝する酵素系が含まれると予想された。そこで、既報の芳香族化合物代謝経路より推定される代謝中間体を基質として酵素反応を行い、代謝に関与する酵素系を解析し、4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ以外に、6種類の酵素を見出すことが出来た。

本菌の粗酵素と4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸との酵素反応を行い、酵素反応時における吸収スペクトルの変化を調べたところ、基質の減少とともに375 nmに極大吸収を示す化合物の蓄積が見られた (Fig. 1-(A))。極大吸収波長およびその形状から蓄積した酵素反応生産物は分光光学的に2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドであると予想した²⁰⁾。そこで、酵素法により調製した2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを基質とした酵素反応を行なった。無細胞抽出液のみを添加した反応系では基質由来の375 nmにおける減少は見られなかった。そこで、反応系にNAD⁺を添加したところ375 nmにおける吸収の減少が見られた (Fig. 1-2)。このことから本菌の無細胞抽出液中にはNAD⁺依存型の2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド代謝酵素のみが存在することが示唆された。

4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地で培養して得た菌体とコハク酸-グルコース培地で培養して得た菌体からそれぞれ無細胞抽出液を調製し、既報の芳香族化合物の代謝系より推定される代謝中間体に対する活性を調べた。4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地で培養して得た菌体の無細胞抽出液は、ベンゼン環開裂酵素活性のほかに次章で述べるデアミナーゼ¹⁹⁾ および既報のカテコールのメタ開裂経路で働く5種類の酵素系の活性を見出した。一方、コハク酸-グルコース培地で培養して得た菌体の無細胞抽出液も数種の酵素活性を示したが、その活性は低かった。よって、見出した4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝に関与する酵素系は誘導的に生合成されると結論した。

第2章 *Bordetella* sp. 10d の生産する 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド デアミナーゼの精製および特性解析

第1節 序

第2章では4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾の次段階で作用する2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド分解酵素(2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド デアミナーゼ)を精製し,本酵素の特性および反応機構を明らかにすることを目的とする.2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドは非常に不安定で,非酵素的に環状化して2,5-ピリジンジカルボン酸が生成する¹⁶⁾(Fig. 0-1).最初に酵素活性測定法の確立と酵素活性の定義を行う.次に本酵素の精製を行い,得られた精製酵素を用いて酵素化学的諸性質を明らかにする.さらに,酵素反応生成物の同定による反応機構の解析および反応の化学量論について検討し,本酵素の命名を行う.また,既報の芳香族化合物代謝関連酵素における他の脱アミノ酵素との比較を行う.

第2節 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド分解酵素の酵素活性測定法の確立

<方法>

1. 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地での培養
本菌の培養方法は第1章第2節の方法に従った.
2. 無細胞抽出液および硫安分画粗酵素液の調製
調製法は第1章第2節の方法に従った.
3. 活性測定法

反応液組成を Table 2-1 に示した.4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸と部分精製した4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾を反応させ,酵素法にて調製した2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドを活性測定に用いた.酵素反応は4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸を含む反応液中に硫安分画した粗酵素液を添加後,4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾(0.08 unit)を加えて反応を開始した.24°Cで10分間反応を行い,200~450 nmにおける吸収スペクトルの変化を Beckman DU650 分光光度計を用いて2分おきに測定した¹⁹⁾.

Table 2-1. Reaction mixture for enzyme assay.

100 mM Sodium-potassium phosphate buffer (pH 7.5)	2.90 ml
5 mM 4-Amino-3-hydroxybenzoic acid	0.10 ml
4-Amino-3-hydroxybenzoate 2,3-dioxygenase (0.8 U·ml ⁻¹)	0.10 ml
Enzyme	0.10 ml
Total	3.20 ml

<結果>

まず、4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸と部分精製した 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾により 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドを反応溶液中に過剰に蓄積させる条件を検討した (Fig. 2-1). 方法で述べたように、反応系あたり 0.08 U の 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾を添加した場合、反応 20 分で 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸が完全に消費されたことから、つづく 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド分解酵素活性は 10 分間測定できると判断した. また、反応時における吸収スペクトルの変化を観察すると Fig. 1-1(A)と同様の変化が見られ、2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドは 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドに変換されたと予想した. そこで、酵素活性の指標として 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドの生成量を 375 nm の吸光度の増加により定量することにした. モル吸光係数は 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド (pH 7.5) の 4.4×10^4 を用いた¹⁹⁾. このとき本酵素 1 unit は、24°C において 1 分間に 1 μmol の 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドから 1 μmol の 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドに変換する酵素量と定義した¹⁹⁾. 比活性は、タンパク質 1 mg あたりの unit 数で決定した.

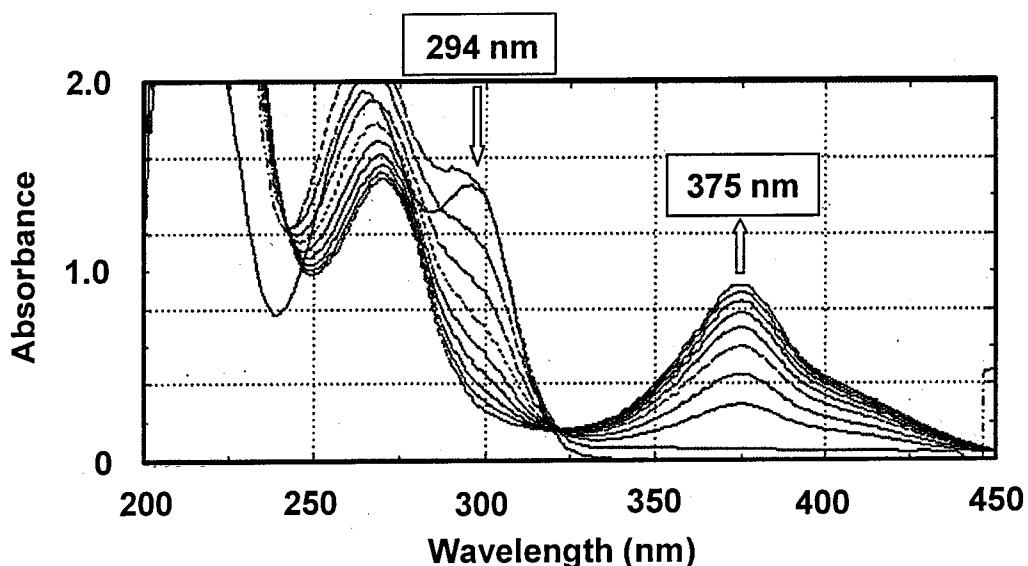


Fig. 2-1. Absorption spectra of the reaction products from 4-amino-3-hydroxybenzoic acid in an assay with crude extract.

The reaction mixture consisted of 2.9 ml of 100 mM sodium-potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.1 ml of 5 mM 4-amino-3-hydroxy benzoic acid, and 0.05 ml of the crude extract (35-75% ammonia sulfate saturation) ($61 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). The reaction was started by adding the enzyme solution. After incubation at 24°C the sample was scanned with a spectrophotometer and spectra were recorded every 2 min.

第3節 酵素の精製

<方法>

1. 酵素の精製

酵素精製におけるすべての操作は 4℃以下で行った。遠心分離は全て、 $20,000 \times g$, 10 分間の条件で行った。

(1) 無細胞抽出液の調製

培養液 4.8 L から 10d 株の菌体を 14.8 g 得た (湿菌体)。湿菌体 1 g あたり 10 ml の 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, 以下 buffer A) を加えて懸濁し, KUBOTA model 201 M Isonator (クボタ商事, 東京) を用いて懸濁液 (150 ml) を 20 ml ずつ出力 180 W で 5 分間超音波処理した。遠心分離し, 上清を無細胞抽出液とした。(Fraction 1, 150 ml)

(2) 除核酸操作

無細胞抽出液に, 20% (w/v) 硫酸ストレプトマイシン溶液を終濃度が 1% (w/v) となるように攪拌しながら添加した。30 分間攪拌した後, 遠心分離により沈殿した核酸を除き, 上清を得た。(Fraction 2, 149 ml)

(3) 硫酸分画

Fraction 2 に, 摩砕硫酸を 38%飽和になるように攪拌しながら加えた。30 分間攪拌後, 遠心分離により沈殿を除去した。得られた上清に硫酸を 60%飽和となるように加え, 30 分間攪拌後, 遠心分離により沈殿を回収した。沈殿を buffer A 30 ml に溶解した後, この溶液を 1 mM DTT, 0.5 mM アスコルビン酸ナトリウムを含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, 以後 buffer B) 1 L に対して透析した。3 時間おきに 1 度透析外液を交換し, 一晚透析した。(Fraction 3, 46.0 ml)

(4) DE52 カラムクロマトグラフィー

Fraction 3 を buffer B で平衡化した DE52 (Whatman International Ltd., Maidstone, England) を充填したカラム (2.1×19.0 cm) にアプライした。190 ml の buffer B でカラムを洗浄した後, 0~0.4 M NaCl を含む 980 ml の buffer B を用いてリニアグラジエント法により, 流速 $40 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ で酵素を溶出した。各フラクション (5.0 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した。高活性画分を集め buffer B 1 L に対して一晚透析を行った。(Fraction 4, 30.0 ml)

(5) DEAE-Cellulofine カラムクロマトグラフィー

Fraction 4 を (4) と同じ緩衝液を用いて平衡化した DEAE-Cellulofine A-800 (生化学工業, 東京) を充填したカラム (1.7×22.0 cm) にアプライした。150 ml の buffer B でカラムを洗浄した後, 0~0.35 M NaCl を含む 750 ml の buffer B を用いてリニアグラジエント法により, 流速 $30 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ で酵素を溶出した。各フラクション (5.0 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した。(Fraction 5, 20.0 ml)

(6) Phenyl-Cellulofine カラムクロマトグラフィー

Fraction 5 に 12.5%となるように硫酸アンモニウムを加えて 15 分攪拌し, 12.5%飽

和となるように硫酸アンモニウムを加えた bufferB 270 ml で平衡化した Phenyl-Cellulofine (生化学工業, 東京) を充填したカラム (1.6×13.7 cm) にアプライした. 120 ml の 12.5%飽和 buffer Bでカラムを洗浄した後, 0.5~0 M 硫酸アンモニウムを含む 400 ml の buffer Bを用いてリニアグラジエント法により, 流速 30 ml·h⁻¹で酵素を溶出した. 各フラクション (4.0 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した. (Fraction 6, 24.5 ml) また, 最終精製後のフラクションを 1 mM DTT, 0.5 mM アスコルビン酸ナトリウムを含む 50 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液 1 L を用いて 6 時間おきに 1 度透析外液を交換し, 一晚透析した.

2. タンパク質の定量

タンパク質は Lowry 法により定量した²⁴⁾. 標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた.

3. 電気泳動

<方法>

(1) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Davis らの方法²⁵⁾により, 12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲル (pH 8.0), Tris-glycine (pH 8.3) を用いて, 2 mA/tube の条件で 2.5 時間泳動した. タンパク質の染色は 0.25% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250/エタノール-酢酸-水 (9:2:9) 溶液で 1 時間行い, エタノール-酢酸-水 (25:8:65) 溶液で 3 時間浸漬して脱色した後, エタノール-酢酸-水 (10:15:175) 溶液中に保存した.

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Weber と Osborn の方法²⁶⁾により, 12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルおよび 0.1% (w/v) SDS-0.1 M リン酸ナトリウム (pH 7.2) の泳動緩衝液を用いて, 6 mA/tube の条件で 3 時間泳動した. 染色および脱色は, 前述の方法によった.

<結果>

1. 酵素の精製

各精製段階における酵素活性およびタンパク質量を Table 2-2 に示す。硫酸分画について DE52 カラムクロマトグラフィー (Fig. 2-2), DEAE-Cellulofine A-800 カラムクロマトグラフィー (Fig. 2-3), Phenyl-Cellulofine カラムクロマトグラフィー (Fig. 2-4) に供し, 本酵素を単一に精製することが出来た (Fig. 2-5 (A), (B)). 最終精製酵素は 2.0%の収率で 103 倍に精製され, 比活性は $0.27 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ であつた (Table 2-2). また, 最終精製酵素をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ 1 本のバンドが見られた (Fig. 2-5 (A)). また, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では, 分子量 15,000 に 1 本のバンドがみられた (Fig. 2-5 (B)).

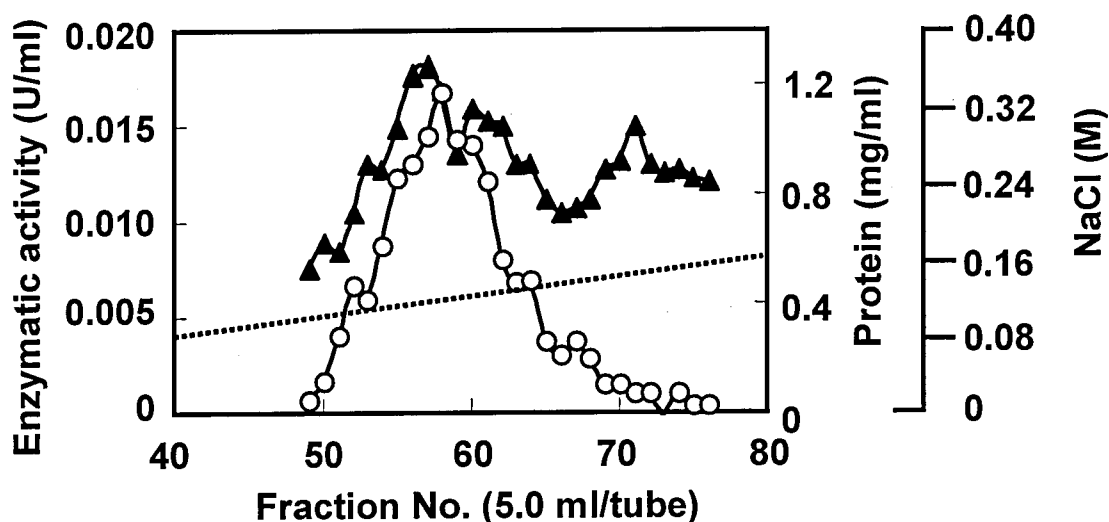


Fig. 2-2. Column chromatography of the enzyme on DE52 cellulose.

The enzyme solution (Fraction 3, 46 ml) was applied to a column (2.1×19.0 cm) of DE52 equilibrated with buffer B. The column was washed with buffer B and then proteins were eluted with a liner gradient (0 to 0.4 M) NaCl in 980 ml of buffer B. Fraction of 5.0 ml was collected at a flow rate of $40 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$. The protein concentration and enzymatic activities were assayed. Symbols: \circ , enzymatic activity; \blacktriangle , protein; and ----, NaCl.

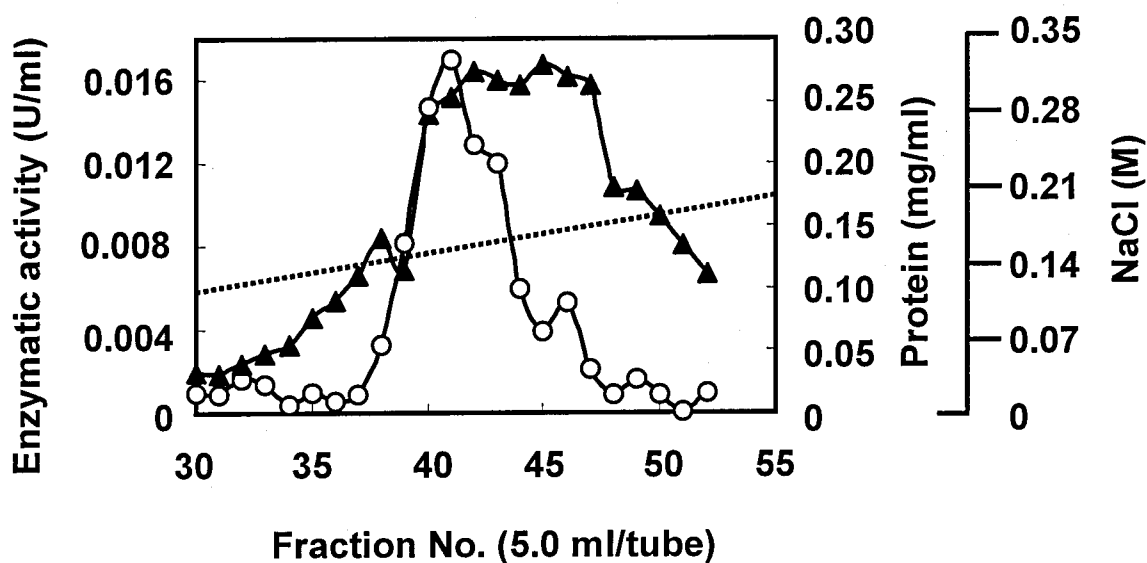


Fig. 2-3. Column chromatography of the enzyme on DEAE-Cellulofine A-800.

The enzyme solution (Fraction 4, 30 ml) was applied to a column (1.7×22 cm) of DEAE-Cellulofine A-800 equilibrated with buffer B. The column was washed with buffer B and then enzyme was eluted with a liner gradient (0 to 0.35 M) NaCl in 750 ml of buffer B. Fraction of 5.0 ml was collected at a flow rate of 30 ml·h⁻¹. The protein concentration and enzymatic activities were assayed. Symbols: ○, enzymatic activity; ▲, protein; and ----, NaCl

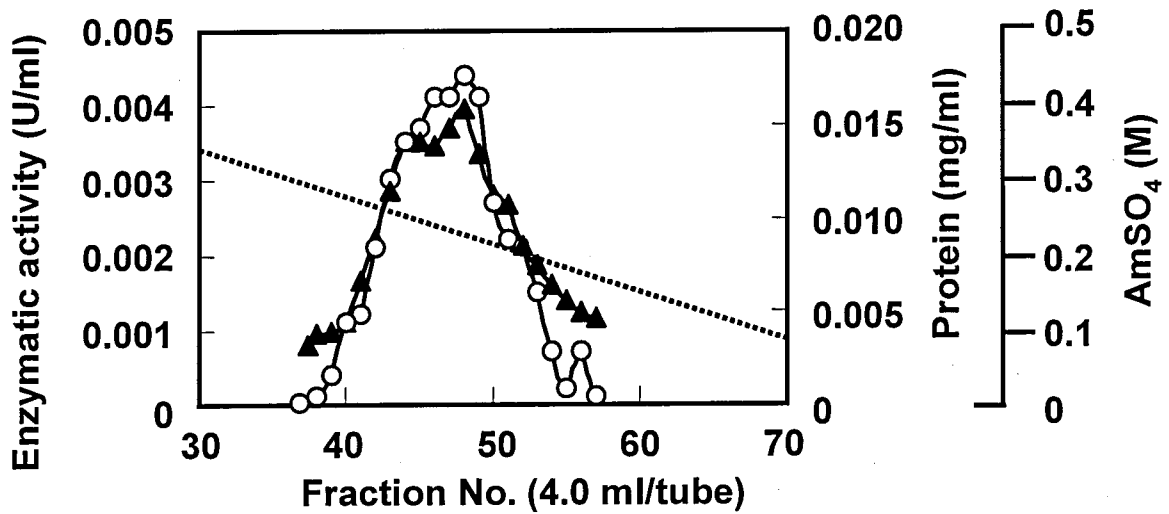


Fig. 2-4. Column chromatography of the enzyme on Phenyl-Cellulofine.

The enzyme solution (Fraction 5, 20 ml) was applied to a column (1.6×13.7 cm) of Phenyl-Cellulofine equilibrated with buffer B. The column was washed with buffer B and then enzyme was eluted with a linear gradient (0.5 to 0 M) (NH₄)₂SO₄ in 400 ml of buffer B. Fraction of 3.5 ml was collected at a flow rate of 30 ml·h⁻¹. The protein concentration and enzymatic activities were assayed. Symbols: ○, enzymatic activity; ▲, protein; and ----, (NH₄)₂SO₄.

Table 2-2. Summary of purification.

Fraction	Volume (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U·mg ⁻¹)	Recovery (%)
1: Cell extract	150	4.2	1,600	2.6×10 ⁻³	100
2: Streptomycin sulfate	149	4.1	1,100	3.7×10 ⁻³	98
3: Ammonium sulfate	46	2.8	290	9.7×10 ⁻³	67
4: DE52-Cellulose	30	0.50	16	0.031	12
5: DEAE-Cellulofine A-800	20	0.25	5.0	0.050	6.0
6: Phenyl-Cellulofine	25	0.08	0.3	0.270	2.0

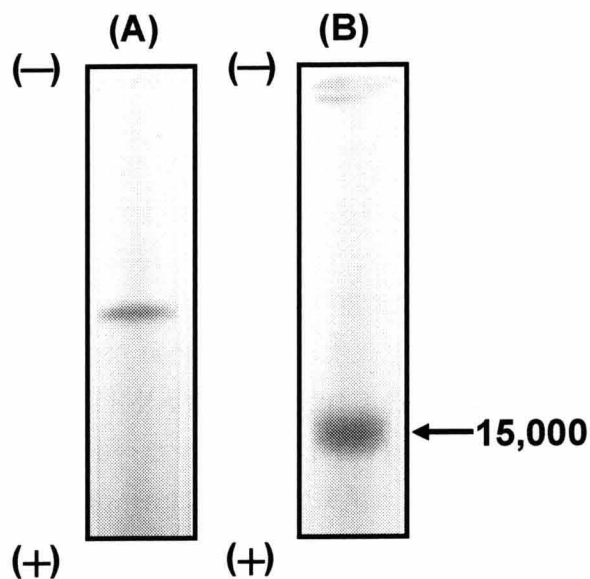


Fig. 2-5. PAGE(A) and SDS-PAGE(B) of the enzyme.

(A) PAGE, the purified enzyme ($10 \mu\text{g}$) was electrophoresed on a 12.5% (w/v) polyacrylamide disc gel (pH 8.0) at 2.0 mA/tube for 2h in a running buffer of Tris-glycine (pH 8.3). (B) SDS-PAGE, the purified enzyme ($10 \mu\text{g}$) denatured with SDS was electrophoresed on a 12.5% (w/v) gel containing 0.1% (w/v) SDS at 6 mA/tube for 3.5 h in a running buffer (pH 7.2) of 0.1% (w/v) SDS-0.1 M sodium phosphate. The gels were stained with 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in a solvent of ethanol-acetic acid- H_2O (9:2:9, v/v/v/).

第4節 精製酵素の特性解析

1. 物理化学的性質

<方法>

(1) ゲル濾過法による分子量の測定

本酵素 1 ml ($1.9 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) およびマーカー (各 5 mg) を用いて Cellulofine GCL-1000sf (3.2×58 cm, 生化学工業, 東京) 上で行った. マーカーとして, チトクローム *c* (分子量, 12,500), オブアルブミン (43,000), ウシ血清アルブミン (67,000), アルドラーゼ (160,000), カタラーゼ (240,000) を使用した.

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量の測定

第2節の方法によった. 用いたマーカーは, Low Molecular Weight [LMW] Calibration Kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) を使用した. すなわち, α -ラクトアルブミン (分子量, 14,400), 大豆トリプシンインヒビター (20,100), カルボニックアンヒドラーゼ (30,000), オブアルブミン (43,000), ウシ血清アルブミン (67,000), フォスホリラーゼ *b* (94,000) である.

2. N末端アミノ酸配列の分析

本精製酵素を, プロティアンミニII (Bio-Rad, Richmond) を用いたスラブゲル-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した. 電気泳動後, BIO-RAD ミニトランスブロット (Bio-Rad) を用いて, スラブゲルから本酵素をイモビロン-P (PVDF) 膜 (ミリポア, 米沢) に転移した. PVDF 膜を, 0.1 % (w/v) Coomassie brilliant blue R-250 を含む 50% (v/v) メタノール溶液で染色した後, メタノール-酢酸-水 (5:1:4) から成る溶液で脱色した. PVDF 膜上で染色した酵素を膜ごと切り出し, N末端配列の分析に用いた²⁷⁾. N末端アミノ酸配列は, 島津プロテインシークエンサー-PPSQ-10 (島津製作所, 京都) を用い, 自動エドマン分解の各サイクルで生成した PTH-アミノ酸を HPLC で同定することにより分析した.

3. 酵素に結合した補酵素の吸光光度分析および蛍光光度分析

(1) 吸光光度分析

50 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液 (pH 7.0) にて 5 時間おきに 3 回透析した最終精製酵素液 1 ml (protein, 1.1 mg) を用いて 200~800 nm における吸光度を Beckman DU650 分光光度計 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) により測定した.

(2) 蛍光光度分析

酵素に結合した補欠分子族の分離は既報の方法に従った²⁸⁾. 精製酵素液 1 ml (protein, 1.2 mg) を反応用の短管 (17.5×130 mm) に移して密閉し, 遮光条件下で 95°C, 5 分間加熱した. 水の蒸発によるサンプルの体積変化を防ぐため, 加熱処理直後に氷中で冷却した. その後, 遠心分離 (20,000×*g*, 10 分, 4°C) してタンパクを取り除き, 上清をサンプルとして用いた. 蛍光光度分析には, F-2500 日立分光蛍光光度計 (日立製作所, 東京) を用いた. 蛍光スペクトルは, 文献²⁹⁾ を参考に励起波長を 530 nm に固定し, 350~

500 nm における蛍光側の波長をスキャンした。また励起スペクトルは、蛍光波長を 450 nm に固定し、500~600 nm の励起波長に対する蛍光強度を測定した。このとき、分析にはコントロールとしてオーセンティックの FAD および FMN も同様に熱処理を行い、蛍光分析に供した。

(3) HPLC 分析による補酵素の同定

(2) のサンプルを HPLC 分析に供し補欠分子族の同定を行った。装置および条件を以下に示す。溶出における溶離液の組成は Solvent A : 10 mM K_2HPO_4 -メタノール (80:20) と Solvent B : 10 mM K_2HPO_4 -メタノール (50:50) を用い、グラジエント法にて溶出した²⁸⁾。オーセンティックの FAD および FMN をコントロールとし、リテンションタイムの比較を行った。

[装置]

- ・ポンプ : L-6200 Intelligent Pump (日立製作所)
- ・検出器 : L-1050 Fluorescence spectrophotometer (日立製作所)
- ・記録計 : D-2500 Chromato-Integrator (日立製作所)
- ・カラム : Inertsil ODS-2 (4.6×150 mm, 5 μ m, GLサイエンス, 東京)

[条件]

- ・溶離液 : Solvent A : 10 mM K_2HPO_4 -メタノール (80:20)
Solvent B : 10 mM K_2HPO_4 -メタノール (50:50)
- ・溶出 : Solvent A-Solvent B (100:0) \rightarrow (20 min) \rightarrow Solvent A-Solvent B (50:50)
- ・流速 : 0.5 ml/min
- ・検出 : 蛍光 EX 450 nm, EM 530 nm

4. pH および温度安定性

<方法>

(1) pH 安定性

1 mM DTT, 0.5 mM アスコルビン酸ナトリウムを添加した pH 5.0~11.0 の各緩衝液を調製し、酵素液をそれぞれの緩衝液に対して 24 時間透析した後、残存する酵素活性を測定した。50 mM 酢酸-酢酸ナトリウム (pH 3.0~5.5), 50 mM リン酸カリウム-ナトリウム (pH 5.0~8.0), 20 mM Tris-HCl (pH 7.0~9.5) および 50 mM Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ (pH 9.0~11.0) の各緩衝液を用いて行った。

(2) 温度安定性

本酵素を 20°C~80°C の各温度で 10 分間加熱処理した後、第 2 節に示した反応溶液 (Table 2-1) を用いて残存する活性を測定した。

5. 触媒化学的性質

<方法>

(1) 各種試薬の影響

本酵素に与える金属イオン, -SH 基修飾試薬, キレート試薬等の影響を調べた。酵素液に, 各種試薬の終濃度が 1 mM になるように各種化合物を添加した。氷中で 10 分間放置した後, 残存活性を測定した。第 2 節で述べたように酵素活性測定は 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ共存下で行う¹⁹⁾。よって 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼに対する各種試薬の影響も同時に調べた。

(2) 基質特異性

各種の化合物を基質とする酵素反応液を調製し, 反応の進行に伴う吸収スペクトル (200 nm~600 nm) の変化を追跡することにより, 活性を示す基質があるかどうかを調べた。試験した化合物は, 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドの類縁化合物である 2-アミノムコン酸 6-セミアルデヒドおよび 2-アミノムコン酸である。これらの類縁化合物は酵素法により 2-アミノフェノールより調製した^{11, 14)}。

<結果>

1. 分子量

(1) ゲル濾過法による分子量の測定

ゲル濾過法による本酵素の分子量は 34,000 であった (Fig. 2-6).

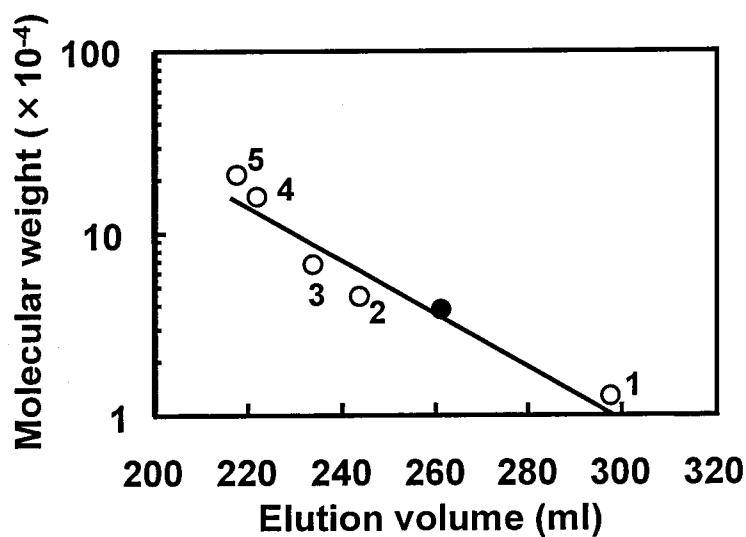


Fig.2-6. Determination of the molecular weight of 2-Amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde deaminase by gel filtration.

The enzyme (0.5 unit) and markers (5 μ g each) were placed on the top of a column (3.2 \times 58 cm) of Cellulofine GCL-1000sf, and then eluted with buffer B containing 0.2 M NaCl. Symbols:○, 1, cytochrom *c* (molecular weight, 12,500); 2, ovalbumin (43,000); 3, bovine serum albumin (67,000); 4, aldolase (158,000); 5, catalase (240,000) and ●, purified enzyme.

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量の測定

SDS 電気泳動では本酵素のサブユニットにおける分子量は 15,000 であった (Fig. 2-7).

(1) の結果より本酵素は、分子量 15,000 のサブユニットからなる 2 量体であると結論した。

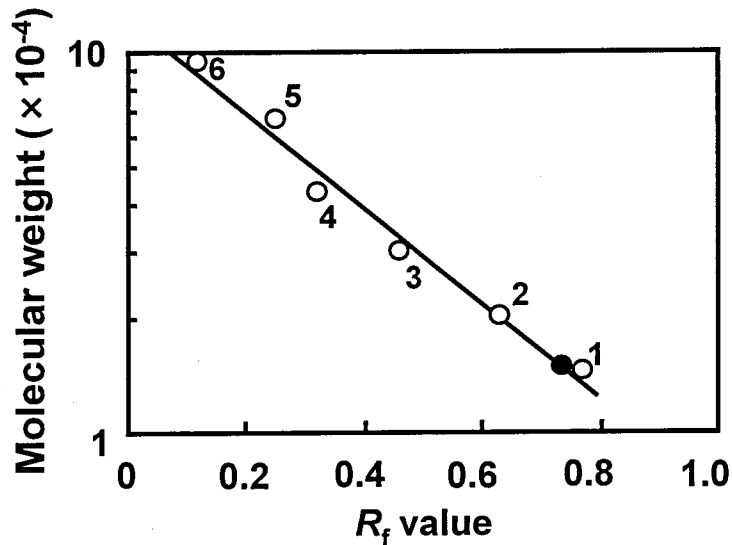


Fig. 2-7. Determination of the molecular weight of 2-Amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde deaminase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The enzyme (10 μ g) denatured with SDS was run on 12.5% gels containing 0.1% SDS at 6 mA/tube for 3.0 h in a running buffer (pH 7.2) of 0.1% SDS-0.1 M sodium phosphate; \circ , Electrophoresis calibration kit LMW was used as markers; 1, α -lactoalbumin (molecular weight, 14,400); 2, soybean trypsin inhibitor (20,100); 3, carbonic anhydrase (30,000); 4, ovalbumin (43,000); 5, bovin serum albumin (67,000); 6, phosphorylase *b* (94,000) and \bullet , purified enzyme.

2. N 末端アミノ酸配列

Fig. 2-8 に本酵素のサブユニットの N 末端アミノ酸配列を示した。

Fig. 2-8. NH_2 -terminal amino acid sequencing of subunit.

No. 1	10	20
PKILVHSDAAPT TGFTNXHTP		

3. 吸光光度分析および蛍光光度分析

(1) 吸光光度分析

濃縮した最終精製酵素は黄色であった。UV-VIS スペクトル分析において本酵素は 266 nm に極大吸収を示し、350～550 nm の可視領域においても吸収が見られた (Fig. 2-9, main figure). 266 nm および 280 nm における本酵素の分子吸光度 $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ はそれぞれ 25 および 21 であり、 $E_{280\text{ nm}}^{1\%}/E_{266\text{ nm}}^{1\%}$ は 1.2 であった。また、可視領域にも吸収が見られた。

(2) 蛍光光度分析

本酵素に結合した補欠分子は熱処理により、酵素タンパクから分離することができた。得られた抽出液をスペクトル分析した。蛍光スペクトルにおいて、本酵素由来の抽出液は 367 nm および 449 nm に極大吸収がみられた (Fig. 2-9 (A)). オーセンティックの FAD および FMN を同様に分析したところ、ともに 372 nm および 449 nm に極大吸収が見られた。また、励起スペクトルにおいて本酵素由来の抽出液は 514 nm に極大吸収を示した (Fig. 2-9 (B)). オーセンティックの FAD および FMN は 527 nm に極大吸収を示した。

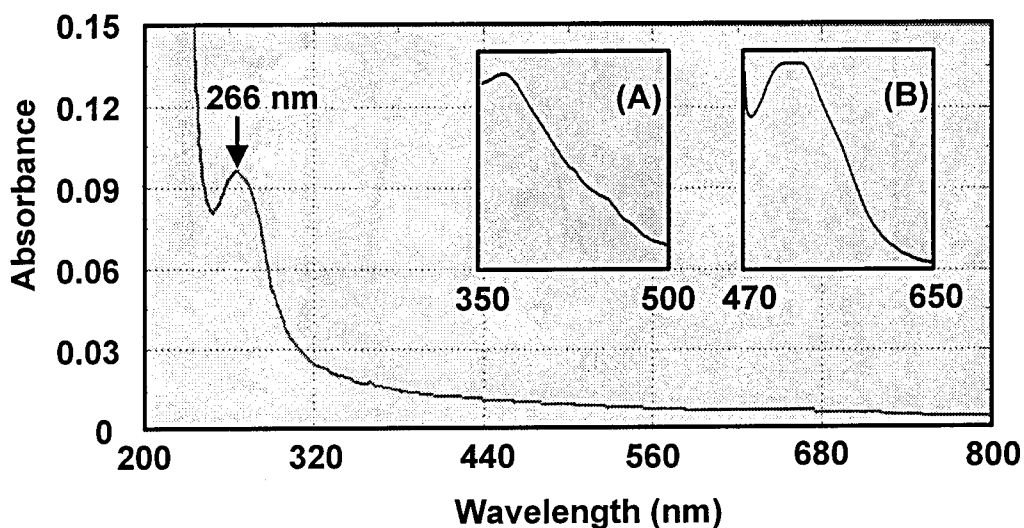


Fig. 2-9. UV-visible and fluorescence spectra of 2-Amino-5-carboxymuonic 6-semialdehyde deaminase.

The main figure shows the UV-visible absorption spectrum of the purified enzyme ($1.1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) recorded using 50 mM sodium-potassium phosphate buffer (pH 7.0). The insets show (A) the fluorescence excitation spectrum (detected at 530 nm) and (B) the emission spectrum (excited at 450 nm) of the supernatant of the heat-treated enzyme ($1.2\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). The cofactor derived from the purified enzyme was released by the heat treatment as described previously²⁸⁾.

(3) HPLC分析による補酵素の同定

酵素熱処理後の上清をHPLC分析したところ、リテンションタイム5.9分にメインピークが見られた。オーセンティックのFADおよびFMNはそれぞれ16.4分および18.0分にピークを示し、本酵素由来の補酵素との相違が見られた。

4. pHおよび温度安定性

(1) pH安定性

本酵素は、50 mM リン酸カリウム-ナトリウム緩衝液 (pH 5.5~7.5) で80%以上の残存活性を示した。また、このpH範囲内で検討した緩衝液においては同緩衝液が最も安定であった (Fig. 2-10)。

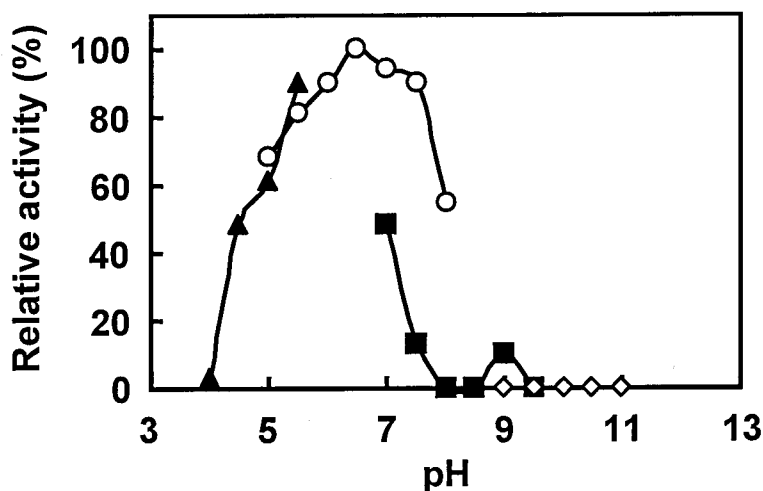


Fig. 2-10. Effect of pHs on the stability of 2-Amino-5-carboxymuonic 6-semialdehyde deaminase.

The enzyme was incubated in 50 or 20 mM buffers of various pHs at 4°C for 24 h, and then the remaining activity was assayed. The buffers used: ▲, acetate; ○, sodium-potassium phosphate; ■, Tris-HCl; and ◇, Na₂CO₃-NaHCO₃. These buffers contained, 1 mM DTT, and 0.5 mM L-ascorbate.

(2) 温度安定性

本酵素は、熱に安定で70℃まで80%以上の活性を維持した。しかしそれ以上の温度では不安定となり、80℃で16%まで失活した (Fig. 2-11)。

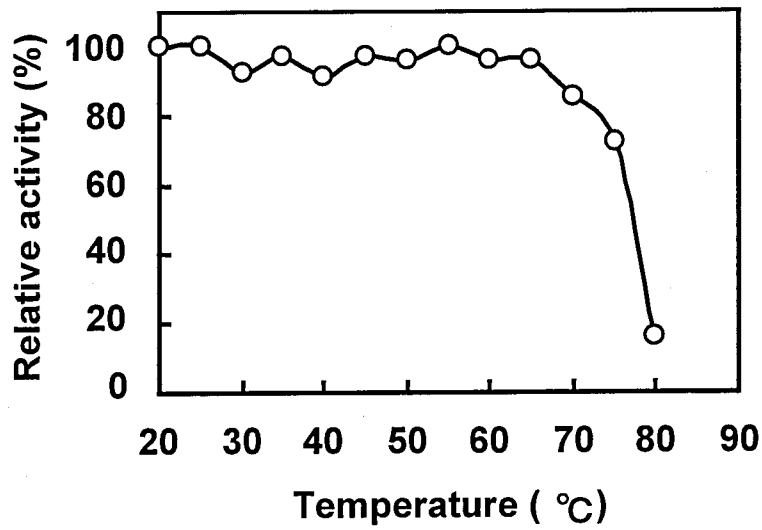


Fig. 2-11. Thermostability of 2-Amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde deaminase. The enzyme was incubated at various temperatures for 10 min, and then the remaining activity was assayed.

5. 触媒化学的性質

(1) 各種試薬の影響

本酵素の活性に与える各種試薬の影響について検討し、得られた結果を Table 2-3 に示す。4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾ に対する結果と比較することで本酵素独自の特徴を見出した。その結果、本酵素において金属イオンでは 1 mM の Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} 等の 2 価, 3 価の金属イオンにより活性が強く阻害された。-SH 基修飾試薬およびキレート剤は 2,3-ジオキシゲナーゼ活性を強く阻害するため基質の合成を阻害することになり¹⁶⁾, 本酵素の活性に与える影響について調べることができなかった。

Table 2-3. Effects of various compounds on 2-Amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde deaminase activity for 2-amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde.

Compound	Concentration (mM)	Remaining Activity (%)	Remaining activity (%) (4A3HBa 2,3-D ^{a)})
None	1.0	100	100
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	0	100
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	29	98
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	1.0	93	40
AgNO_3	1.0	7	3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	100	97
HgCl_2	1.0	7	3
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.0	21	0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 5\text{H}_2\text{O}$	1.0	0	100
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	0	100
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	0	99
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	7	53

a) 4-Amino-3-hydroxybenzoate 2,3-dioxygenase¹⁶⁾

(2) 基質特異性

本酵素は 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド以外の基質には全く活性を示さなかった。

第5節 酵素反応機構の解析と2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド デアミナーゼの命名

<方法>

1. 酵素反応時におけるUV-VIS スペクトルの変化

100 mM リン酸カリウム-ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 2.9 ml, 5 mM の4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸溶液 0.1 ml を加えた反応溶液に精製酵素 ($71 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 0.1 ml をあらかじめ添加した. 反応は精製した 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾ ($6.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 0.1 ml を添加することで開始した. 2 分ごとに吸収スペクトルの変化を測定した.

2. 酵素反応生産物の分離と同定

(1) 酵素反応および酵素反応生産物の定量

50 mM リン酸カリウム-ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 107 ml に 5 mM 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸溶液 9.0 ml, 精製酵素 ($1.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 6.0 ml をあらかじめ添加した. 精製した 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾ ($8.8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 5.1 ml を添加することで酵素反応を開始し, 24 °C で 2.7 時間, 100 rpm で振とうを続けた. 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドの蓄積量はモル吸光係数 4.4×10^3 により定量した¹⁹⁾.

(2) 酵素反応生産物の誘導体化

酵素反応終了後, 反応液をエバポレーターで 10 ml まで濃縮し, 5.0 M メタリン酸を用いて pH 3.0 に調整した. その後, 酢酸エチルで 3 回抽出を行い, 有機溶媒層を得た. 有機溶媒層は無水硫酸ナトリウムを用いて脱水処理を行った後, エバポレーターで 10 ml まで濃縮した. 蓄積した酵素反応生産物 (2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド) と等モルのペンタフルオロフェニルヒドラジン (Pfaltz & Bauer, Waterbury, CT, USA) をメタノール 1.0 ml に溶解し, 同濃縮液に添加後, 24°C で 30 分間放置することでアルデヒド基をヒドラゾン化した. 減圧乾固後, デシケーター内で 1 晩乾燥した. ヒドラゾン化したサンプルに *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetoamide-アセトニトリル混合液 (v/v, 1:0.2) 300 μl を加えて 85°C, 1.5 時間反応させ, 水酸基およびカルボキシル基をトリメチルシリル化した. ヒドラゾンおよびトリメチルシリル化した化合物を GC-MS 分析に供した.

(3) GC-MS 分析

トリメチルシリルおよびヒドラゾン誘導体化した化合物は日立 G-3000 ガスクロマトグラフを連結した日立 M-2500 二重収束質量分析計（日立製作所，東京）で行った。条件を以下に示す。

[条件]

- ・カラム：TC-1 fused silica capillary column (0.25 mm×30 m, GLサイエンス，東京)；
100°C (1 min) → (10°C/min) →300°C
- ・キャリアガス：He, liner velocity 2.5 cm/min
- ・INJ/DET：250°C/280°C
- ・検出：MS (EI 法, ionization, 70eV)

(4) アンモニアの定量

酵素反応液中のアンモニウムイオンの定量は，グルタミン酸デヒドロゲナーゼを用いた酵素法にておこなった³⁰⁾。Table 2-4 に示した反応液を用いて酵素反応を行い，グルタミン酸デヒドロゲナーゼ存在下で NADPH の酸化にともなう 340 nm における吸光度の減少を測定し，定量した。5.0~30 μM の NH₄Cl を用いて検量線を作成し，(1)の酵素反応液 0.2 ml 中のアンモニウムイオン量を算出した。

Table 2-4. Reaction mixture for glutamate dehydrogenase assay.

50 mM Sodium-potassium phosphate buffer (pH7.5)	1.30 ml
5~30 μM NH ₄ Cl solution or reaction mixture	0.20 ml
2.0 mM NADPH	0.10 ml
100 mM 2-Ketoglutaric acid	0.20 ml
Enzyme	0.10 ml
Total	2.00 ml

(5) HPLC 分析による定量

酵素反応終了後、溶液に残存する 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸および非酵素的に生成する 2,5-ピリジンジカルボン酸を HPLC で定量した。装置および条件を以下に示す。

[装置]

- ・ポンプ：L-6200 Intelligent Pump (日立製作所, 東京)
- ・検出器：L-4200 UV-VIS Detector (日立製作所, 東京)
- ・記録計：D-2500 Chromato-Integrator (日立製作所, 東京)
- ・カラム：Inertsil ODS-2 (4.6×150 mm, 5 μm, GL サイエンス, 東京)

[条件]

- ・溶離液：50 mM phosphate buffer (pH 7.5)-methanol (65:35, v/v)
- ・流速：0.4 ml/min
- ・検出波長：278 nm

<結果>

1. 酵素反応時におけるUV-VIS スペクトルの変化

精製酵素 (4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾ および 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド分解酵素) を用いた際の酵素反応時における吸収スペクトルの変化を Fig. 2-12 に示した. 反応開始後, すぐに 350 nm の吸光度の増加が見られ, 徐々に 375 nm の吸光度の増加も見られた. 反応開始 6 分後には, 375 nm における吸収の増加が顕著となった. 吸収スペクトルの変化より, 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸はベンゼン環の開裂後, 2 段階の反応を経て 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドに変換されると予想した.

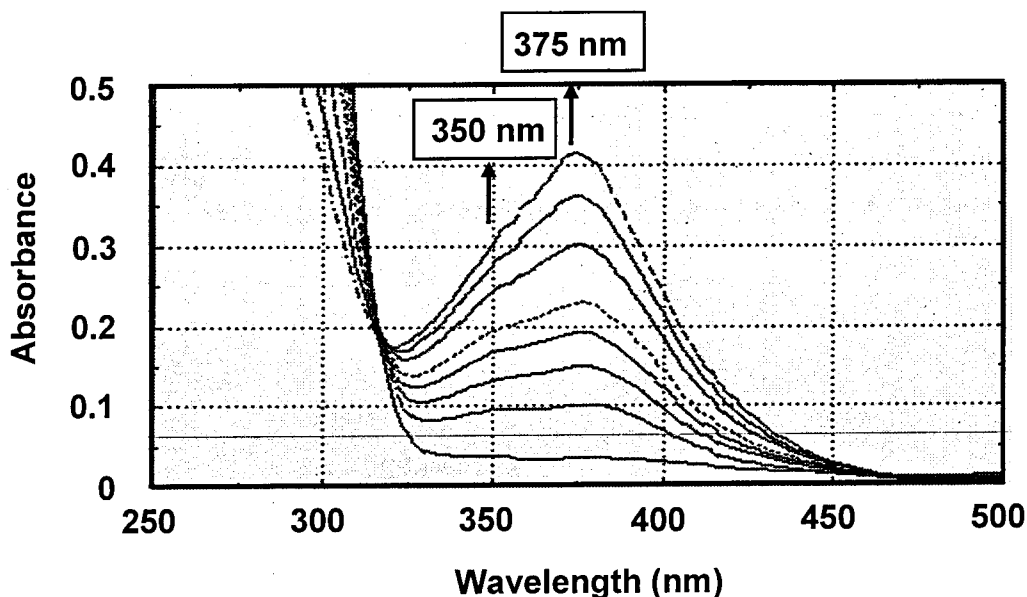


Fig.2-12. Absorption spectrum of the reaction products formed from 4-amino-3-hydroxybenzoic acid in an assay with purified enzymes.

The reaction mixture contained 2.9 ml of 100 mM sodium-potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.1 ml of 5 mM 4-amino-3-hydroxybenzoic acid, and 0.1 ml of purified 2-amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde degrading enzyme ($71 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). The reaction was started by adding 0.05 ml of purified 4-amino-3-hydroxybenzoate 2,3-dioxygenase ($6.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). The reaction was started by adding the enzyme solution. After incubation at 24°C , the sample was scanned with a spectrophotometer and spectrum was recorded every 2 min.

2. 酵素反応生産物の同定

誘導体化した酵素反応生産物を GC-MS 分析し、構造解析した。リテンションタイム 11.0 分 (Compound A) および 13.2 分 (Compound B) にメインピークが見られた。Compound A 由来のフラグメンテーションを解析すると、 m/z 466 (M^+), 451 (M^+-CH_3), 436 ($M^+-CH_3 \times 2$), 421 ($M^+-CH_3 \times 3$), 377 ($M^+-OSi(CH_3)_3$), 363 ($M^+-Si(CH_3)_3-CH_3 \times 2$), 299 ($M^+-C_6F_5$), 195 ($[C_6F_5N_2]^+$), 147 ($[(CH_3)_2=O-OSi(CH_3)_3]^+$), 73 ($[Si(CH_3)_3]^+$) (Fig. 2-13) であり、同化合物はトリメチルシリル化およびペンタフルオロフェニルヒドラゾン化された 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドであると同定した。また、Compound B 由来のフラグメンテーションを解析すると m/z 311 (M^+), 296 (M^+-CH_3), 266 ($M^+-CH_3 \times 3$), 238 ($M^+-Si(CH_3)_3$), 222 ($M^+-Si(CH_3)_3-O$), 194 ($M^+-COOSi(CH_3)_3$), 147 ($[(CH_3)_2=O-OSi(CH_3)_3]^+$), 73 ($[Si(CH_3)_3]^+$), 77 ($M^+-COOSi(CH_3)_3-COOSi(CH_3)_3$) (Fig. 2-14) であり、同化合物はトリメチルシリル化された 2,5-ピリジンジカルボン酸であると同定した。さらに、オーセンティックの 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドと 2,5-ピリジンジカルボン酸を用いて同様に誘導体化し、分析を行ったところリテンションタイムとフラグメンテーションパターンは一致した。

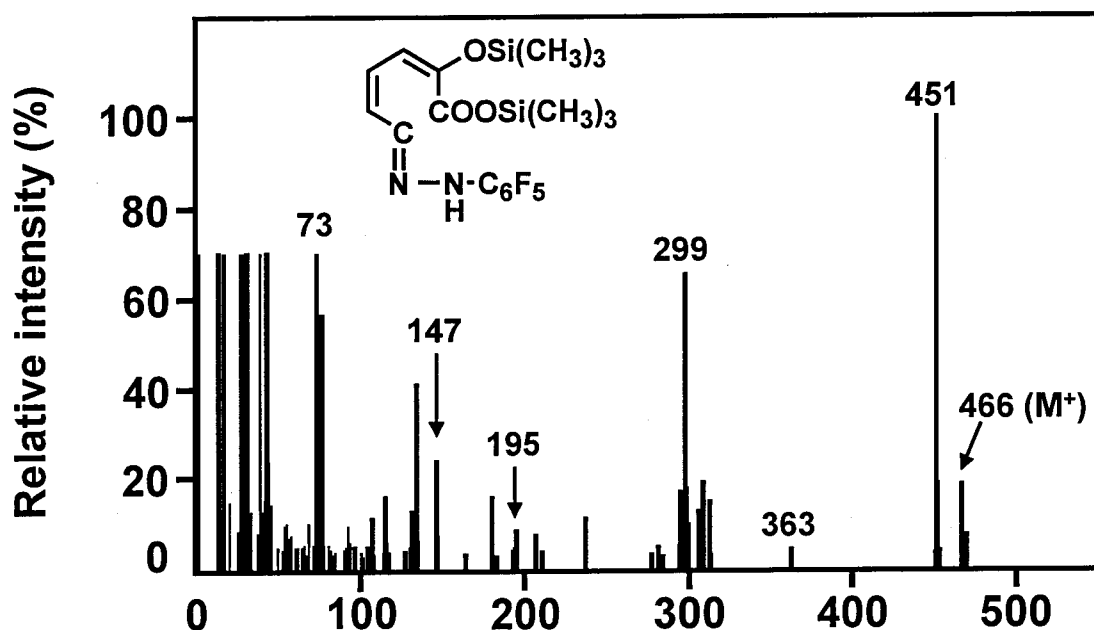


Fig. 2-13. Mass spectrum of pentafluorophenylhydrazone and trimethylsilylated compound A.

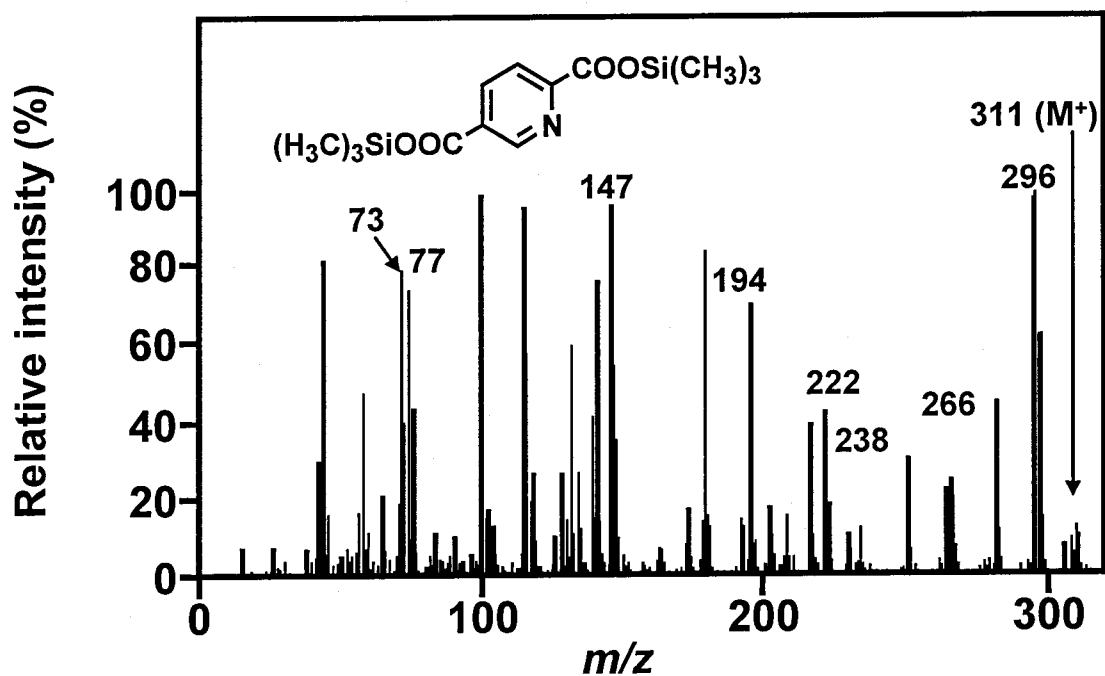


Fig. 2-14. Mass spectrum of trimethylsilylated compound B.

3. 酵素反応の化学量論および酵素の命名

酵素反応の化学量論を Table 2-5 に示す. 酵素反応終了後の反応液を HPLC にて分析したところ, 基質である 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸は完全に消失し, 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドからは非酵素的に生成した 2,5-ピリジンジカルボン酸が蓄積していた. また, 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドと精製酵素との反応により生成したアンモニウムイオンおよび 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドはそれぞれ 0.017 mM および 0.028 mM であった. 酵素反応により生じた化合物の中で, 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドから非酵素的に生成した 2,5-ピリジンジカルボン酸は大部分であったが, 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドとアンモニウムイオンはほぼ等量生成していたことから, 酵素反応機構を Fig. 2-15 のように推定した. つまり, 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸が 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼによってベンゼン環の開裂を受けて生成した 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドは 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド分解酵素により脱アミノ化反応を受け, 2-ヒドロキシ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドとなり非酵素的な脱炭酸反応を経て 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドが生成したと結論した. これらより, 本酵素は 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドを基質として, 脱アミノ反応を触媒する酵素であるとし, 「2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド デアミナーゼ」と命名することにした.

Table 2-5. Reaction products from 4-amino-3-hydroxybenzoic acid.

Substrate (mM)	Reaction products (mM)		
4-Amino-3-hydroxybenzoic acid	2,5-Pyridine-dicarboxylic acid	NH ₄ ⁺	2-Hydroxymuconic 6-semialdehyde
0.420	0.410	0.017	0.028

第6節 要約と考察

第1章において見出した2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド分解酵素の精製および特性解析, 反応機構の解析を行った¹⁹⁾. 本酵素の基質である2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドは非常に不安定な化合物であるため4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸と4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾を用いて基質の供給と酵素反応を同一の反応系で行なう酵素活性測定法を新たに確立した. つづいて2種類の陰イオン交換クロマトグラフィーと疎水クロマトグラフィーを用いて本酵素を単一に精製することが出来た (Fig. 2-5). 精製酵素を用いて, 酵素化学的諸性質および酵素反応機構を明らかにした. 反応機構の解析から, 本酵素を2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド デアミナーゼと称することにした. 本酵素を *Pseudomonas* sp. AP-3 株由来¹¹⁾ の2-アミノムコン酸 デアミナーゼと特性について比較するといくつかの相違が見られた.

精製した本酵素および4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾を用いた酵素反応を行い, 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸より生成した化合物を質量分析によりそれぞれ2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドおよび2,5-ピリジンジカルボン酸と同定した (Fig. 2-13, 14). 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドから2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドへ至る経路として2種類の可能性が考えられる. 1つは2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド (Fig. 2-15(A), Compound II) が2-アミノムコン酸 6-セミアルデヒド (Fig. 2-15(A), Compound VI) を経て2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド (Fig. 2-15(A), Compound IV) に変換される経路である¹¹⁾. 2-アミノムコン酸 6-セミアルデヒド ($\lambda_{\max}=382$ nm, Fig. 2-15(B), Compound II) は *Pseudomonas* sp. AP-3 株における2-アミノフェノールの代謝中間体として報告されている. 同中間体もまた非常に不安定で *in vitro* の反応において生成後10分以内に α -ピコリン酸に変換される³¹⁾. 第2節における酵素反応時における吸収スペクトルの変化 (Fig. 2-12) には, 2-アミノムコン酸 6-セミアルデヒド由来の380 nm 付近の吸光度の増加は全く見られなかった. また, 反応の化学量論を解析した際に検出できたのは2,5-ピリジンジカルボン酸のみで α -ピコリン酸を検出することは出来なかった. よって, 分光光学的知見と蓄積した反応生産物の分析より, 2-アミノムコン酸 6-セミアルデヒドを経た2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドが生成する代謝系ではないと結論した. 一方, 2つ目の経路として2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドが2-ヒドロキシ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド (Fig. 2-15(A), Compound III) を経て2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド (Fig. 2-15(A), Compound IV) に変換される経路が考えられる. 反応時における吸収スペクトルの変化を見ると, まず350 nm 付近に酵素反応生産物の蓄積が一時的に見られた (Fig. 2-12). この酵素反応生産物の分離および同定を行うことはできなかったが, 有機電子論³²⁾ と既報の論文^{33), 34)} で報告されたスペクトルデータに基づき, 350 nm 付近に吸収を示す化合物を2-ヒドロキシ-5-カルボキシム

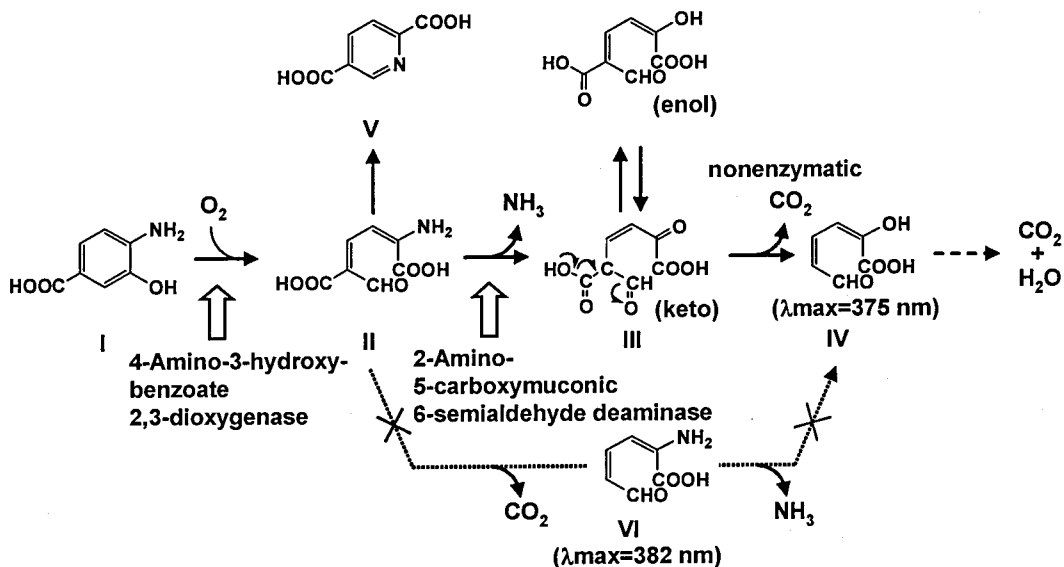
コン酸 6-セミアルデヒド (Fig. 2-15(A), Compound III) であると推定した. 3-ケト酸は温和な条件下でも容易にカルボキシル基が CO_2 として脱離する³²⁾. 2-ヒドロキシ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドはC-5位にカルボキシル基とアルデヒド基を持つ3-ケト酸であり, Fig. 2-15(A)に見られるように, ケト・エノール体平衡中に脱炭酸反応が起こる可能性がある. また, Crawfordらや野崎らはプロトカテキン酸 2,3-ジオキシゲナーゼおよびカテコール 2,3-ジオキシゲナーゼにより, プロトカテキン酸 (2,3-ジヒドロキシ安息香酸) が 350 nm に極大吸収を示す 2-ヒドロキシ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド (Fig. 2-15(C), Compound II) に変換されると報告している^{33), 34)}. 2-ヒドロキシ-5-カルボキシムコン酸は非酵素的な脱炭酸反応を経て 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド (Fig. 2-15(C), Compound III) となる. 以上のことより, 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドは, 精製酵素によって脱アミノ反応を受け, 非酵素的な脱炭酸反応を経て 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドに変換されると結論した (Fig. 2-15 (A)). よって, 本酵素は 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドを基質として, 脱アミノ反応を触媒する酵素であると, 「2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド デアミナーゼ」と称することにした¹⁹⁾.

精製した本酵素の分子量はゲル濾過法では 34,000, SDS 電気泳動ではサブユニットの分子量が 15,000 であったことから, 本酵素はホモダイマーであると結論した. 本酵素は基質特異性が極めて高く, 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドにのみ活性を示した. また, 本酵素は 2 価, 3 価の金属イオンにより強く阻害された. 精製酵素と類似した脱アミノ反応を触媒する酵素として *Pseudomonas* sp. AP-3 株由来の 2-アミノムコン酸 デアミナーゼ¹¹⁾ と特性について比較した. AP-3 株由来の同酵素は, 基質特異性, 分子量, サブユニット構造, 塩基配列の点で既報の芳香族化合物代謝関連酵素とは全く異なっていることから新規のデアミナーゼであると報告されている¹¹⁾. 10d 株由来のデアミナーゼと AP-3 株由来のデアミナーゼを比較すると, サブユニットの分子量が極めて小さいことと pH 安定性において類似していた. しかし, 温度安定性, Native の分子量, 各種試薬の影響において相違が見られた (Table 2-6). 10d 株由来の同酵素は分子量 15,000 のサブユニットからなるホモダイマーであるのに対し, AP-3 株の同酵素は分子量 16,000 のサブユニットからなるホモテトラマーである. 10d 株由来の同酵素は 2 価および 3 価の金属イオン類に対してほぼ完全に阻害を受けるのに対し, AP-3 株由来の同酵素は Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} などの重金属類にのみ阻害を受けた. さらに, 10d 株由来の同酵素の N 末端アミノ酸配列を解析したところ, AP-3 株由来の同酵素を含めてデータベース上の既報のタンパク質とは全く類似性を示さなかった. 以上より, 10d 株由来の 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドもまた新規のデアミナーゼ酵素であると結論した.

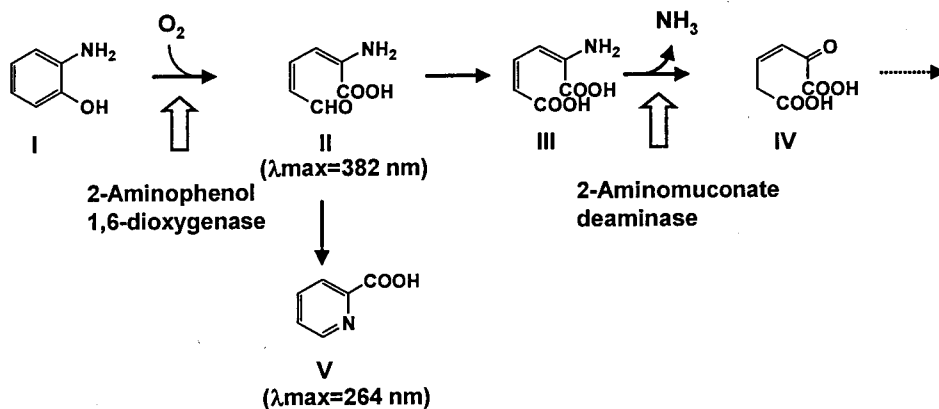
精製した同酵素の UV-VIS スペクトル分析および蛍光光度分析から, 本酵素はフラビン類の補欠分子を有していると結論した (Fig. 2-9). AP-3 株のデアミナーゼ以外に *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 株由来の 2-アミノムコン酸デアミナーゼの特性に

ついて報告がある¹⁴⁾。JS45株由来の同酵素のスペクトル分析において280 nmに極大吸収を示すのみで可視光側には吸収が見られない¹⁴⁾。10d株由来の同酵素はその活性発現に補酵素を必要としないが、266 nmに極大吸収を示すことからD-アミノ酸オキシダーゼ類に類似したフラビン類が結合していると考えられる^{34)~36)}。フラビン含有酵素はその構造に核酸およびイソアロキサジン環を含むため、紫外部の極大吸収が260 nm側にシフトしていることが多い²⁹⁾。たんぱく質由来の280 nmの吸収は、トリプトファンやチロシンであり、FAD、トリプトファン、チロシンのそれぞれの極大吸収波長におけるモル吸光係数はFAD (264 nm, 65,800)、トリプトファン (278 nm, 5,500)、チロシン (275 nm, 1340) であり、本酵素のようにNativeにおける分子量が小さい酵素ではフラビン分子種の吸収から酵素自身の極大吸収も260 nm側にシフトすると考えられる。熱処理によって結合していた補欠分子を酵素タンパクから容易に分離、抽出できたことから同酵素に結合するフラビン類の結合様式は非共有結合型であると考えられる。また、FADおよびFMNの蛍光光度分析結果と比較すると、蛍光スペクトルは類似していたが、励起スペクトルにおいてはその極大波長に相違が見られた。さらに、HPLC分析の結果、本酵素由来の補酵素のリテンションタイムとオーセンティックのFADおよびFMNのリテンションタイムには相違が見られた。よって、同酵素の含有するフラビン酵素はFADおよびFMNの類縁化合物であると考えられる。しかし、単一に精製した同酵素を大量に得ることは現時点で困難であったため、補酵素の同定および定量は出来なかった。

(A) *Bordetella* sp. 10d



(B) *Pseudomonas* sp. AP-3



(C) *Bacillus circulans*

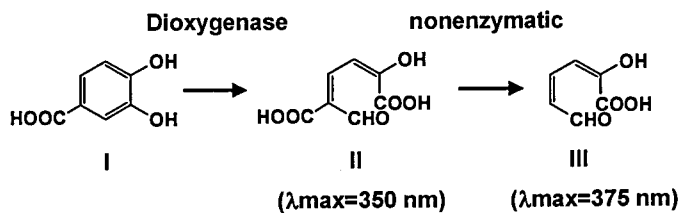


Fig. 2-15. Proposed pathway of 4-amino-3-hydroxybenzoate metabolism in *Bordetella* sp. strain 10d (A), comparison to the modified meta-cleavage pathway of 2-aminophenol (B), and to the meta-cleavage pathway of protocatechuic acid (C).

Proposed pathway of 4-amino-3-hydroxybenzoic acid in *Bordetella* sp. strain 10d^{16, 19)} (A). I, 4-amino-3-hydroxybenzoic acid; II, 2-amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde; III, 2-hydroxy-5-carboxymuconic 6-semialdehyde; IV, 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde; V, 2,5-pyridinedicarboxylic acid; and VI, 2-aminomuconic 6-semialdehyde. (B) Proposed pathway of 2-aminophenol in *Pseudomonas* sp. AP-3^{11, 31)}. I, 2-aminophenol; II, 2-aminomuconic 6-semialdehyde; III, 2-aminomuconic acid; IV, 4-oxalocrotonic acid; V, picolinic acid. (C) Proposed pathway of protocatechuic acid in *Bucillus circurans*^{33, 34)}. I, protocatechuic acid; II, 2-hydroxy-5-carboxymuconic 6-semialdehyde; III, 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde.

Table 2-6. Comparison of deaminases.

	2-Amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde deaminase ¹⁹⁾	2-Aminomuconate deaminase ¹¹⁾
Strain	<i>Bordetella</i> sp. 10d	<i>Pseudomonas</i> sp. AP-3
Molecular weight		
Native enzyme	34,000	67,000
Subunit	15,000	16,000
Thermostability	~70°C	~50°C
pH stability	5.5-7.5	5.5-8.0
Effects of reagents	Fe ²⁺ (0%), Fe ³⁺ (29%), Mn ²⁺ (0%), Co ²⁺ (0%), Ni ²⁺ (0%), Zn ²⁺ (7%)	Pb ²⁺ (54%), Hg ²⁺ (14%), Cu ²⁺ (51%)
NH ₂ -terminal	PKILVHSDAAPTGF- TNXHTP	MVSKADNSAKLVEGK

第3章 *Bordetella* sp. 10d の生産する 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼの精製および特性解析

第1節 序

第2章で2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドはデアミナーゼによる脱アミノ反応および非酵素的な脱炭酸反応により 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドまで代謝されることを明らかにした¹⁹⁾。また、第1章において10d株は2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを NAD⁺依存型デヒドロゲナーゼによりさらに代謝することを述べた。第3章では、2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼを精製し、本酵素の特性解析および反応機構を明らかにすることを目的とする。本酵素を精製し、得られた精製酵素を用いて酵素化学的諸性質を明らかにする。また、酵素反応生成物の同定および反応機構の解析を行う。さらに、芳香族化合物代謝に関与する既報のデヒドロゲナーゼ酵素類と比較する。

第2節 酵素の精製

1. 酵素活性測定法

基質(2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド)の合成は第1章第2節に従い、カテコールより酵素的に調製した¹⁸⁾。酵素活性測定は第1章第3節に従い、24℃で10分間反応を行った(Table 1-10)。酵素活性は第1章3節で定義した酵素単位より算出した。

2. 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地での培養

本菌の培養方法は第1章第2節の方法に従った。

3. 酵素の精製

酵素精製におけるすべての操作は4℃以下で行った。遠心分離は全て、20,000×g, 10分間の条件で行った。

(1) 無細胞抽出液の調製

培養液2.4Lから10d株の菌体を33g得た(湿菌体)。湿菌体1gあたり10mlの20mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0, buffer A)を加えて懸濁し、第2章第2節の方法に従い、無細胞抽出液を得た。(Fraction 1, 330 ml)

(2) 除核酸操作

無細胞抽出液に、20% (w/v) 硫酸ストレプトマイシン溶液を終濃度が1% (w/v) となるように攪拌しながら添加した。30分間攪拌した後、遠心分離により沈殿した核酸を除き、上清を得た。(Fraction 2, 330 ml)

(3) 硫安分画

Fraction 2に、摩砕硫安を30%飽和になるように攪拌しながら加えた。30分間攪拌後、遠心分離により沈殿を除去した。得られた上清に硫安を50%飽和となるように加え、30分間攪拌後、遠心分離により沈殿を回収した。沈殿をbuffer A 30mlに溶解した後、

buffer A 1L に対して透析した。3 時間おきに 1 度透析外液を交換し、一晚透析した。
(Fraction 3, 63.0 ml)

(4) DE52 カラムクロマトグラフィー

Fraction 3 を buffer A にて平衡化した DE52 (Whatman International Ltd., Maidstone, England) を充填したカラム (2.1×22.0 cm) にアプライした。230 ml の buffer A でカラムを洗浄した後、0~0.3 M NaCl を含む 1100 ml の buffer A を用いてリニアグラジエント法により、流速 42 ml·h⁻¹ で酵素を溶出した。各フラクション (5.0 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した。高活性画分を集め buffer A に対して一晚透析を行った。(Fraction 4, 70.0 ml)

(5) DEAE-Cellulofine カラムクロマトグラフィー

Fraction 4 を buffer A にて平衡化した DEAE-Cellulofine A-800 (生化学工業, 東京) を充填したカラム (2.1×25.0 cm) にアプライした。260 ml の buffer A でカラムを洗浄した後、0~0.25 M NaCl を含む 1300 ml の buffer A を用いたリニアグラジエント法により、流速 42 ml·h⁻¹ で酵素を溶出した。高活性画分を集め 20 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液 (pH 6.5, 以後 buffer C) に対して 3 時間おきに 1 度透析外液を交換後、一晚透析して buffer 交換をした。各フラクション (6.4 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した。(Fraction 5, 45.0 ml)

(6) DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィー

Fraction 4 を buffer C を用いて平衡化した DEAE-Toyopearl 650S ((東ソー, 東京) を充填したカラム (1.6×15.0 cm) にアプライした。90 ml の buffer A でカラムを洗浄した後、0~0.20 M NaCl を含む 450 ml の buffer B を用いてリニアグラジエント法により、流速 42 ml·h⁻¹ で酵素を溶出した。各フラクション (3.0 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した。(Fraction 5, 15.0 ml)

4. タンパク質の定量

タンパク質は Lowry 法により定量した²⁴⁾。標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。

<結果>

1. 酵素の精製

各精製段階における酵素活性およびタンパク質量を Table 3-1 に示す。硫酸分画について DE52 カラムクロマトグラフィー (Fig. 3-1), DEAE-Cellulofine A-800 カラムクロマトグラフィー (Fig. 3-1), DEAE-Toyopeal カラムクロマトグラフィー (Fig. 3-3) に供した。本酵素は非常に不安定なため、さらに分画を行うことができなかった。Native 電気泳動結果より、最終精製段階での活性画分は供雑タンパク質を含んでいた。本酵素は最終精製段階において 0.6% の収率で 17 倍まで精製され、比活性は $0.071 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ であった (Table 3-1)。よって、以後の特性解析および反応機構の解析においては部分精製酵素を用いた。

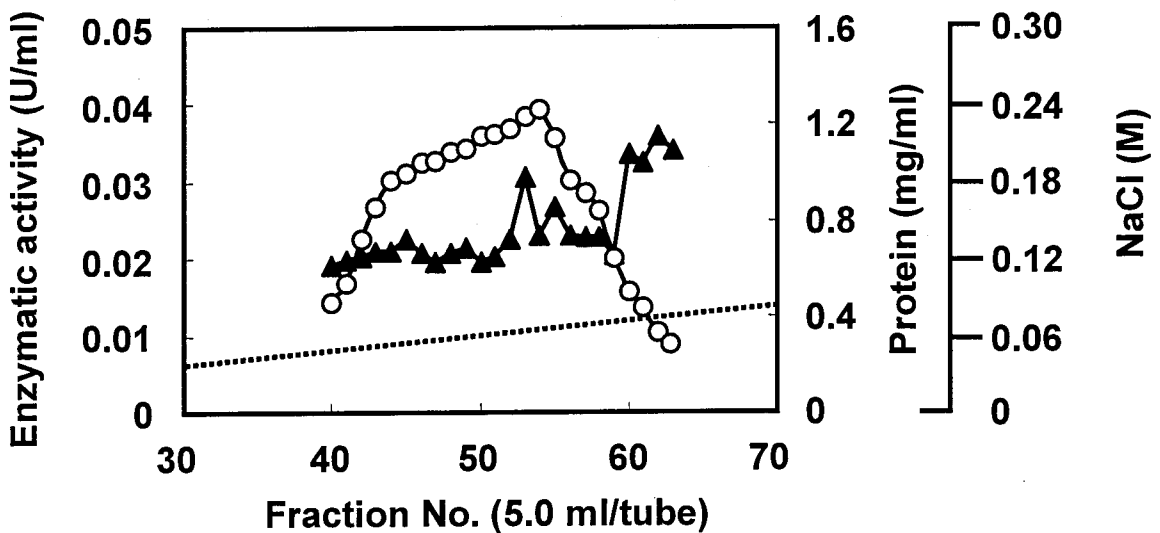


Fig. 3-1. Column chromatography of the enzyme on DE52 cellulose.

The enzyme solution (Fraction 3,63 ml) was applied to a column (2.1×22.0 cm) of DE52 equilibrated with buffer A. The column was washed with buffer A and then proteins were eluted with a liner gradient (0 to 0.3 M) NaCl in 1100 ml of buffer A. Fraction of 5.0 ml were collected at a flow rate of $42 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$. The protein concentration and enzymatic activities were assayed. Symbols: \circ , enzymatic activity; \blacktriangle , protein; and ----, NaCl.

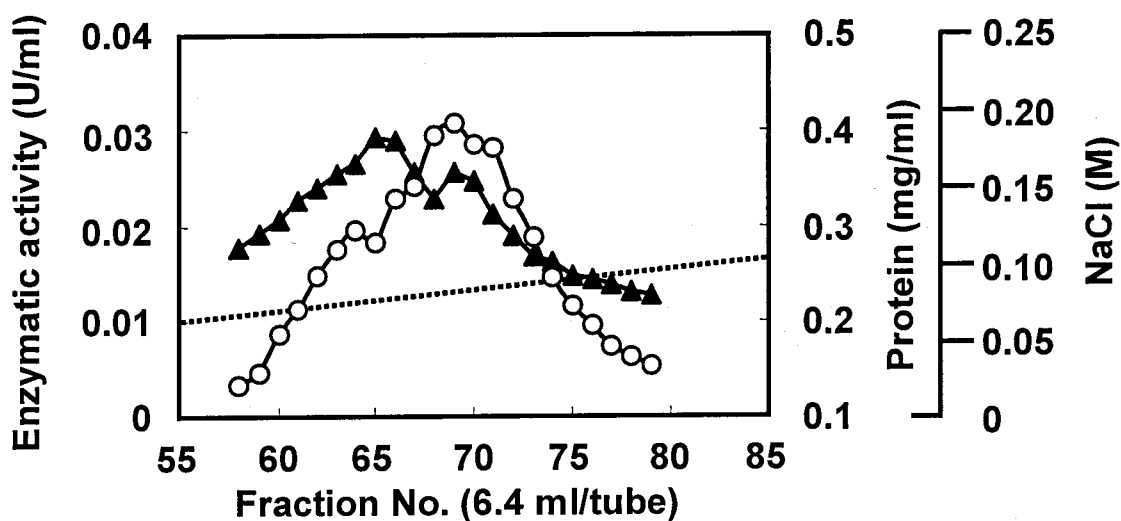


Fig. 3-2. Column chromatography of the enzyme on DEAE-Cellulofine A-800.

The enzyme solution (Fraction 4, 70 ml) was applied to a column (2.1×25 cm) of DEAE-Cellulofine A-800 equilibrated with buffer A. The column was washed with buffer A and then enzyme was eluted with a liner gradient (0 to 0.25 M) NaCl in 1300 ml of buffer A. Fraction of 6.4 ml were collected at a flow rate of 42 ml·h⁻¹. The protein concentration and enzymatic activities were assayed. Symbols: ○, enzymatic activity; ▲, protein; and ----, NaCl

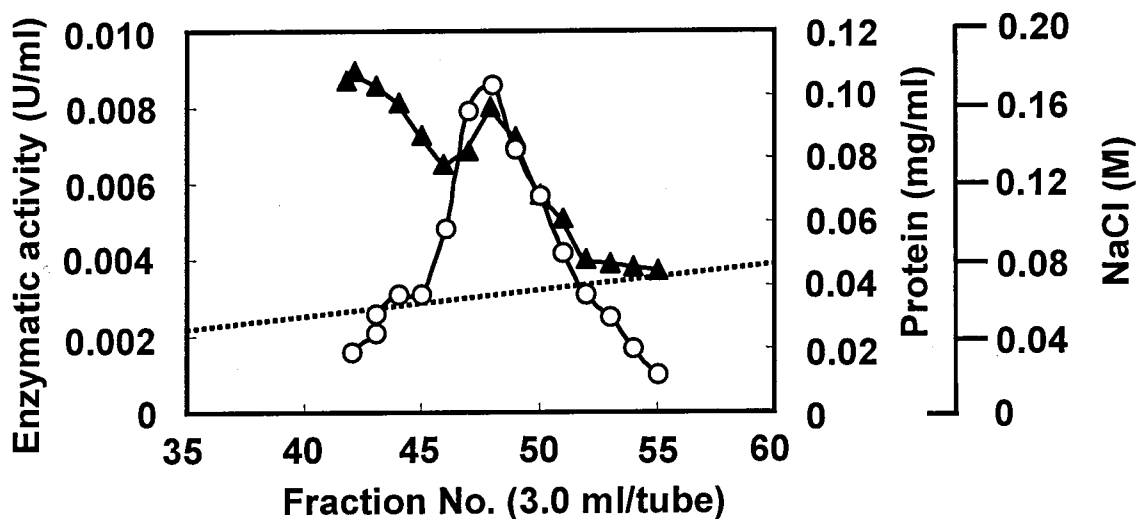


Fig. 3-3. Column chromatography of the enzyme on Phenyl-Toyopearl 650S.

The enzyme solution (Fraction 5,45 ml) was applied to a column (1.6×15.0 cm) of Phenyl-Toyopearl 650S equilibrated with buffer C. The column was washed with buffer C and then enzyme was eluted with a liner gradient (0 to 0.2 M) NaCl in 450 ml of buffer C. Fraction of 3.0 ml were collected at a flow rate of 42 ml·h⁻¹. The protein concentration and enzymatic activities were assayed. Symbols:○, enzymatic activity; ▲, protein; and -----, NaCl.

Table 3-1. Summary of purification.

	Volume (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U·mg ⁻¹)	Recovery (%)
Cell extract	330	16	3,900	4.1×10 ⁻³	100
Streptomycin sulfate	330	14	3,800	3.7×10 ⁻³	88
Ammonium sulfate	63	12	1,300	9.2×10 ⁻³	75
DE52	70	2.4	52	0.046	15
DEAE-Cellulofine A-800	45	0.9	12	0.075	5.6
DEAE-Toyopearl 650S	15	0.1	1.4	0.071	0.6

第3節 精製酵素の特性解析

1. 物理化学的性質

<方法>

1. pH および温度安定性

(1) pH 安定性

pH 3.0~11.0 の各緩衝液を調製し、酵素液をそれぞれの緩衝液に対して24時間透析した後、残存する酵素活性を測定した。50 mM 酢酸-酢酸ナトリウム (pH 3.0~5.5), 50 mM リン酸カリウム-ナトリウム (pH 5.0~8.0), 20 mM Tris-HCl (pH 7.0~9.5) および 50 mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 9.0~11.0) の各緩衝液を用いて行った。

(2) 温度安定性

本酵素を 20°C~70°C の各温度で10分間加熱処理した後、第1章第3節に示した反応液を用いて (Table 1-10), 残存する活性を測定した。

(3) 酵素活性に及ぼす pH の影響

100 mM 酢酸-酢酸ナトリウム (pH 3.0~5.5), 100 mM リン酸カリウム-ナトリウム (pH 5.0~8.0), 100 mM Tris-HCl (pH 7.0~9.5) および 100 mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 9.0~11.0) の各緩衝液を用いて行った。

2. 触媒化学的性質

<方法>

(1) 各種試薬の影響

本酵素に与える金属イオン, -SH 基修飾試薬, キレート試薬等の影響を調べた。酵素液 ($2.6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 0.3 ml に、各種試薬の終濃度が 1 mM になるように各種化合物を添加した。水中で10分間放置した後、活性を測定した。

(2) 基質特異性

各種の化合物を基質とする酵素反応液を調製し、反応の進行に伴い、 NAD^+ が NADH へ還元されることを示す 340 nm における吸光度の増加を測定することにより、活性を示す基質があるかどうかを調べた。試験した化合物は、直鎖状アルデヒド類としてホルムアルデヒド (HCHO , 東京化成工業, 東京), アセトアルデヒド (CH_3CHO), プロピオンアルデヒド ($\text{C}_2\text{H}_5\text{CHO}$), ブチルアルデヒド ($\text{C}_3\text{H}_7\text{CHO}$), クロトンアルデヒド ($\text{C}_4\text{H}_9\text{CHO}$), *n*-ヘキシルアルデヒド ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{CHO}$, 以上ナカライテスク, 京都) の5種類とベンズアルデヒド ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CHO}$, 和光純薬, 大阪) である。

(3) 酵素反応速度論

Lineweaver & Burk 法³⁷⁾により2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドに対する本酵素の K_m 値を測定した。

<結果>

1. pHおよび温度安定性

(1) pH安定性

本酵素は、50 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液および 50 mM リン酸カリウム-ナトリウム緩衝液 (pH 4.5~5.0) で70%以上の残存活性を示した。また、このpH範囲内では50 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) において最も安定であった。(Fig. 3-4)

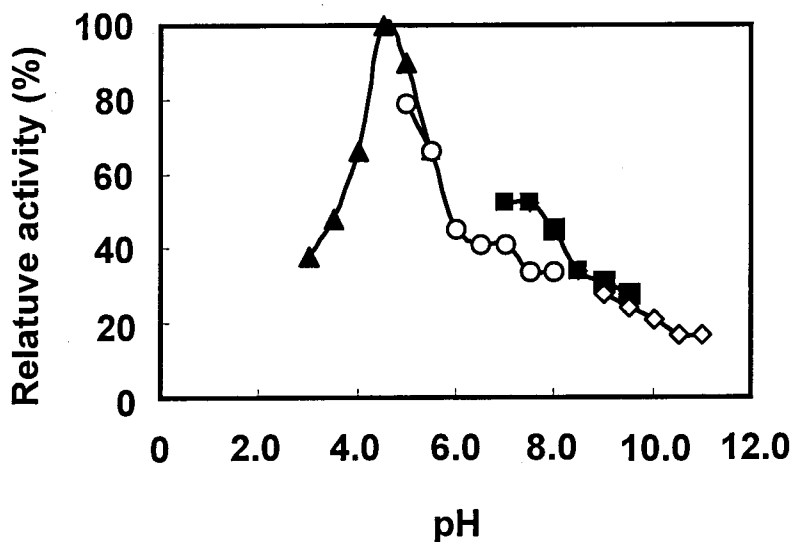


Fig. 3-4. Effect of pHs on the stability of 2-Hydroxymuconic 6-semialdehyde dehydrogenase.

The enzyme was incubated in 50 or 20 mM buffers of various pHs at 4°C for 24 h, and then the remaining activity was assayed. The buffers used:▲, acetate; ○, sodium-potassium phosphate; ■, Tris-HCl; and ◇, Na₂CO₃-NaHCO₃.

(2) 温度安定性

本酵素は、40℃までは70%以上の活性を維持した。しかし、それ以上の温度では不安定となり、55℃で43%まで活性が低下した。本酵素は65℃で完全に失活した (Fig. 3-5)。

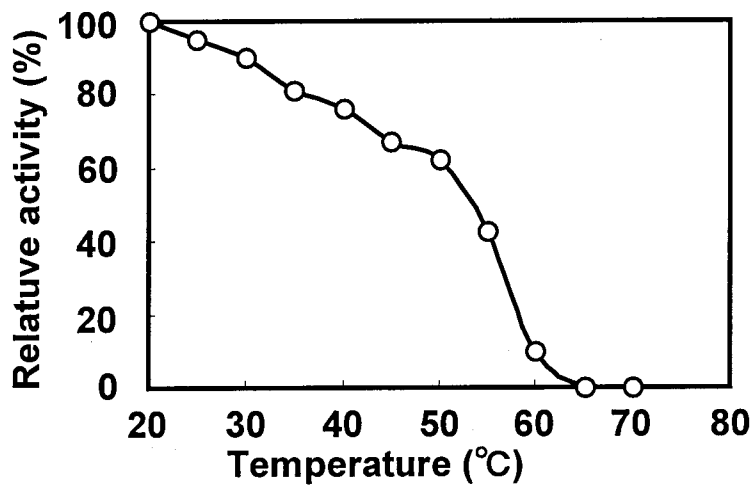


Fig. 3-5. Thermostability of 2-Hydroxymuconic 6-semialdehyde dehydrogenase.

The enzyme was incubated at various temperatures for 10 min, and then the remaining activity was assayed.

(3) 酵素活性に及ぼす pH の影響

本酵素は、pH 8.0 において最大活性を示した (Fig. 3-6). しかし、pH 9.0 で急激に活性が低下した.

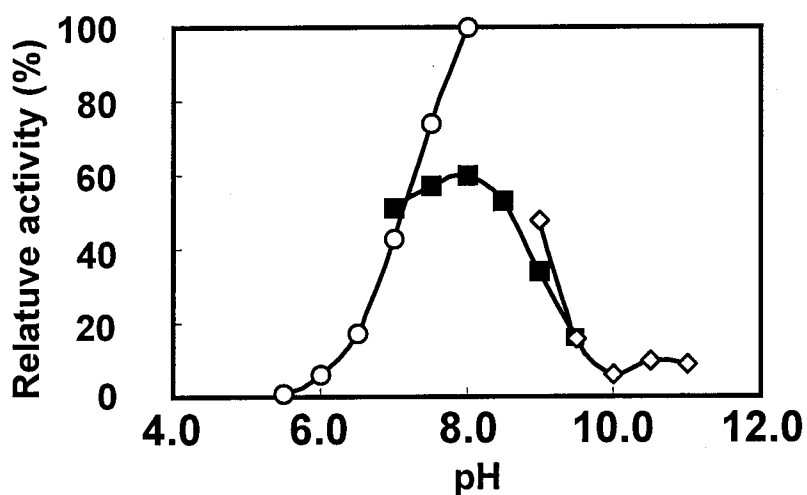


Fig. 3-6. Effect of pHs on 2-Hydroxyomuonic 6-semialdehyde dehydrogenase activity.

The dehydrogenase was assayed in 100 mM buffer solutions at various pHs. The buffers used were: ○, sodium-potassium phosphate; ■, Tris-HCl; and ◇, Na₂CO₃-NaHCO₃.

5. 触媒化学的性質

(1) 各種試薬の影響

本酵素の活性に与える各種試薬の影響について検討し、得られた結果を Table 3-2 に示す。本酵素は金属イオンでは 1 mM の Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 等の 2 価の金属イオン, *p*-クロロメルクリ安息香酸および *N*-エチルマレイミド等の-SH 基修飾試薬により強く阻害された。

Table 3-2. Effects of various compounds on 2-Hydroxymuconic 6-semialdehyde dehydrogenase for 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde.

Compound	Concentration (mM)	Remaining Activity (%)
None	1.0	100
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	89
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	83
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	1.0	100
AgNO_3	1.0	100
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	100
HgCl_2	1.0	0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.0	0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 5\text{H}_2\text{O}$	1.0	94
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	83
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	76
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	26
$\text{CH}_2\text{I}\text{COOH}$	1.0	69
PCMB ^{a)}	1.0	41
DTNB ^{b)}	1.0	82
α, α' -Dipyridyl	1.0	82
<i>N</i> -Ethylmaleimide	1.0	18
Tiron	1.0	85
EDTA	1.0	85
<i>o</i> -Phenanthroline	1.0	82
NaN_3	1.0	90

a) PCMB, *p*-chloromercuribenzoic acid.

b) DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid).

(2) 基質特異性

本酵素における基質特異性の結果を Table 3-3 に示す。本酵素は基質特異性が広く、2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド以外にもホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド等のアルキル基の炭素数 $C_0 \sim C_3$ の直鎖状アルデヒドだけでなく、ベンズアルデヒドに対しても活性を示した。しかし、さらに長鎖のアルキル基からなるクロトンアルデヒド (C_4) および *n*-ヘキシルアルデヒド (C_5) に対しては全く活性を示さなかった。また、試験した化合物の中でアセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒドに対して本来の基質である 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドよりも高い活性を示した。

Table 3-3. Substrate specificity of 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde dehydrogenase.

Substrate	Relative activity (%)
2-Hydroxymuconic 6-semialdehyde	100
Formaldehyde (C_0)	16.5
Acetaldehyde (C_1)	113
Propionaldehyde (C_2)	107
Butyraldehyde (C_3)	138
Crotonaldehyde (C_4)	0
<i>n</i> -Hexylaldehyde (C_5)	0
Benzaldehyde	25.0

(3) 酵素反応速度論

0.32 μM ~16.11 μM の 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを基質として反応を行い、Lineweaver & Burk³⁷⁾ のプロットから、 K_m は 0.95 μM であった。

第4節 酵素反応生産物の分離・同定および反応機構の解析

<方法>

1. 酵素反応生産物の分離と同定

(1) 酵素反応

0.88 mM 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド 6.0 ml, 5 mM NAD⁺ 6.0 ml を加えた 100 mM リン酸カリウム-ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 159 ml に, 部分精製酵素 (660 μg·ml⁻¹) 9.0 ml を添加することで酵素反応を開始し, 24 °C で 1.0 時間, 100 rpm で振とうを続けた.

(2) 酵素反応生産物の誘導体化

酵素反応終了後, 反応液をエバポレーターで 30 ml まで減圧濃縮し, 6.0 N HCl を用いて pH 3.0 に調整した. その後, 酢酸エチルで 3 回抽出を行い, 有機溶媒層を得た. 有機溶媒層は無水硫酸ナトリウムを用いて脱水処理の後減圧乾固を行い, デシケーター内で 1 晩乾燥した. 乾固した酵素反応生産物 (2-ヒドロキシムコン酸) に *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetoamide-アセトニトリル混合液 (v/v, 1:0.2) 300 μl を加えて 85°C, 1.5 時間反応させ, 水酸基およびカルボキシル基をトリメチルシリル化した. トリメチルシリル化した化合物を GC-MS 分析に供した.

(3) GC-MS 分析

トリメチルシリルおよびヒドラゾン誘導体化した化合物は日立 G-3000 ガスクロマトグラフ (日立製作所, 東京) を連結した日立 M-2500 二重収束質量分析計で行った. 条件を以下に示す.

[条件]

- ・カラム : TC-1 fused silica capillary column (0.25 mm × 30 m, GLサイエンス, 東京);
100°C (1 min) → (10°C/min) → 280°C
- ・キャリアガス : He, liner velocity 2.5 cm/min
- ・INJ/DET : 250°C/280°C
- ・検出 : MS (ionization, 70eV)

<結果>

1. 酵素反応生産物の同定

誘導体化した酵素反応生産物を GC-MS 分析し、構造解析した (Fig. 3-7). リテンションタイム 7.9 分 (Compound C) にメインピークが見られた. Compound C 由来のフラグメンテーションを解析すると, m/z 374 (M^+), 359 (M^+-CH_3), 344 ($M^+-CH_3 \times 2$), 257 ($M^+-COOSi(CH_3)_3$), 147 ($[(CH_3)_2Si=O-Si(CH_3)_3]^+$), 143 ($M^+-COOSi(CH_3)_3-CHCOSi(CH_3)_3$), 73 ($[Si(CH_3)_3]^+$) であり, 同化合物はトリメチルシリル化された 2-ヒドロキシムコン酸であると同定した. さらに, オーセンティックの 2-ヒドロキシムコン酸を用いて同様に誘導体化し, 分析を行ったところリテンションタイムとフラグメンテーションパターンは一致した.

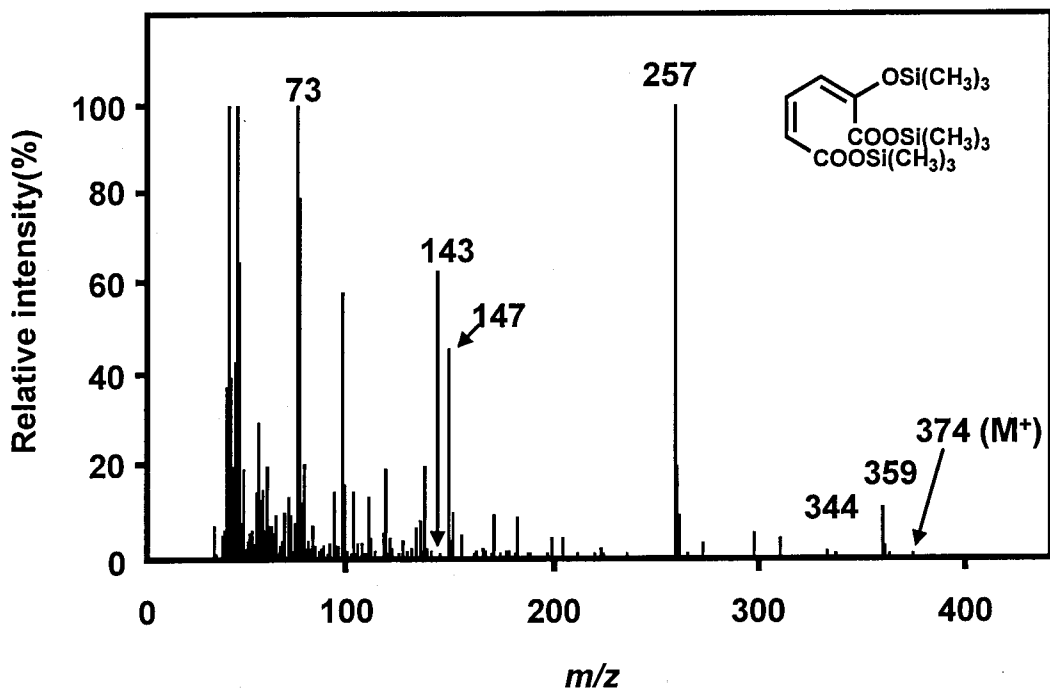


Fig.3-7. Mass spectrum of trimethylsilylated compound C.

第5節 要約と考察

第1章において見出した2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド分解酵素の精製および特性解析, 反応機構の解析を行った. 本酵素は非常に不安定であったため, 単一に精製することが出来なかった. よって, 部分精製酵素を用いて, 酵素化学的諸性質および酵素反応機構を明らかにした. 反応機構の解析から, 本酵素を NAD^+ 依存型 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼと結論した. 本酵素を *Pseudomonas* sp. AP-3 株由来の 2-アミノムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ¹¹⁾ および *Pseudomonas putida* mt-1 株由来の 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ³⁹⁾ と特性について比較するといくつかの相違が見られた.

2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドの代謝に関与する酵素は, 既報の *P. putida* mt-2 株によるカテコールのメタ開裂経路において 2 種類の代謝系が報告されている⁴⁰⁾ (Fig. 3-8). 1つは NAD^+ 非依存型ヒドロラーゼにより 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド (Fig. 3-8, Compound II) が 2-オキソペント-4-エン酸 (Fig. 3-8, Compound IV) に変換される代謝経路, もう一方は NAD^+ 依存型デヒドロゲナーゼにより, 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドが 2-ヒドロキシムコン酸 (Fig. 3-8, Compound III) に変換される経路である. 第1章にて 10d 株由来の無細胞抽出液は NAD^+ 依存型の 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ活性のみ示すことが示唆された (Fig. 1-2, Table 1-14). 部分精製した本酵素を用いて NAD^+ 共存下にて酵素反応を行い, 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドより生成した化合物を質量分析により 2-ヒドロキシムコン酸と同定した (Fig. 3-7). これらのことから, 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドは NAD^+ 共存下で本酵素, NAD^+ 依存型 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼによって 2-ヒドロキシムコン酸に変換されると結論した (Fig. 3-8).

本酵素は基質特異性が広く, 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド以外にもホルムアルデヒド, アセトアルデヒド, プロピオンアルデヒド, ブチルアルデヒド等のアルキル基の炭素数 $\text{C}_0\sim\text{C}_3$ の直鎖状アルデヒドだけでなく, ベンズアルデヒドに対しても活性を示した (Table 3-3). しかも, 本酵素は試験した化合物の中でアセトアルデヒド, プロピオンアルデヒド, ブチルアルデヒドに対して本来の基質である 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドよりも高い活性を示した. 既報の類縁酵素と基質特異性に関して比較した. AP-3 株由来の 2-アミノムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼもまた基質特異性が広く, 本来の基質である 2-アミノムコン酸 6-セミアルデヒドの他にも Table 3-4 に示したアルデヒド類に対して活性を示したが, ベンズアルデヒドに対しては全く活性を示さない¹¹⁾. 直鎖状アルデヒド類以外にベンズアルデヒドに対しても活性を示す代謝関連酵素として *P. putida* mt-1 株由来の 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ³⁹⁾ が挙げられる. 同菌のデヒドロゲナーゼもまた, 基質以外のカテコール環開裂化合物以外にベンズアルデヒドに対しても活性を示す. 10d 株由来の本酵素は, Hg^{2+} , Cu^{3+} , Zn^{2+} などの 2 価の金属イオンおよび *p*-クロロメリクル安息香酸, *N*-エチルマ

レイミドに対して著しい阻害を受けたことから、酵素の活性中心に-SH 基を有していることが示唆された。本酵素と類似したデヒドロゲナーゼ酵素として AP-3 株由来の 2-アミノムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ¹¹⁾と特性について比較した (Table 3-4)。10d 株由来のデヒドロゲナーゼと AP-3 株由来のデヒドロゲナーゼを比較すると、温度安定性および至適 pH において類似していた。しかし pH 安定性や各種試薬の影響、基質特異性において相違が見られた。10d 株由来の同酵素は Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} などの重金属類の他、モノヨード酢酸、PCMB および *N*-エチルマレイミド等の-SH 基修飾試薬に著しい阻害を受けるのに対し、AP-3 株由来の同酵素は Ag^{2+} , Hg^{2+} 等の重金属イオン、-SH 修飾試薬に関しては PCMB にのみ阻害を受けるという点で相違が見られた。

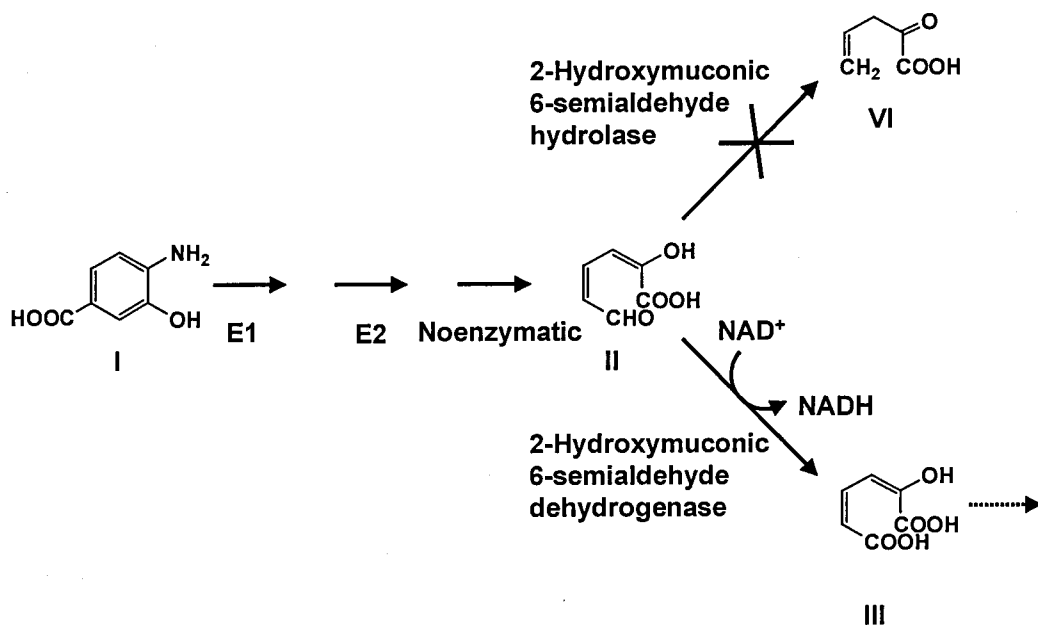


Fig. 3-8. Proposed pathway of 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde metabolism in *Bordetella* sp. strain 10d.

I, 4-amino-3-hydroxybenzoic acid; II, 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde; III, 2-hydroxymuconic acid; IV, 2-oxopent-4-enoic acid; E1, 4-amino-3-hydroxybenzoate 2,3-dioxygenase¹⁶⁾; E2, 2-amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde deaminase¹⁹⁾.

Table 3-4. Comparison of dehydrogenases.

	2-Hydroxymuconic 6-semialdehyde dehydrogenase	2-Aminomuconic 6-semialdehyde dehydrogenase ¹¹⁾
Strain	<i>Bordetella</i> sp. 10d	<i>Pseudomonas</i> sp. AP-3
Thermostability	~40°C	~40°C
pH stability	4.5-5.0	6.0-8.0
Optimal pH	8.0	7.5
Effects of reagents	Hg ²⁺ (0%), Cu ²⁺ (0%), Zn ²⁺ (26%), PCMB (41%), CH ₂ ICOOH (69%), <i>N</i> -Etylmaleimide (18%)	Ag ²⁺ (0%), Hg ²⁺ (0%), PCMB (0%)
Substrate specificity (Relative activity (%))	Formaldehyde (16.5%) Acetaldehyde (113%) Propionaldehyde (107%) Butylaldehyde (138%) Benzaldehyde (25%) HMS ^{a)} (100%)	Formaldehyde (0%) Acetaldehyde (41%) Propionaldehyde (18%) Butylaldehyde (9%) Benzaldehyde (0%) HMS ^{a)} (50%)

a) 2-Hydroxymuconic 6-semialdehyde

第4章 *Bordetella* sp. 10d の生産する 4-オキサロクロトン酸 タータメラゼの精製 および特性解析

第1節 序

第3章で2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドはNAD⁺依存型デヒドロゲナーゼにより2-ヒドロキシムコン酸に代謝されることを明らかにした。また、第1章において10d株の無細胞抽出液より4-オキサロクロトン酸 タータメラゼ活性を見いだした。そこで第4章では、4-オキサロクロトン酸 タータメラゼを精製し、本酵素の特性解析および反応機構を明らかにすることを目的とする。本酵素を精製し、得られた精製酵素を用いて酵素化学的諸性質を明らかにする。また、酵素反応生産物の同定および反応機構の解析を行う。さらに芳香族化合物代謝に関与する既報のタータメラゼ酵素類と比較する。

第2節 酵素の精製

1. 酵素活性測定法

基質 (2-ヒドロキシムコン酸) の合成²¹⁾ は第1章第3節に従った。酵素活性測定は第1章第3節に従い、24°Cで10分間反応を行った (Table 1-11)。酵素活性は第1章第3節で定義した酵素単位より算出した。

2. 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地での培養

本菌の培養方法は第1章第2節の方法に従った。

3. 酵素の精製

酵素精製におけるすべての操作は4°C以下で行った。遠心分離は全て、20,000×g、10分間の条件で行った。

(1) 無細胞抽出液の調製

培養液 14.4 L から 10d 株の菌体を 57 g 得た (湿菌体)。湿菌体 1 g あたり 10 ml の 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, buffer A) を加えて懸濁し、第2章第2節の方法に従い、無細胞抽出液を得た。(Fraction 1, 570 ml)

(2) 除核酸操作

無細胞抽出液に、20% (w/v) 硫酸ストレプトマイシン溶液を終濃度が 1% (w/v) となるように攪拌しながら添加した。30分間攪拌した後、遠心分離により沈殿した核酸を除き、上清を得た。(Fraction 2, 570 ml)

(3) 硫酸分画

Fraction 2 に、摩砕硫酸を 58% 飽和になるように攪拌しながら加えた。30分間攪拌後、遠心分離により沈殿を除去した。得られた上清に硫酸を 72% 飽和となるように加え、30分間攪拌後、遠心分離により沈殿を回収した。沈殿を buffer A 30 ml に溶解した後、buffer A 1L に対して透析した。3時間おきに2度透析外液を交換し、一晚透析した。(Fraction 3, 38.0 ml)

(4) DE52 カラムクロマトグラフィー

Fraction 3 を buffer A にて平衡化した DE52 (Whatman International Ltd., Maidstone, England) を充填したカラム (1.7×22.0 cm) にアプライした。150 ml の buffer A でカラムを洗浄した後、0~0.3 M NaCl を含む 750 ml の buffer A を用いてリニアグラジエント法により、流速 42 ml·h⁻¹ で酵素を溶出した。各フラクション (6.8 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した。高活性画分を集め buffer A に対して一晩透析を行った。(Fraction 4, 47.6 ml)

(5) DEAE-Cellulofine カラムクロマトグラフィー

Fraction 4 を buffer A にて平衡化した DEAE-Cellulofine A-800 (生化学工業, 東京) を充填したカラム (1.7×22.0 cm) にアプライした。150 ml の buffer A でカラムを洗浄した後、0~0.25 M NaCl を含む 750 ml の buffer A を用いたリニアグラジエント法により、流速 42 ml·h⁻¹ で酵素を溶出した。高活性画分を集め 20 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液 (pH 7.5, 以後 buffer D) に対して 3 時間おきに 1 度透析外液を交換後、一晩透析して buffer 交換をした。各フラクション (5.2 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した。(Fraction 5, 36.4 ml)

(6) Phenyl-Cellulofine カラムクロマトグラフィー

Fraction 4 を buffer D を用いて平衡化した Phenyl-Cellulofine (生化学工業, 東京) を充填したカラム (1.7×23.0 cm) にアプライした。160 ml の buffer A でカラムを洗浄した後、1.0~0 M AmSO₄ を含む 800 ml の buffer D を用いてリニアグラジエント法により、流速 42 ml·h⁻¹ で酵素を溶出した。各フラクション (5.2 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した。(Fraction 5, 31.2ml)

4. タンパク質の定量

タンパク質は Lowry 法により定量した²⁴⁾。標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。

5. 電気泳動

(1) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

第 2 章第 3 節に述べたように Davis らの方法²⁵⁾ に従い、精製酵素の純度を検討した。

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

第 2 章第 3 節に述べたように Weber と Osborn の方法²⁶⁾ に精製酵素の純度を検討した。

<結果>

1. 酵素の精製

各精製段階における酵素活性およびタンパク質量を Table 4-1 に示す。硫酸分画について DE52 カラムクロマトグラフィー (Fig. 4-1), DEAE-Cellulofine A-800 カラムクロマトグラフィー (Fig. 4-2), Phenyl-Cellulofine カラムクロマトグラフィー (Fig. 4-3) に供し、本酵素を単一に精製することが出来た (Fig. 4-4 (A), (B))。最終精製酵素は 2.0% の収率で 1000 倍に精製され、比活性は 186 U·mg⁻¹ であった (Table 4-1)。

また、最終精製酵素をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ 1 本のバンドが見られた (Fig. 4-4 (A)). SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、分子量 12,000 に 1 本のバンドがみられた (Fig. 4-4 (B)).

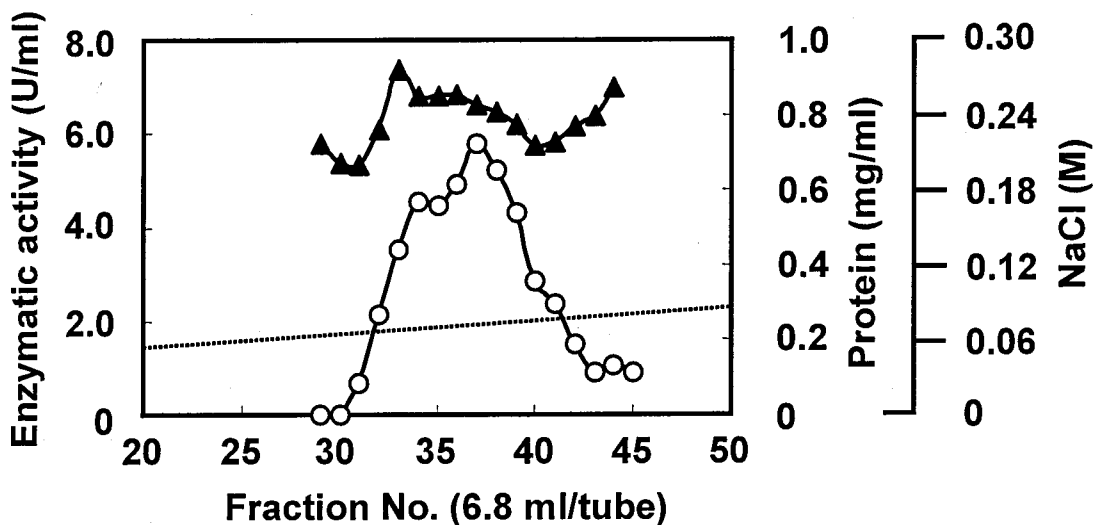


Fig. 4-1. Column chromatography of the enzyme on DE52 cellulose.

The enzyme solution (Fraction 3, 38.0 ml) was applied to a column (1.7×22.0 cm) of DE52 equilibrated with buffer A. The column was washed with buffer A and then proteins were eluted with a linear gradient (0 to 0.3 M) NaCl in 750 ml of buffer A. Fraction of 6.8 ml were collected at a flow rate of 42 ml·h⁻¹. The protein concentration and enzymatic activities were assayed. Symbols: ○, enzymatic activity; ▲, protein; and ----, NaCl.

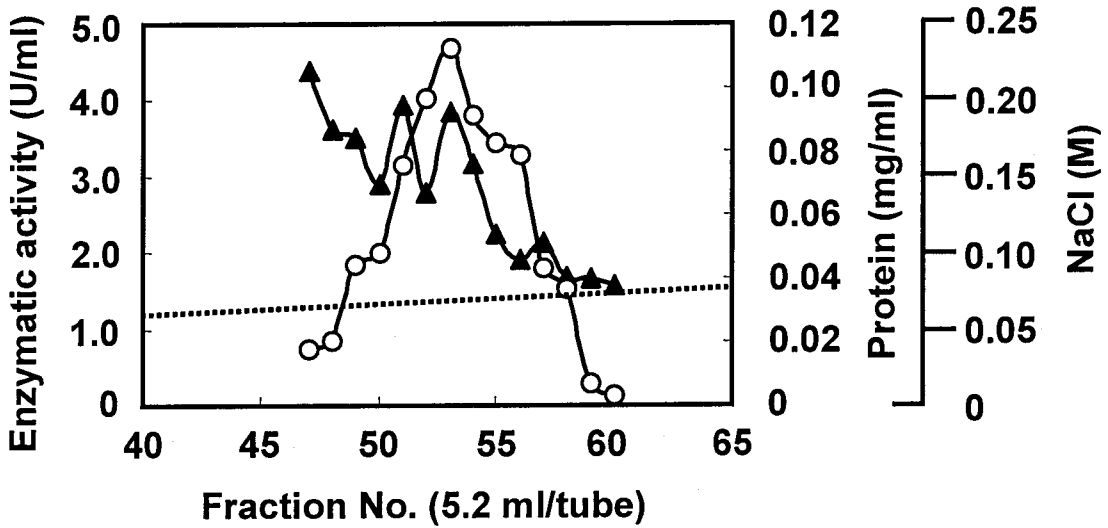


Fig. 4-2. Column chromatography of the enzyme on DEAE-Cellulofine A-800.

The enzyme solution (Fraction 4, 47.6 ml) was applied to a column (1.7×22 cm) of DEAE-Cellulofine A-800 equilibrated with buffer A. The column was washed with buffer A and then enzyme was eluted with a liner gradient (0 to 0.25 M) NaCl in 750 ml of buffer A. Fraction of 5.2 ml were collected at a flow rate of 42 ml·h⁻¹. The protein concentration and enzymatic activities were assayed. Symbols: ○, enzymatic activity; ▲, protein; and -----, NaCl

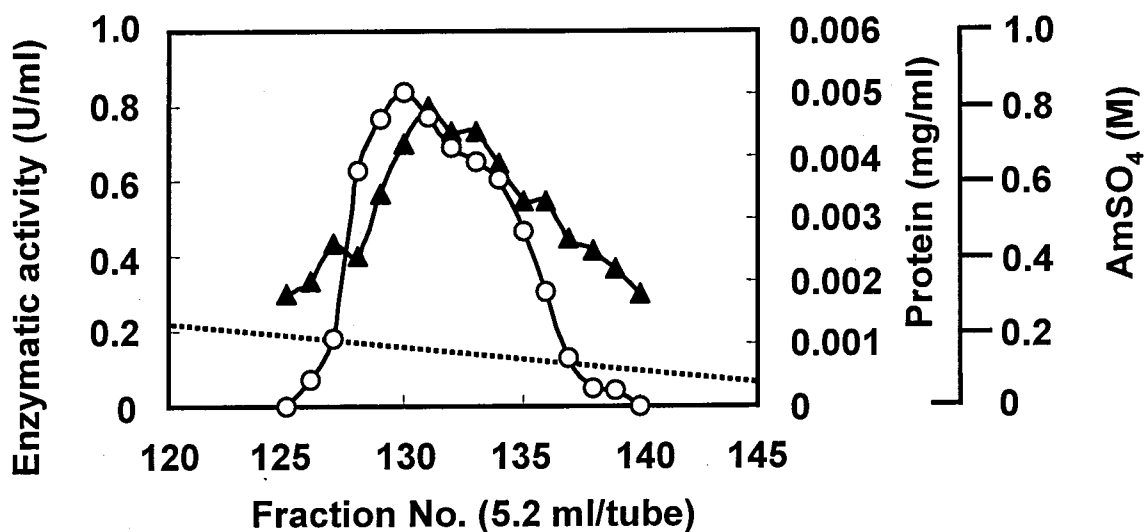


Fig. 4-3. Column chromatography of the enzyme on Phenyl-Cellulofine.

The enzyme solution (Fraction 5, 36.4 ml) was applied to a column (1.7×23.0 cm) of Phenyl-Cellulofine equilibrated with buffer D. The column was washed with buffer D and then enzyme was eluted with a linear gradient (1.0 to 0 M) AmSO₄ in 800 ml of buffer D. Fraction of 5.2 ml were collected at a flow rate of 42 ml·h⁻¹. The protein concentration and enzymatic activities were assayed. Symbols: ○, enzymatic activity; ▲, protein; and ----, AmSO₄.

Table 3-1. Summary of purification.

	Volume (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U·mg ⁻¹)	Recovery (%)
Cell extract	570	1,100	6,000	0.18	100
Streptomycin sulfate	570	960	5,000	0.19	87
Ammonium sulfate	38	670	650	1.0	61
DE52	48	220	40	5.5	20
DEAE-Cellulofine A-800	36	120	2.2	55	11
Phenyl-Cellulofine	31	26	0.14	186	2.0

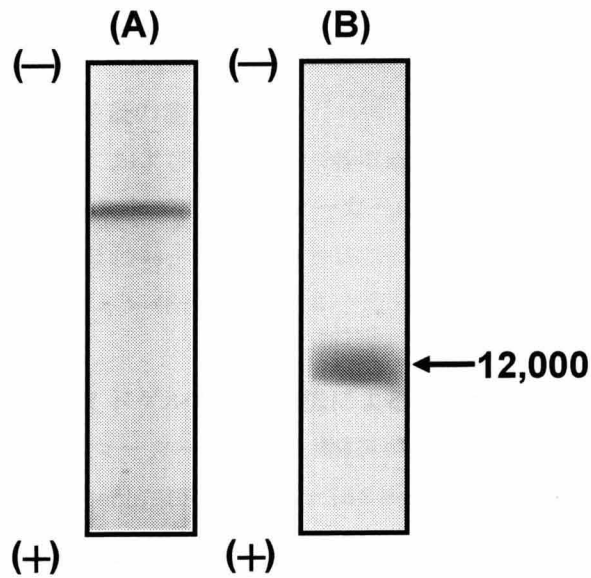


Fig. 4-4. PAGE(A) and SDS-PAGE(B) of the enzyme.

(A) PAGE, the purified enzyme ($10 \mu\text{g}$) was electrophoresed on a 12.5% (w/v) polyacrylamide disc gel (pH 8.0) at 2.0 mA/tube for 2h in a running buffer of Tris-glycine (pH 8.3). (B) SDS-PAGE, the purified enzyme ($10 \mu\text{g}$) denatured with SDS was electrophoresed on a 12.5% (w/v) gel containing 0.1% (w/v) SDS at 6 mA/tube for 3.5 h in a running buffer (pH 7.2) of 0.1% (w/v) SDS-0.1 M sodium phosphate. The gels were stained with 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in a solvent of ethanol-acetic acid- H_2O (9:2:9, v/v/v/).

第3節 精製酵素の特性解析

1. 物理化学的性質

<方法>

(1) ゲル濾過法による分子量の測定

本酵素 1 ml ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) およびマーカー (各 5 mg) を用いて Cellulofine GCL-1000sf (3.2×58 cm) (生化学工業) 上で行った. マーカーは Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany) を使用した. すなわち, チトクローム *c* (分子量, 12,500), オブアルブミン (43,000), ウシ血清アルブミン (67,000), アルドラゼ (160,000), カタラーゼ (240,000) である

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量の測定

第2節の方法に従った. マーカーは, Low Molecular Weight [LMW] Calibration Kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) と Peptide Marker Kit (Amersham Biosciences, USA) を使用した. すなわち, Horse myoglobin peptides (16,949), Horse myoglobin peptides (14,404), Horse myoglobin peptides (10,700, 以上 Peptide Marker Kit), α -ラクトアルブミン (分子量, 14,400), 大豆トリプシンインヒビター (20,100), カルボニックアンヒドラーゼ (30,000), オブアルブミン (43,000), ウシ血清アルブミン (67,000, 以上 Low Molecular Weight [LMW] Calibration Kit) である.

2. pH および温度安定性

(1) pH 安定性

pH 3.0~11.0 の各緩衝液を調製し, 酵素液 0.5ml をそれぞれの緩衝液に対して 24 時間透析した後, 残存する酵素活性を測定した. 50 mM 酢酸-酢酸ナトリウム (pH 3.0~5.5), 50 mM リン酸カリウム-ナトリウム (pH 5.0~8.0), 20 mM Tris-HCl (pH 7.0~9.5) および 50 mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 9.0~11.0) の各緩衝液を用いて行った.

(2) 温度安定性

酵素液を 20°C~70°C の各温度で 10 分間加熱処理した後, 第1章第3節に示した反応液を用いて (Table 1-10), 残存する活性を測定した.

(3) 酵素活性に及ぼす pH の影響

100 mM 酢酸-酢酸ナトリウム (pH 3.0~5.5), 100 mM リン酸カリウム-ナトリウム (pH 5.0~8.0), 100 mM Tris-HCl (pH 7.0~9.5) および 100 mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 9.0~11.0) の各緩衝液を用いて行った.

3. 触媒化学的性質

<方法>

(1) 各種試薬の影響

本酵素に与える金属イオン, -SH 基修飾試薬, キレート試薬等の影響を調べた。酵素液 ($27.4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) 0.5 ml に, 各種試薬の終濃度が 1 mM になるように各種化合物を添加した。氷中で 10 分間放置した後, 活性を測定した。

(2) 酵素活性に与える基質アナログの影響

本酵素に与える基質アナログの影響について調べた。酵素液 ($19 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) 0.3 ml に, 各種基質アナログを終濃度が 0.183 mM になるように添加した。氷中で 10 分間放置した後, 第 1 章第 3 節に従い, 1 分間反応させ, 活性を測定した。試験した化合物は溶液中でケト-エノール体となる有機酸, 2-オキシ酪酸 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{-CO-COOH}$), 2-オキシグルタル酸 ($\text{HOOC-C}_2\text{H}_4\text{-CO-COOH}$, 以上和光純薬, 大阪), 4-メチル-2-オキシ吉草酸 ($\text{CH}_3\text{-(CH}_3\text{)CHCH}_2\text{-CO-COOH}$), 2-ケト- α -吉草酸 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{-CO-COOH}$, 以上東京化成, 東京), 2-オキシペント-4-エン酸²²⁾ ($\text{CH}_2\text{=CHCH(OH)-COOH}$), オキサロ酢酸 ($\text{HOOC-CO-CH}_2\text{-COOH}$, 和光純薬, 大阪) の 6 種類である。

4. 酵素反応速度論

Lineweaver & Burk 法³⁷⁾ により本酵素の K_m 値および V_{max} 値を測定した。

<結果>

1. 分子量

(1) ゲル濾過法による分子量の測定

ゲル濾過法による本酵素の分子量は51,000であった (Fig. 4-5).

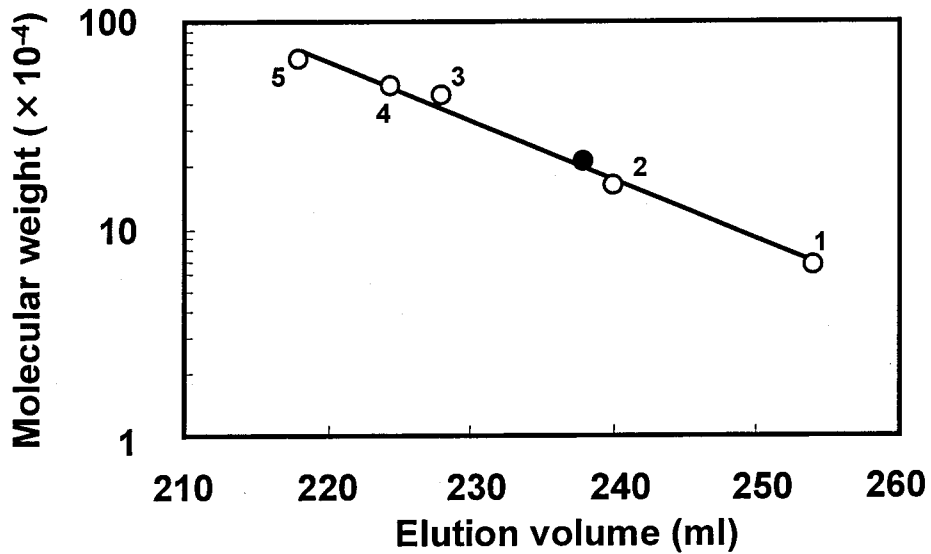


Fig. 4-5. Determination of the molecular weight of 4-Oxalocrotonate tautomerase by gel filtration.

The enzyme (19 unit) and markers (5 μ g each) were placed on the top of a column (3.2 \times 58 cm) of Cellulofine GCL-1000sf, and then eluted with buffer B containing 0.2 M NaCl. Symbols: 1, cytochrom *c* (molecular weight, 12,500); 2, ovalbumin (43,000); 3, bovine serum albumin (67,000); 4, aldolase (158,000); 5, catalase (240,000); and ●, purified enzyme.

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量の測定

SDS 電気泳動では本酵素の分子量は 12,000 であった (Fig. 4-6). ゲル濾過クロマトグラフィーの結果より, 本酵素は, 12,000 のサブユニットからなる 4 量体であると結論した.

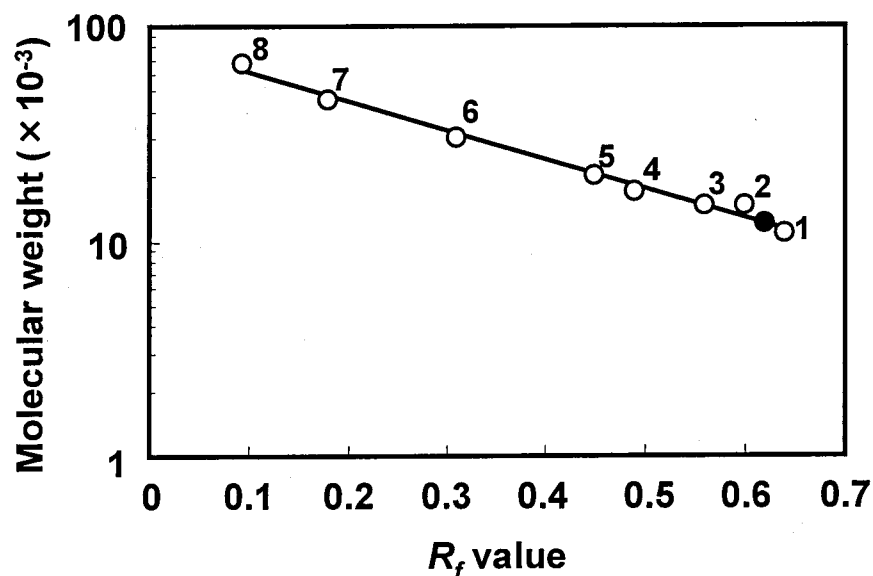


Fig. 4-6. Determination of the molecular weight of 4-Oxalocrotonate tautomerase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The enzyme (10 μ g) denatured with SDS was run on 15.0% gels containing 0.1% SDS at 6 mA/tube for 3.0 h in a running buffer (pH 7.2) of 0.1% SDS-0.1 M sodium phosphate. Electrophoresis calibration kit LMW was used as markers; 1, Horse myoglobin peptides (10,700); 2, α -lactoalbumin (molecular weight, 14,400); 3, Horse myoglobin peptides (14,404); 4, Horse myoglobin peptides (16,949); 5, soybean trypsin inhibitor (20,100); 6, carbonic anhydrase (30,000); 7, ovalbumin (43,000); 8, bovin serum albumin (67,000); and ●, purified enzyme.

2. pH および温度安定性

(1) pH 安定性

本酵素は、50 mM リン酸カリウム-ナトリウム緩衝液および 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0~8.0) で 70%以上の残存活性を示した。また、この pH 範囲内では 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) において最も安定であった。(Fig. 4-7)

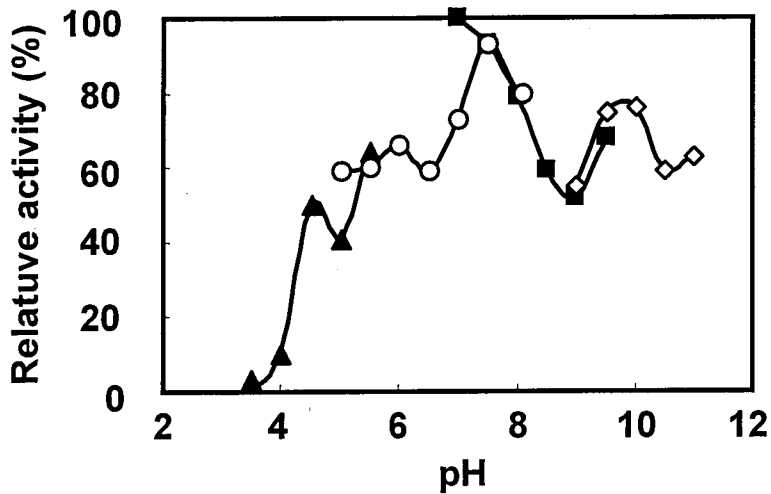


Fig. 4-7. Effect of pHs on the stability of 4-Oxalocrotonate tautomerase.

The enzyme was incubated in 50 or 20 mM buffers of various pHs at 4°C for 24 h, and then the remaining activity was assayed. The buffers used: ▲, acetate; ○, sodium-potassium phosphate; ■, Tris-HCl; and ◇, Na₂CO₃-NaHCO₃.

(2) 温度安定性

本酵素は、65℃までは80%以上の活性を維持した。しかし、それ以上の温度では不安定となり、70℃で69%まで活性が低下した。本酵素は80℃で18%まで失活した(Fig. 4-8)。

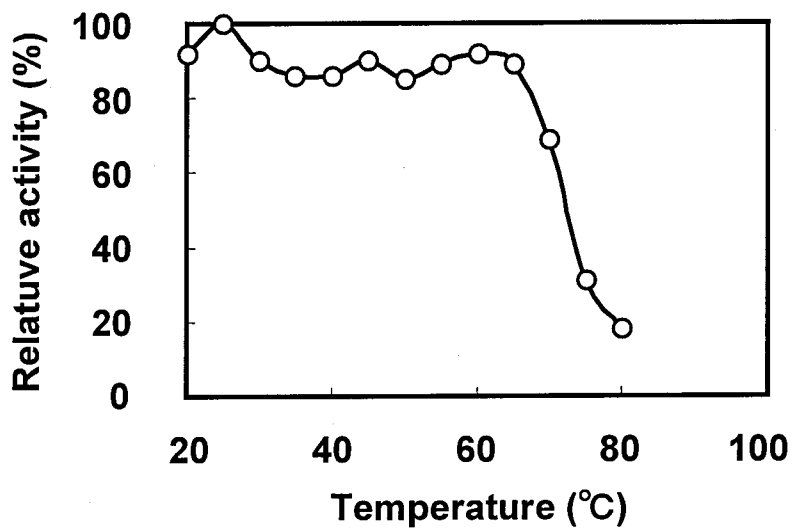


Fig. 4-8. Thermostability of the 4-Oxalocrotonate tautomerase.

The enzyme was incubated at various temperatures for 10 min, and then the remaining activity was assayed.

(3) 酵素活性に及ぼす pH の影響

本酵素は、pH 5.5 において最大活性を示した (Fig. 4-9)。しかし、pH 6.5 で急激に活性が低下した。

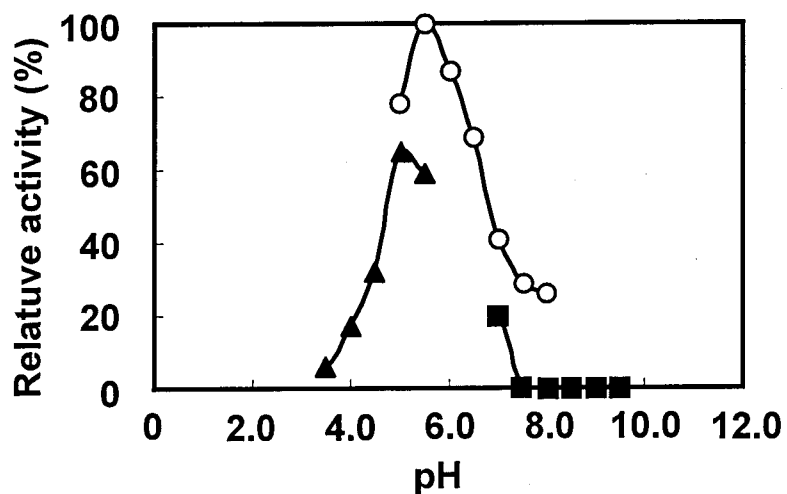


Fig. 4-9. Effect of pHs on 4-Oxalocrotonate tautomerase activity.

The tautomerase was assayed in 100 mM buffer solutions at various pHs. The buffers used were: ▲, acetate; ○, sodium-potassium phosphate and ■, Tris-HCl.

3. 触媒化学的性質

(1) 各種試薬の影響

本酵素の活性に与える各種試薬の影響について検討し, 得られた結果を Table 4-2(A), (B) に示す. 本酵素は金属イオンでは 1 mM の Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 等の 2 価の金属イオン, *p*-クロロメルクリ安息香酸および *N*-エチルマレイミド等の-SH 基修飾試薬, Tiron により強く阻害された.

Table 4-2(A). Effects of various compounds (metal ions) on 4-Oxalocrotonate tautomerase activity for 2-hydroxymuconate.

Compound	Concentration (mM)	Remaining Activity (%)
A) Metal Ions		
None	1.0	100
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	113
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	104
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	1.0	109
AgNO_3	1.0	117
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.3	63
	1.0	97
HgCl_2	1.0	82
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.0	89
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 5\text{H}_2\text{O}$	1.0	45
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	83
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	103
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	55
	0.1	74
LiCl	40	106
	1.0	118
NaCl	40	77
	1.0	88
KCl	40	46
	1.0	94
CaCl_2	33	72
	1.0	100

Table 4-2(B). Effects of various compounds (chelating agents) on 4-Oxalocrotonate tautomerase activity for 2-hydroxymuconate.

Compound	Concentration (mM)	Remaining Activity (%)
B) Sulfhydryl and Chelating Agents		
CH ₂ ICOOH	1.0	5
PCMB ^{a)}	1.0	72
DTNB ^{b)}	1.0	92
α,α' -Dipyridyl	1.0	96
<i>N</i> -Ethylmaleimide	1.0	90
Tiron	1.0	54
EDTA	1.0	105
<i>o</i> -Phenanthroline	1.0	106
NaN ₃	1.0	99

a) PCMB, *p*-chloromercuribenzoic acid.

b) DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid).

(2) 酵素活性に与える基質アナログの影響

酵素活性に与える基質アナログの影響を Table 4-3 に示す. 本酵素は 2-ケト-*n*-吉草酸 ($C_3H_7-CO-COOH$), 2-オキソペント-4-エン酸 ($CH_2=CHCHC(OH)-COOH$), オキサロ酢酸 ($HOCO-CO-CH_2-COOH$) に対して阻害をうけた. また, 本酵素は直鎖型有機酸である 2-オキソ酪酸 ($C_2H_5-CO-COOH$), 2-オキソグルタル酸 ($HOCO-C_2H_4-CO-COOH$) や 4 位で分枝している 4-メチル-2-オキソ吉草酸 ($CH_3-(CH_3)CHCH_2-CO-COOH$) には阻害を受けなかった.

Table 4-3. Effects of substrate analogues on 4-Oxalocrotonate tautomerase activity for of 2-hydroxymuconic acid.

Substrate analogues	Relative activity (%)
None	100
2-Oxobutyric acid ($C_2H_5-CO-COOH$)	104
2-Oxoglutaric acid ($HOCO-C_2H_4-CO-COOH$)	113
4-Methyl-2-oxovaleric acid ($CH_3-(CH_3)CHCH_2-CO-COOH$)	100
α -keto- <i>n</i> -valeric acid ($C_3H_7-CO-COOH$)	68
2-Oxopent-4-enoic acid ($CH_2=CHCHC(OH)-COOH$)	39
Oxaloacetic acid ($HOCO-CO-CH_2-COOH$)	36

(3) 酵素反応速度論

4.69 μM ~14.3 μM の 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを基質として反応を行い, Lineweaver & Burk³⁷⁾ のプロットから K_m および V_{max} はそれぞれ 4.6 μM , 0.44 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot (mg \text{ protein})^{-1}$ であった.

第4節 酵素反応生産物の分離・同定および反応機構の解析

<方法>

1. 酵素反応時におけるUV-VISスペクトルの変化

0.053 mM 2-ヒドロキシムコン酸基質溶液 (100 mM リン酸カリウム-ナトリウム緩衝液, pH 7.0) 3.0 ml に精製酵素 ($55 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 0.02 ml を添加することで開始した。24°C で反応を行い, 1分ごとに吸収スペクトルの変化を測定した。また, 比較として酵素液の代わりに水を用いて同様の反応を行い, 吸収スペクトルの変化を測定した。

<結果>

1. 酵素反応時におけるUV-VISスペクトルの変化

精製酵素 (4-オキサロクロトン酸 タータメラーゼ) を用いた際の酵素反応時における吸収スペクトルの変化を Fig. 4-10 (A) に, 酵素液の代わりに水を添加した際の吸収スペクトルの変化を Fig. 4-10 (B) に示した。精製酵素の添加により反応開始後すぐに2-ヒドロキシムコン酸由来の295 nm の吸光度の減少が見られ, それにともない酵素反応生産物を示す235 nm における吸収の増加が見られた。一方, 酵素液の代わりに水を用いた際も同様のスペクトルの変化が見られた (Fig. 4-10 (B))。しかし, 精製酵素を用いた際は基質由来の295 nm における吸収の減少および反応生産物由来の235 nm における吸収の増加は顕著であった。また, 酵素反応生産物は分光光学的知見より4-オキサロクロトン酸と結論した。

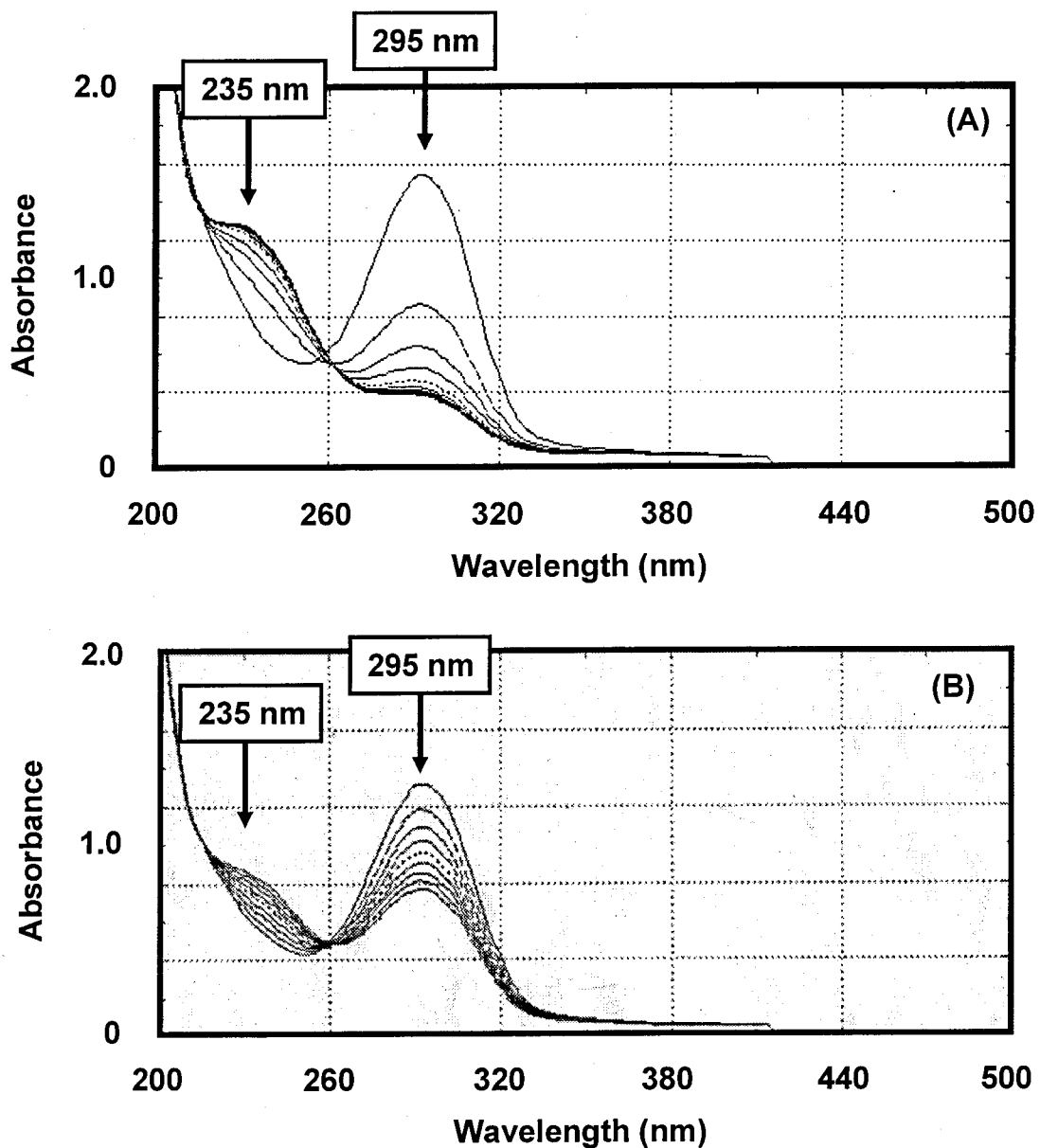


Fig.4-10 (A) Absorption spectra of the tautomerase reaction products formed from 2-hydroxymuconic acid.

The reaction mixture contained of 3.0 ml of 0.053mM 2-hydroxymuconic acid in 100 mM sodium-potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 0.02 ml of purified 4-oxalocrotonate tautomerase ($5.3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). The reaction was started by adding the enzyme solution. After incubation at 24°C, the sample was scanned with a Beckman DU Series 650 spectrophotometer and spectra were recorded every 1 min.

第5節 要約と考察

第1章において見出した4-オキサロクロトン酸 タータメラゼの精製および特性解析、反応機構の解析を行った。2種類の陰イオン交換クロマトグラフィーと疎水クロマトグラフィーを用いて本酵素を単一に精製することが出来た (Fig. 4-4(A), (B))。精製酵素を用いて、酵素化学的諸性質および酵素反応機構を明らかにした。反応機構の解析から、本酵素は2-ヒドロキシムコン酸を4-オキサロクロトン酸へ変換すると結論した。本酵素を *Pseudomonas putida* mt-2 株由来の4-オキサロクロトン酸 イソメラーゼ (タータメラゼ)³⁹⁾、および豚腎臓由来オキサロ酢酸 タータメラゼ⁴⁰⁾ と特性について比較するといくつかの相違が見られた。

2-ヒドロキシムコン酸 (エノール体, $\lambda_{\max}=295$ nm) は、緩衝液中で非酵素的に徐々にケト-エノール体の平衡状態になり、4-オキサロクロトン酸 (ケト体, $\lambda_{\max}=235$ nm) が蓄積する³⁹⁾。しかし、10d 株由来の4-オキサロクロトン酸 タータメラゼが反応溶液中に存在すると2-ヒドロキシムコン酸 (エノール体) から4-オキサロクロトン酸への変換反応が顕著 (Fig. 4-10(A)) となり、同酵素が異性を促進していることがわかった。今回、酵素反応溶液中からケト-エノール異性を分別して機器分析に供することが出来なかった。しかしながら、既報の論文による分光光学的な知見³⁹⁾ から2-ヒドロキシムコン酸は本酵素 4-オキサロクロトン酸 タータメラゼにより4-オキサロクロトン酸に変換されると結論した。

精製した本酵素の分子量はゲル濾過法では51,000、SDS 電気泳動ではサブユニットの分子量が12,000であったことから、本酵素はホモテトラマーであった。本酵素は活性に与える基質アナログの影響において2-ケト-*n*-吉草酸 ($C_3H_7-CO-COOH$), 2-オキソペント-4-エン酸 ($CH_2=CHCH(OH)-COOH$), オキサロ酢酸 ($HOCO-CO-CH_2-COOH$) に対して阻害をうけた。また、本酵素は2価の金属イオンだけでなく、 K^+ および Na^+ 、PCMB、 CH_2ICOOH 等の-SH基修飾試薬、Tironに対しても阻害を受けた。

P. putida mt-2 株由来4-オキサロクロトン酸 イソメラーゼ³⁹⁾ と特性について比較した (Table 4-4)。10d 株由来のタータメラゼと mt-2 株由来のイソメラーゼを比較すると、酵素活性に与える pH の影響、Native およびサブユニットの分子量、各種試薬の影響において相違が見られた。10d 株由来の同酵素はサブユニットの分子量が12,000であるのに対し、mt-2 株由来の同酵素はサブユニットの分子量が3,500と非常に小さい酵素であった。至適 pH においては10d 株由来の同酵素は pH 5.5 (50 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液) で最も高い活性を示したのに対し、mt-2 株由来の同酵素は pH 7.5 (10 mM Tris-HCl 緩衝液) および pH 6.5 (10 mM MOPS-NaOH 緩衝液) でもっとも高い活性を示した。10d 株由来の同酵素は2価の金属イオン類、 K^+ 、 Na^+ 、および PCMB、 CH_2ICOOH 等の-SH基修飾試薬、Tiron に対して阻害を受けたのに対し、mt-2 株由来の同酵素は3.3 mM Mg^{2+} 、33 mM Ca^{2+} などの金属イオン類にそれぞれ27.2%、19.1%の阻害を受けた³⁹⁾。次に、ケト酸の異性化反応を触媒する酵素として豚腎臓由来のオキサロ酢酸 タータメラゼと

比較した⁴⁰⁾。各種試薬の影響において豚腎臓由来の同酵素は 40 mM Na⁺, 0.01 mM Cu²⁺, 0.1 mM Zn²⁺, 0.04 mM Mg²⁺に阻害を受け, 0.4 mM Ca²⁺, 0.01 mM Co²⁺, 0.04 mM Mn²⁺により活性化された。10d 株由来の同酵素は金属イオンによる活性化を受けなかった点で相違が見られたが, 阻害を受ける金属イオンおよび-SH 基修飾試薬による阻害において類似していた。

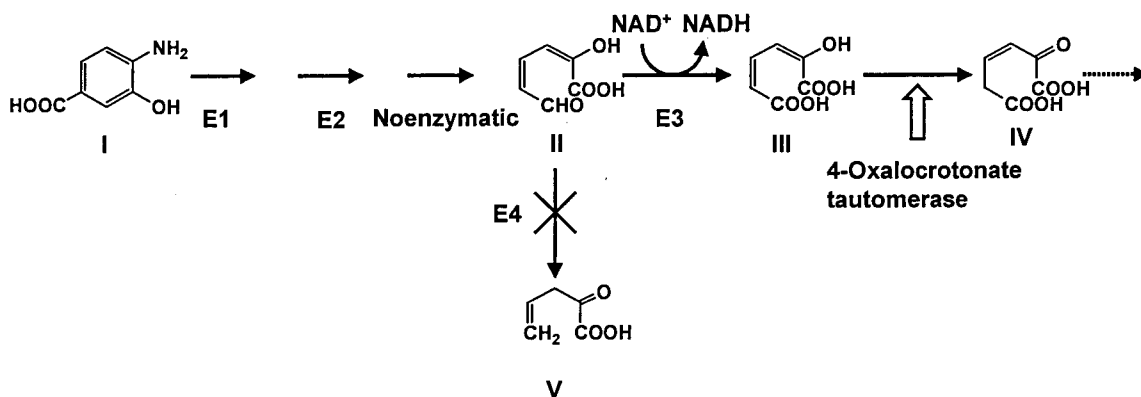


Fig. 4-11. Proposed pathway of 2-hydroxymuconic acid metabolism in *Bordetella* sp. strain 10d.

I, 4-amino-3-hydroxybenzoic acid; II, 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde; III, 2-hydroxymuconic acid; IV, 4-oxalocrotonic acid; V, 2-oxopent-4-enoic acid; E1, 4-amino-3-hydroxybenzoate 2,3-dioxygenase¹⁶⁾; E2, 2-amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde deaminase¹⁹⁾; E3, 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde dehydrogenase; E4, 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde hydrolase.

Table 4-4. Comparison of tautomerase.

	4-Oxalocrotonate tautomerase	4-Oxalocrotonate isomerase ³⁹⁾ (tautomerase)	Oxalacetate keto-enol tautomerase ⁴⁰⁾
Strain	<i>Bordetella</i> sp. 10d	<i>Pseudomonas putida</i> . Mt-2	Porcine kidney
Molecular weight			
Native enzyme	51,000	28,000	55,000
Subunit	12,000	3,500	N. A.
Thermostability	~65°C	N. A.	~35°C
pH stability	7.0-8.0	N. A.	4.0-8.0
Optimal pH	5.5 ^{a)}	6.5 ^{b)} 7.5 ^{c)}	N. A.
Effects of reagents	Mn ²⁺ (45%) Zn ²⁺ (55%) Mg ²⁺ (63%) K ⁺ (46%) PCMB (72%) CH ₂ ICOOH (5%) Tiron (54%)	Mg ²⁺ (30%) Ca ²⁺ (20%) K ⁺ (50%) Na ⁺ (30%)	Li ⁺ (67.6%) Na ⁺ (37.8%) K ⁺ (80.6%) Ca ²⁺ (178.3%) Co ²⁺ (129.7%) Mn ²⁺ (137.0%) Cu ²⁺ (37.8%) Mg ²⁺ (59.3%) Zn ²⁺ (48.7%) Hg ²⁺ (16.1%) PCMB (24.0%)

a) 50 mM Sodium potassium-phosphate buffer

b) 10 mM Tris-HCl buffer

c) 10 mM MOPS-NaOH buffer

第5章 *Bordetella* sp. 10dの生産する4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼ および2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼの精製および特性解析

第1節 序

第4章において2-ヒドロキシムコン酸は4-オキサロクロトン酸タータメラゼにより4-オキサロクロトン酸に代謝されることを明らかにした。また、第1章において10d株の無細胞抽出液より Mg^{2+} 依存型4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼ(40D)および2-オキソペント-4-エン酸ハイドラターゼ(OEH)活性を見いだした。既報のデカルボキシラーゼおよびハイドラターゼ^{11, 39)}は酵素複合体を形成している。よって、10d株においても同様のことが予想される。そこで第5章では、酵素精製の各段階において4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼおよび2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼの両酵素活性を測定する。両酵素を精製し、それらの特性解析および反応機構を明らかにすることを目的とする。また、得られた精製酵素を用いて酵素化学的諸性質や酵素反応機構の解析を行う。さらに、芳香族化合物代謝に関与する既報のデカルボキシラーゼおよびハイドラターゼ複合酵素と比較する。

第2節 酵素の精製

1. 酵素活性測定法

基質(4-オキサロクロトン酸および2-オキソペント-4-エン酸)の合成^{21, 22)}および酵素活性測定は第1章第3節に従った(Table 1-12, 13)。酵素活性は第1章第3節で定義した酵素単位より算出した。

2. 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地での培養

本菌の培養方法は第1章第2節の方法に従った。

3. 酵素の精製

酵素精製におけるすべての操作は4℃以下で行った。遠心分離は全て、20,000×g, 10分間の条件で行った。

(1) 無細胞抽出液の調製

培養液14.4 Lから10d株の菌体を50 g得た(湿菌体)。湿菌体1 gあたり10 mlの20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0, buffer A)を加えて懸濁し、第2章第2節の方法に従い、無細胞抽出液を得た。(Fraction 1, 500 ml)

(2) 除核酸操作

無細胞抽出液に、20% (w/v) 硫酸ストレプトマイシン溶液を終濃度が1% (w/v) となるように攪拌しながら添加した。30分間攪拌した後、遠心分離により沈殿した核酸を除き、上清を得た。(Fraction 2, 520 ml)

(3) 硫安分画

Fraction 2に、摩砕硫安を35%飽和になるように攪拌しながら加えた。30分間攪拌後、

遠心分離により沈殿を除去した。得られた上清に硫酸を 55%飽和となるように加え、30 分間攪拌後、遠心分離により沈殿を回収した。沈殿を buffer A 30 ml に溶解した後、buffer A 1L に対して透析した。3 時間おきに 2 度透析外液を交換し、一晚透析した。
(Fraction 3, 58.0 ml)

(4) DE52 カラムクロマトグラフィー

Fraction 3 を buffer A にて平衡化した DE52 (Whatman International Ltd., Maidstone, England) を充填したカラム (2.1×21.0 cm) にアプライした。230 ml の buffer A でカラムを洗浄した後、0~0.4 M NaCl を含む 1100 ml の buffer A を用いてリニアグラジエント法により、流速 42 ml·h⁻¹ で酵素を溶出した。各フラクション (7.0 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した。高活性画分を集め buffer A に対して一晚透析を行った。(Fraction 4, 56.0 ml)

(5) DEAE-Cellulofine カラムクロマトグラフィー 1st

Fraction 4 を buffer A にて平衡化した DEAE-Cellulofine A-800 (生化学工業, 東京) を充填したカラム (2.1×19.0 cm) にアプライした。200 ml の buffer A でカラムを洗浄した後、0~0.35 M NaCl を含む 980 ml の buffer A を用いたリニアグラジエント法により、流速 42 ml·h⁻¹ で酵素を溶出した。高活性画分を集め 20 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液 (pH 6.5, buffer B) に対して 3 時間おきに 1 度透析外液を交換後、一晚透析して buffer 交換をした。各フラクション (7.0 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した。(Fraction 5, 42.0 ml)

(6) DEAE-Cellulofine カラムクロマトグラフィー 2nd

Fraction 5 を buffer B にて平衡化した DEAE-Cellulofine A-800 (生化学工業, 東京) を充填したカラム (2.1×15.0 cm) にアプライした。200 ml の buffer B でカラムを洗浄した後、0~0.35 M NaCl を含む 780 ml の buffer B を用いたリニアグラジエント法により、流速 42 ml·h⁻¹ で酵素を溶出した。高活性画分を集め buffer B に対して 3 時間おきに 1 度透析外液を交換後、一晚透析を行った。各フラクション (5.5 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した。(Fraction 6, 38.5 ml)

(7) DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィー 1st

Fraction 6 を buffer B を用いて平衡化した DEAE-Toyopearl 650S (東ソー, 東京) を充填したカラム (2.1×15.0 cm) にアプライした。160 ml の buffer B でカラムを洗浄した後、0~0.35 M NaCl を含む 780 ml の buffer B を用いてリニアグラジエント法により、流速 42 ml·h⁻¹ で酵素を溶出した。各フラクション (5.5 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した。(Fraction 7, 27.5ml)

(8) DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィー 2nd

Fraction 7 を buffer B を用いて平衡化した Phenyl-Cellulofine (生化学工業, 東京) を充填したカラム (1.6×15.0 cm) にアプライした。90 ml の buffer B でカラムを洗浄した後、0~0.3 M NaCl を含む 450 ml の buffer D を用いてリニアグラジエント法により、

流速 $42 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ で酵素を溶出した。各フラクション (3.5 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質量を測定した。(Fraction 8, 17.5 ml)

4. タンパク質の定量

タンパク質は Lowry 法により定量した²⁴⁾。標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。

5. 電気泳動

(1) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

第2章第3節に述べたように Davis らの方法²⁵⁾ に従い、精製酵素の純度を検討した。

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

第2章第3節に述べたように Weber と Osborn の方法²⁶⁾ に精製酵素の純度を検討した。

<結果>

1. 酵素の精製

各精製段階における酵素活性およびタンパク質量を Table 5-1 に示す。硫安分画について DE52 カラムクロマトグラフィー (Fig. 5-1 (A), (B)), DEAE-Cellulofine A-800 カラムクロマトグラフィー1st (Fig. 5-2 (A), (B)), DEAE-Cellulofine A-800 カラムクロマトグラフィー2nd (Fig. 5-3 (A), (B)), DEAE-Toyopearl 650S カラムクロマトグラフィー1st (Fig. 5-4 (A), (B)), DEAE-Toyopearl 650S カラムクロマトグラフィー2nd (Fig. 5-5 (A), (B)), に供した。条件の異なる 5 種類のカラムクロマトグラフィーにおいて同じ画分にデカルボキシラーゼおよびヒドロラーゼ活性が見られた。また、両酵素ともに活性の発現には Mg^{2+} を要求した。最終精製酵素を Native-PAGE に供すると 1 本のメインバンドと 1 本のマイナーバンドが見られた。一方、SDS-PAGE において明瞭な 2 本のバンドが見られた (Fig. 5-6 (A), (B))。

4-オキサロクロトン酸デカルボキシラーゼは最終精製段階において 3.1% の収率で 450 倍に精製され、比活性は $18 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ であった (Table 5-1)。2-オキソペント-4-エン酸ヒドロラーゼは最終精製段階において 3.6% の収率で 490 倍に精製され、比活性は $39 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ であった (Table 5-1)。

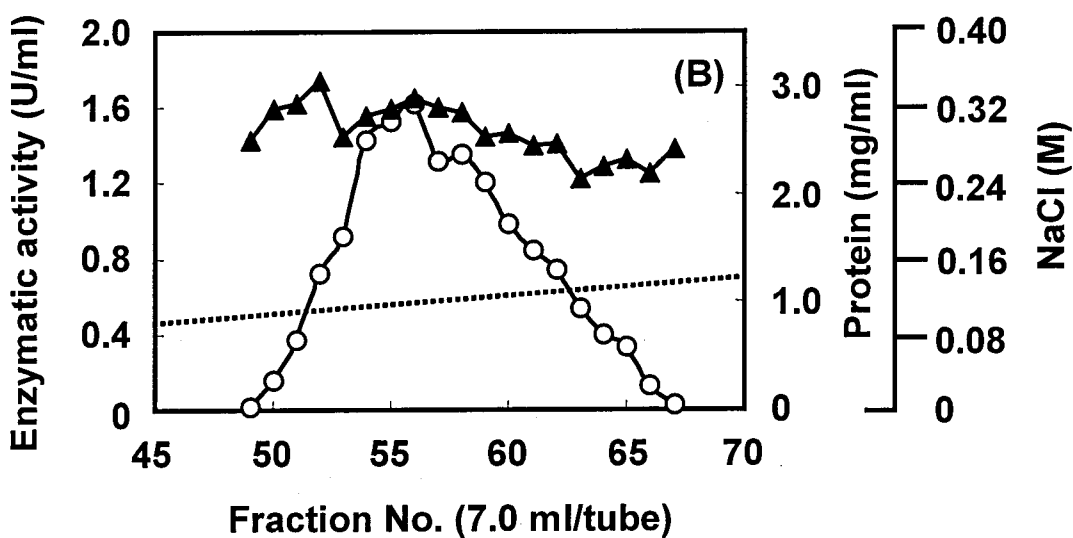
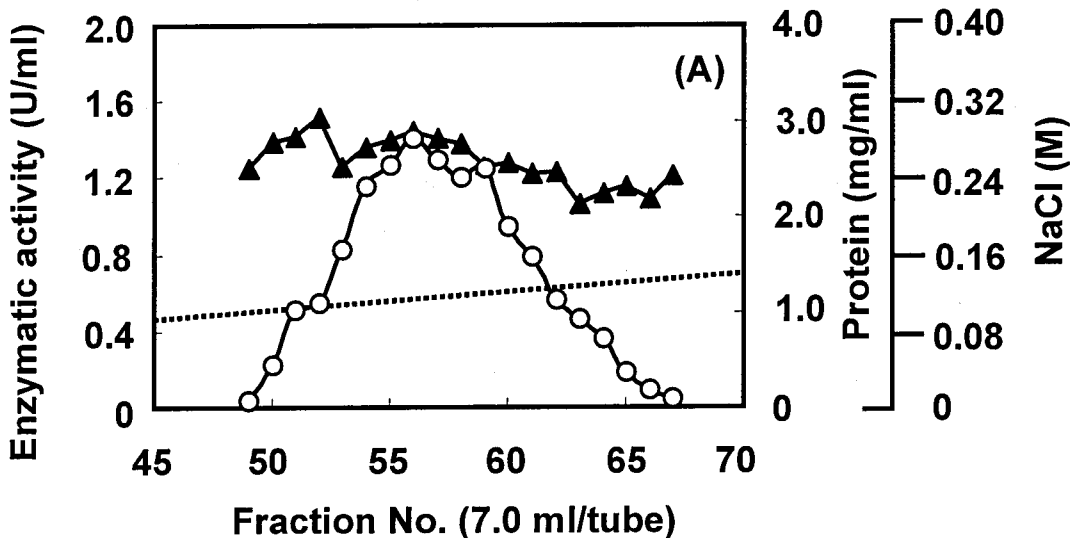


Fig. 5-1. Column chromatography of the enzyme on DE52 cellulose.

The enzyme solution (Fraction 3, 58.0 ml) was applied to a column (2.1×21.0 cm) of DE52 equilibrated with buffer A. The column was washed with buffer A and then proteins were eluted with a linear gradient (0 to 0.4 M) NaCl in 1100 ml of buffer A. Fraction of 7.0 ml were collected at a flow rate of 42 ml·h⁻¹. The protein concentration and enzymatic activities (4-Oxalocrotonate decarboxylase activity (A) and 2-oxopent-4-enoate hydratase activity (B)) were assayed. Symbols: ○, enzymatic activity; ▲, protein; and ----, NaCl.

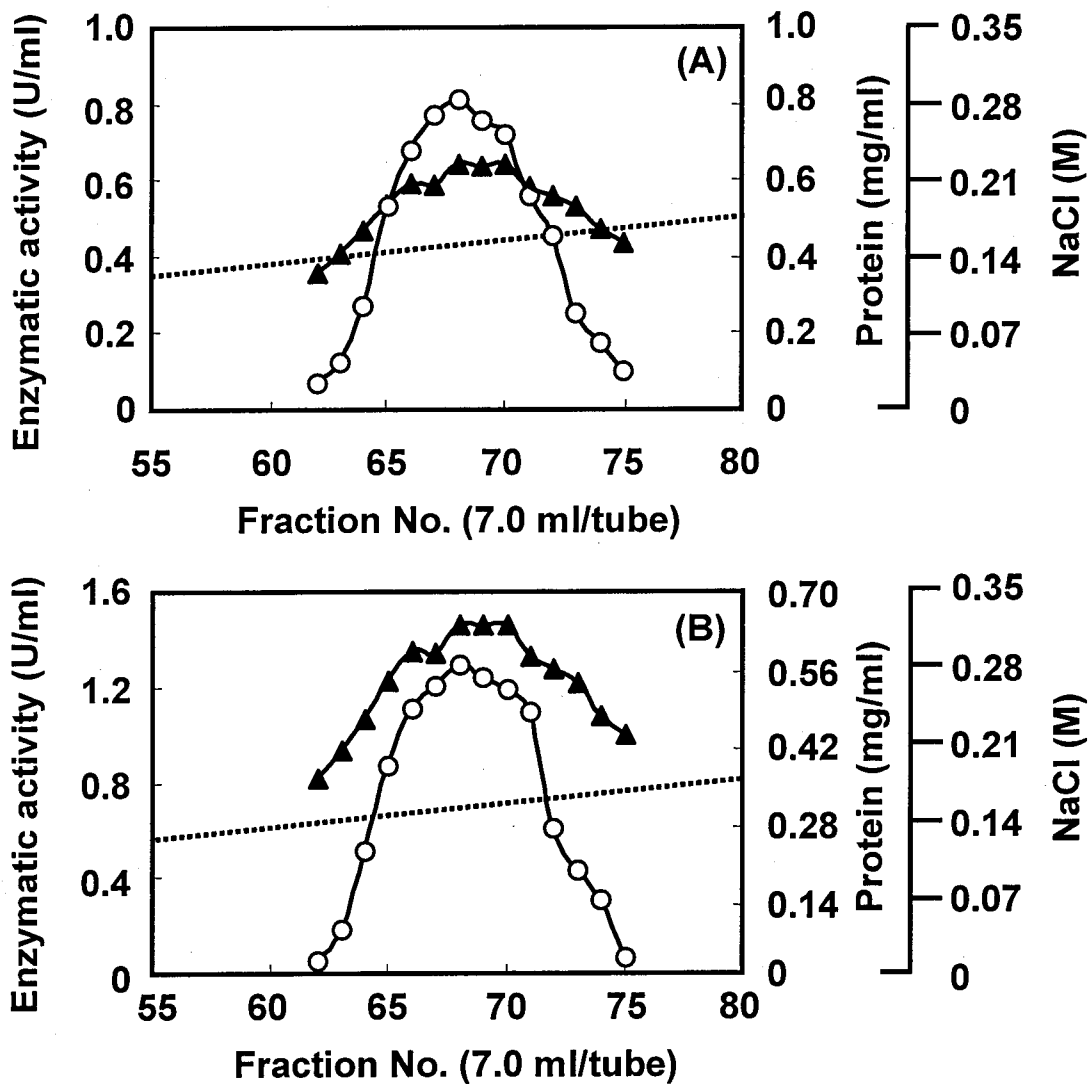


Fig. 5-2 (A), (B). Column chromatography of the enzyme on DEAE-Cellulofine A-800 1st.

The enzyme solution (Fraction 4, 56.0 ml) was applied to a column (2.1×19.0 cm) of DEAE-Cellulofine A-800 equilibrated with buffer A. The column was washed with buffer A and then enzyme was eluted with a liner gradient (0 to 0.35 M) NaCl in 980 ml of buffer A. Fraction of 7.0 ml were collected at a flow rate of 42 ml·h⁻¹. The protein concentration and enzymatic activities (4-Oxalocrotonate decarboxylase activity (A) and 2-oxopent-4-enoate hydratase activity (B)) were assayed. Symbols: ○, enzymatic activity; ▲, protein; and ----, NaCl

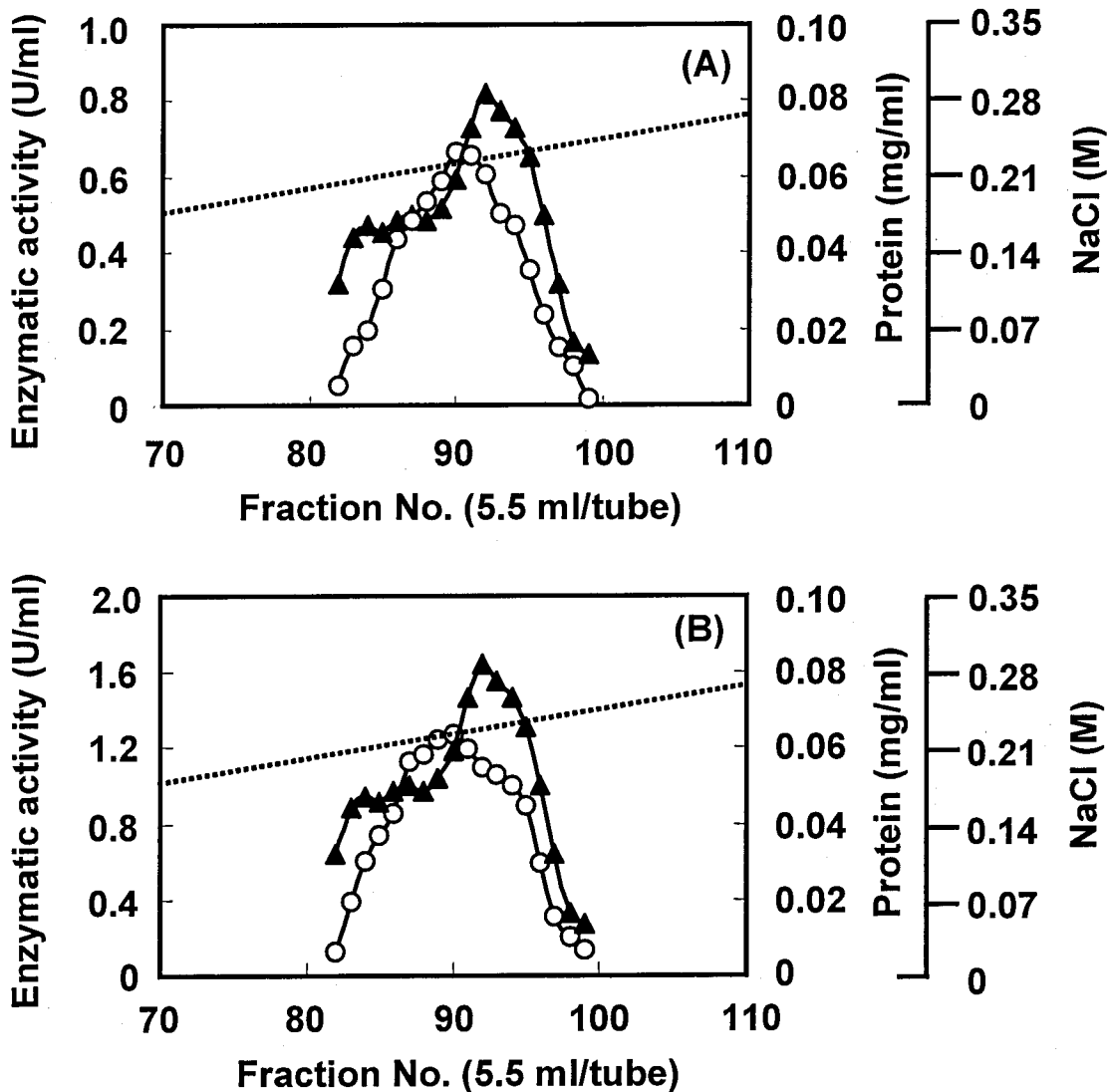


Fig. 5-3 (A), (B). Column chromatography of the enzyme on DEAE-Cellulofine A-800 2nd.

The enzyme solution (Fraction 5, 42.0 ml) was applied to a column (2.1×15.0 cm) of DEAE-Cellulofine A-800 equilibrated with buffer B. The column was washed with buffer B and then enzyme was eluted with a linear gradient (0 to 0.35 M) NaCl in 780 ml of buffer B. Fraction of 5.5 ml were collected at a flow rate of 42 ml·h⁻¹. The protein concentration and enzymatic activities (4-Oxalocrotonate decarboxylase activity (A) and 2-oxopent-4-enoate hydratase activity (B)) were assayed. Symbols: ○, enzymatic activity; ▲, protein; and ----, NaCl

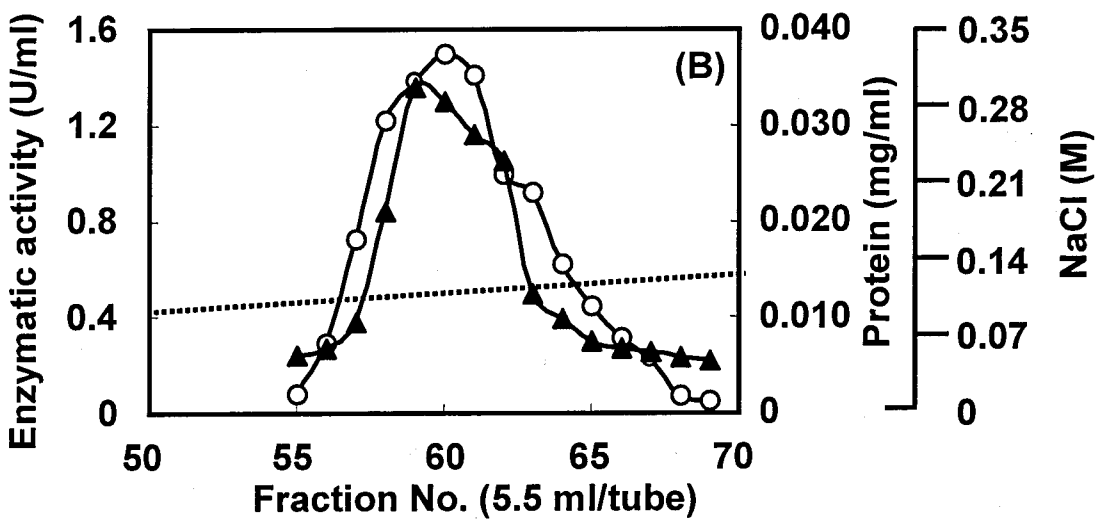
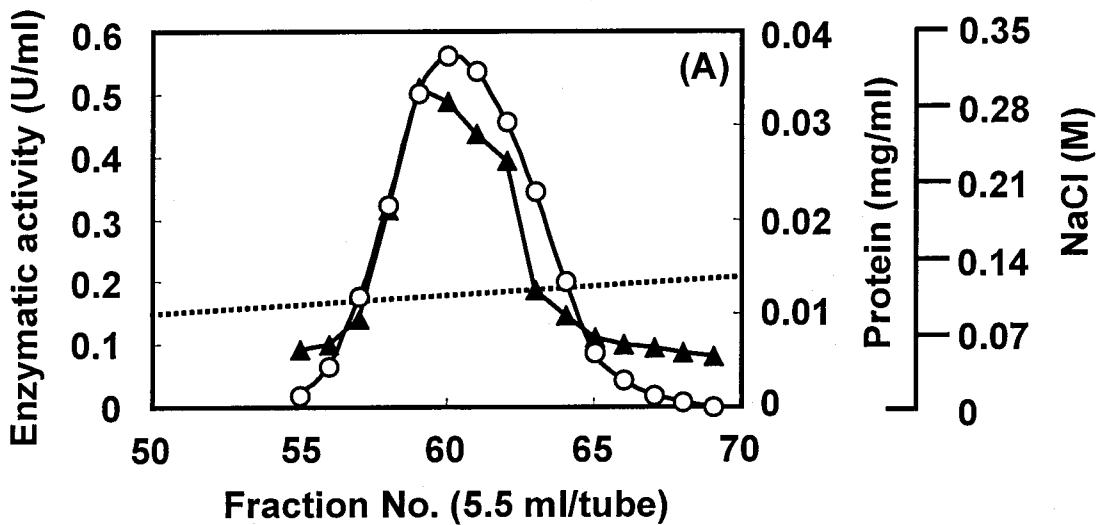


Fig. 5-4 (A), (B). Column chromatography of the enzyme on DEAE-Toyopearl 650S 1st.

The enzyme solution (Fraction 6, 38.5 ml) was applied to a column (2.1×15.0 cm) of DEAE-Toyopearl 650S equilibrated with buffer B. The column was washed with buffer B and then enzyme was eluted with a linear gradient (0 to 0.35 M) NaCl in 780 ml of buffer B. Fraction of 5.5 ml were collected at a flow rate of $42 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. The protein concentration and enzymatic activities (4-Oxalocrotonate decarboxylase activity (A) and 2-oxopent-4-enoate hydratase activity (B)) were assayed. Symbols: \circ , enzymatic activity; \blacktriangle , protein; and ----, NaCl

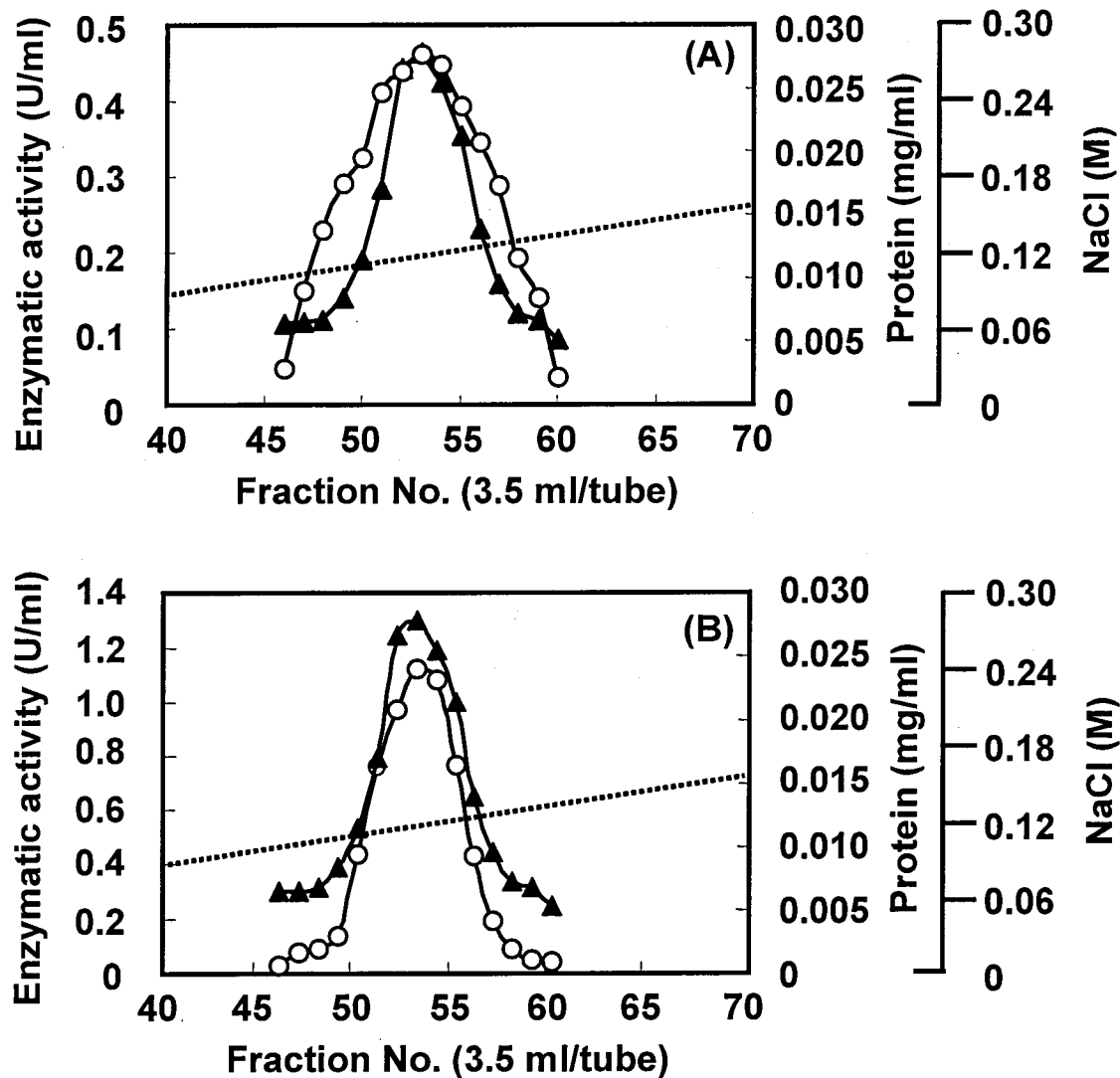


Fig. 5-5 (A), (B). Column chromatography of the enzyme on DEAE-Toyopearl 650S 2nd.

The enzyme solution (Fraction 7, 27.5 ml) was applied to a column (1.6×15.0 cm) of DEAE-Toyopearl 650S equilibrated with buffer B. The column was washed with buffer B and then enzyme was eluted with a liner gradient (0 to 0.30 M) NaCl in 450 ml of buffer B. Fraction of 3.5 ml were collected at a flow rate of 42 ml·h⁻¹. The protein concentration and enzymatic activities (4-Oxalocrotonate decarboxylase activity (A) and 2-oxopent-4-enoate hydratase activity (B)) were assayed. Symbols: ○, enzymatic activity; ▲, protein; and -----, NaCl

Table 5-1. Summary of purification.

Fraction	Volume (ml)	Total activity (U)		Total protein (mg)	Specific activity (U·mg ⁻¹)		Recovery (%)	
		40D	OEH		40D	OEH	40D	OEH
1: Cell extract	500	240	440	5,400	0.04	0.08	100	100
2: Streptomycin sulfate	520	170	290	5,000	0.03	0.06	71	66
3: Ammonium sulfate	58	150	140	1,100	0.14	0.13	63	32
4: DE52	56	66	72	150	0.44	0.48	28	16
5: DEAE-Cellulofine 1st	42	30	50	26	1.2	1.9	13	11
6: DEAE-Cellulofine 2nd	39	22	45	2.4	9.2	19	9.2	10
7: DEAE-Toyopearl 1st	28	13	36	1.0	13	36	5.4	8.2
8: DEAE-Toyopearl 2nd	18	7.5	16	0.41	18	39	3.1	3.6

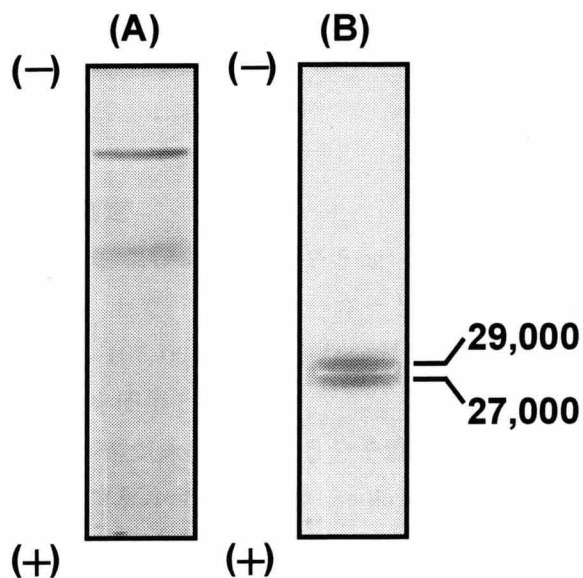


Fig. 5-6. PAGE (A) and SDS-PAGE (B) of the enzymes.

(A) PAGE, the purified enzyme ($10 \mu\text{g}$) was electrophoresed on a 7.5% (w/v) polyacrylamide disc gel (pH 8.0) at 2.0 mA/tube for 2h in a running buffer of Tris-glycine (pH 8.3). (B) SDS-PAGE, the purified enzyme ($10 \mu\text{g}$) denatured with SDS was electrophoresed on a 7.5% (w/v) gel containing 0.1% (w/v) SDS at 6 mA/tube for 3.5 h in a running buffer (pH 7.2) of 0.1% (w/v) SDS-0.1 M sodium phosphate. The gels were stained with 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in a solvent of ethanol-acetic acid- H_2O (9:2:9, v/v/v/).

第3節 精製酵素の特性解析

1. 物理化学的性質

<方法>

1. ゲル濾過法による分子量の測定

精製酵素 1 ml ($0.144 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) およびマーカー (各 5 mg) を用いて Cellulofine GCL-1000sf ($3.2 \times 58 \text{ cm}$) (生化学工業) 上で行った。マーカーとして、チトクローム *c* (分子量, 12,500), ウシ血清アルブミン (67,000), アルドラーゼ (160,000), フェリチン (440,000), チログロブリン (660,000) を使用した。

2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量の測定

第2章2節の方法によった。ファルマシア社製 Low Molecular Weight [LMW] Calibration Kit を分子量マーカーとして使用した。

3. N末端アミノ酸配列の分析

第2章第4節の方法によった。スラブゲル電気泳動後、本酵素をイモビロン-P⁵⁰膜 (ミリポア, 東京) に転移した。PVDF膜上で染色した酵素を膜ごと切り出し、N末端配列の分析に用いた。

4. pH および温度安定性

(1) pH 安定性

pH 3.0~11.0 の各緩衝液を調製し、酵素液をそれぞれの緩衝液に対して 24 時間透析した後、残存する酵素活性を測定した。50 mM 酢酸-酢酸ナトリウム (pH 3.0~5.5), 50 mM リン酸カリウム-ナトリウム (pH 5.0~8.0), 20 mM Tris-HCl (pH 7.0~9.5) および 50 mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 9.0~11.0) の各緩衝液を用いて行った。

(2) 温度安定性

酵素液を 20°C~70°C の各温度で 10 分間加熱処理した後、第1章第3節に示した反応液を用いて (Table 1-10), 残存する活性を測定した。

(3) 酵素活性に及ぼす pH の影響

100 mM 酢酸-酢酸ナトリウム (pH 3.0~5.5), 100 mM リン酸カリウム-ナトリウム (pH 5.0~8.0), 100 mM Tris-HCl (pH 7.0~9.5) および 100 mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 9.0~11.0) の各緩衝液を用いて行った。

(4) 酵素活性に及ぼす温度の影響

酵素活性測定時の温度を 10~70°C の各温度で変化させて行った。

5. 触媒化学的性質

<方法>

(1) 各種試薬の影響

本酵素に与える金属イオン, -SH 基修飾試薬, キレート試薬等の影響を調べた。酵素液 ($0.168 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 0.5 ml に、各種試薬の終濃度が 1 mM になるように各種化合物を添加した。氷中で 10 分間放置した後、活性を測定した。

6. 酵素反応速度論

Lineweaver & Burk 法³⁷⁾により本酵素の K_m 値および V_{max} 値を測定した.

<結果>

1. 分子量

(1) ゲル濾過法による分子量の測定

ゲル濾過法による本酵素の分子量は 470,000 であった (Fig. 5-7).

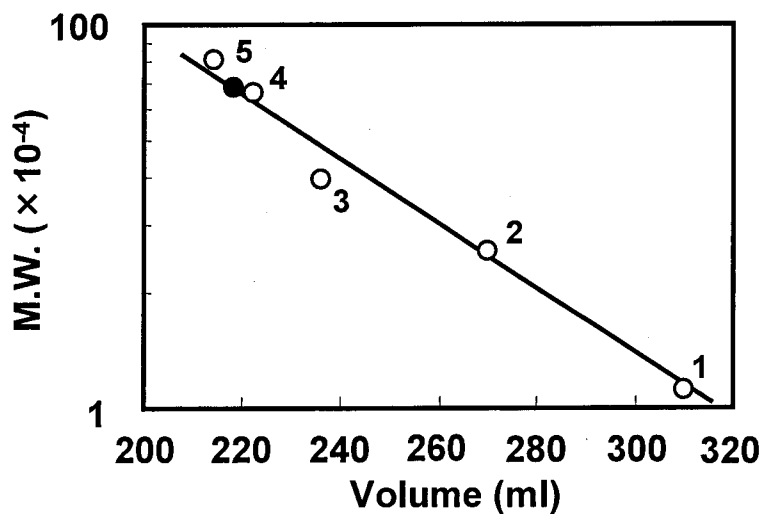


Fig. 5-7. Determination of the molecular weight of enzyme complexes by gel filtration.

The enzyme (0.144 mg) and markers (5 μ g each) were placed on the top of a column (3.2 \times 58 cm) of Cellulofine GCL-1000sf, and then eluted with buffer B containing 0.2 M NaCl. Symbols: 1, cytochrom *c* (molecular weight, 12,500); 2, bovine serum albumin (67,000); 3, aldolase (158,000); 4, ferritin (440,000); 5, thyroglobulin (660,000); and ●, purified enzyme.

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量の測定

SDS 電気泳動では本酵素の分子量は 29,000 と 27,000 であった (Fig. 5-8). ゲル濾過クロマトグラフィーおよび Native-PAGE, SDS-PAGE の結果より, 本酵素は, 29,000 と 27,000 のサブユニットからなる複合酵素であると結論した.

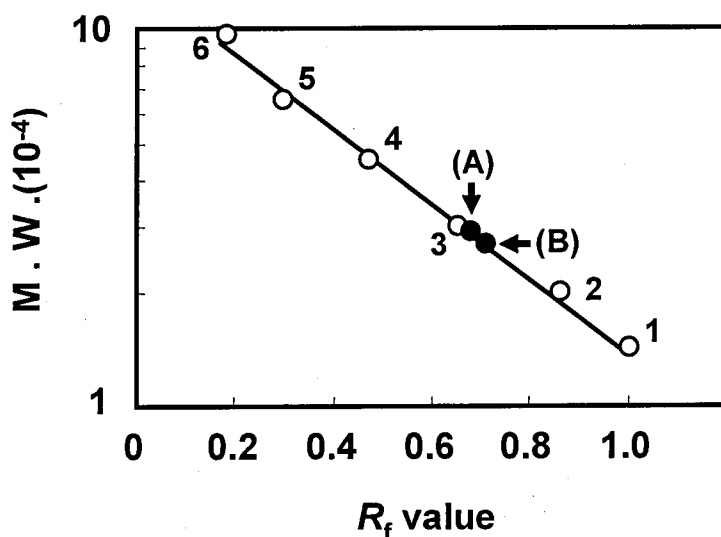


Fig. 5-8. Determination of the molecular weight of enzyme complexes by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The enzyme (10 μ g) denatured with SDS was run on 7.5% gels containing 0.1% SDS at 6 mA/tube for 3.0 h in a running buffer (pH 7.2) of 0.1% SDS-0.1 M sodium phosphate. Electrophoresis calibration kit LMW was used as markers; 1, α -lactoalbumin (molecular weight, 14,400); 2, soybean trypsin inhibitor (20,100); 3, carbonic anhydrase (30,000); 4, ovalbumin (43,000); 5, bovin serum albumin (67,000); 6, phosphorylase *b* (94,000); \bullet , purified enzyme subunit (A); and \blacktriangle , purified enzyme subunit (B).

2. N末端アミノ酸配列

Fig. 5-9 に本酵素のサブユニットの N 末端アミノ酸配列を示した.

Fig.5-9. NH₂-terminal amino acid sequencing of subunits.

Subunit (A): 29,000

No. 1 10 20
Y L E A K V I Q A L A V A L D I X E M N E V

Subunit (B): 27,000

No. 1 10 20
M D D K K I Q Q Y G D A L Y E A L V E R A

3. pHおよび温度安定性

(1) pH安定性

4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼは 50 mM リン酸カリウム-ナトリウム緩衝液 (pH 6.5~8.0) で 70%以上の残存活性を示した. また, この pH 範囲内では同緩衝液 (pH 6.5) において最も安定であった (Fig. 5-10 (A)).

2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼは 50 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5~5.5), 50 mM リン酸カリウム-ナトリウム緩衝液 (pH 5.0~7.5) で 80%以上の残存活性を示した. また, この pH 範囲内では 50 mM リン酸カリウム-ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) において最も安定であった (Fig. 5-10 (B)).

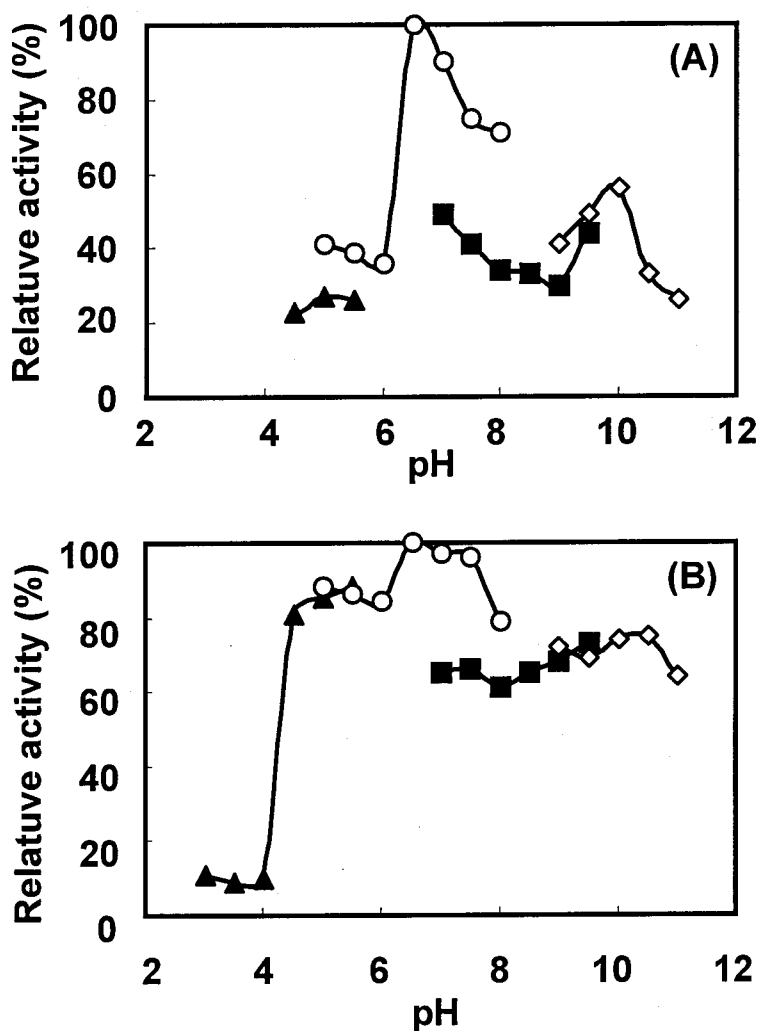


Fig. 5-10. Effect of pHs on the stability of enzyme complexes.

The purified enzymes ((A) 4-oxalocrotonate decarboxylase and (B) 2-oxopent-4-enoate hydratase) was incubated in 50 or 20 mM buffers of various pHs at 4°C for 24 h, and then the remaining activity was assayed. The buffers used: ▲, acetate; ○, sodium-potassium phosphate; ■, Tris-HCl; and ◇, Na₂CO₃-NaHCO₃.

(2) 温度安定性

4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼおよび 2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼともに 65°Cまでは90%以上の活性を維持した。しかし、それ以上の温度では不安定となり、70°Cで20%まで活性が低下した。本酵素は75°Cで完全に失活した (Fig. 5-11 (A), (B)).

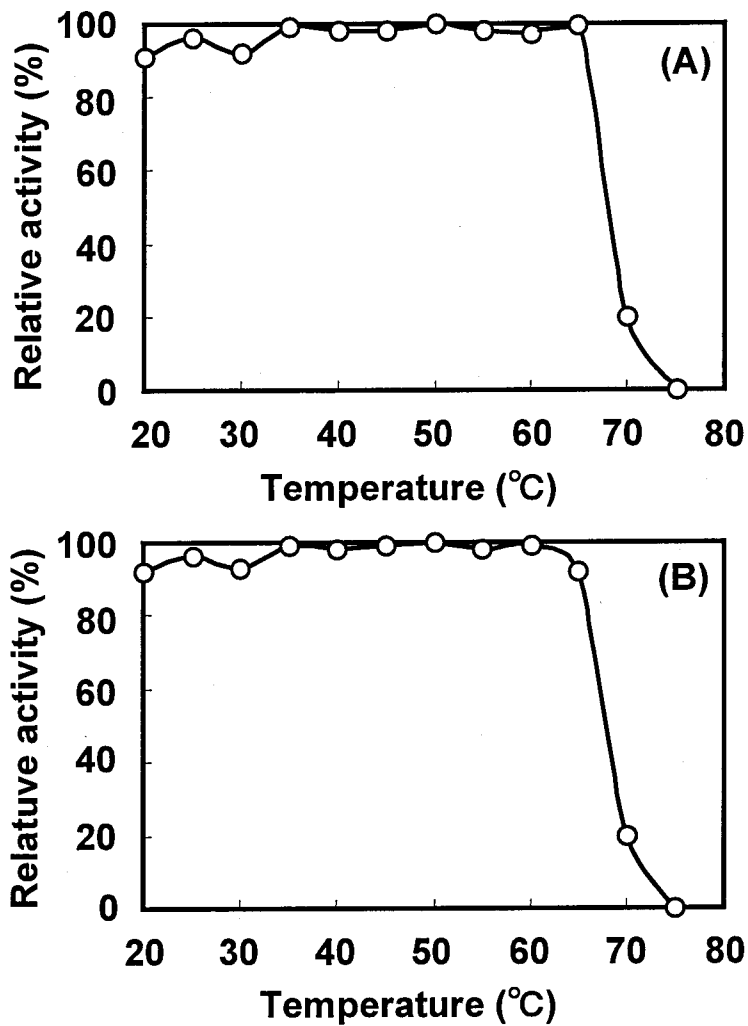


Fig. 5-11. Thermostability of enzyme complexes.

The enzymes ((A) 4-oxalocrotonate decarboxylase and (B) 2-oxopent-4-enoate hydratase) was incubated at various temperatures for 10 min, and then the remaining activity was assayed.

(3) 酵素活性に及ぼす pH の影響

4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼは、pH 7.0 において最大活性を示した (Fig. 5-12 (A)). しかし、pH 8.0 で急激に活性が低下した。

2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼは pH 5.0 において最大活性を示した (Fig. 5-12 (B)). しかし、pH 8.0 で急激に活性が低下した。

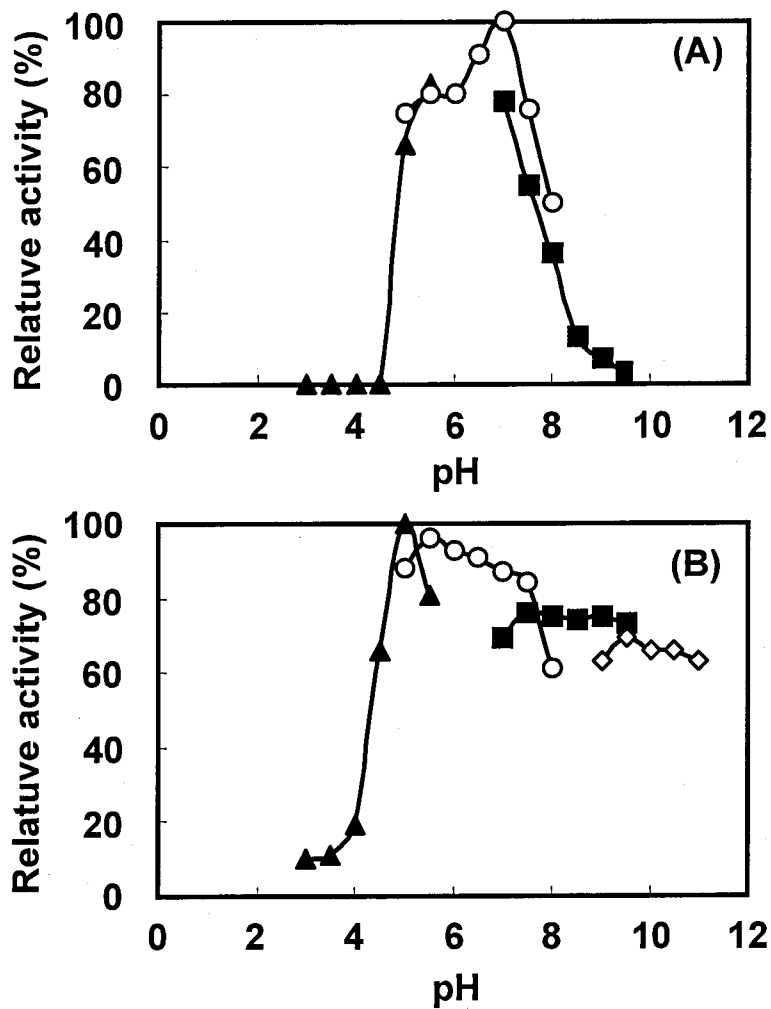


Fig. 5-12. Effect of pHs on enzyme complexes activity.

Purified enzymes ((A) 4-oxalocrotonate decarboxylase and (B) 2-oxopent-4-enoate hydratase) was assayed in 100 mM buffer solutions at various pHs. The buffers used were: ▲, acetate; ○, sodium-potassium phosphate; ■, Tris-HCl; and ◇, $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$.

(4) 活性に及ぼす温度の影響

4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼは 45°Cの活性測定時に最大活性を示した。それ以上の温度あるいはそれ以下の温度では活性が低下した (Fig. 5-13 (A)).

2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼは 25°Cの活性測定時に最大活性を示した。それ以上の温度あるいはそれ以下の温度では活性が低下した (Fig. 5-13 (B)).

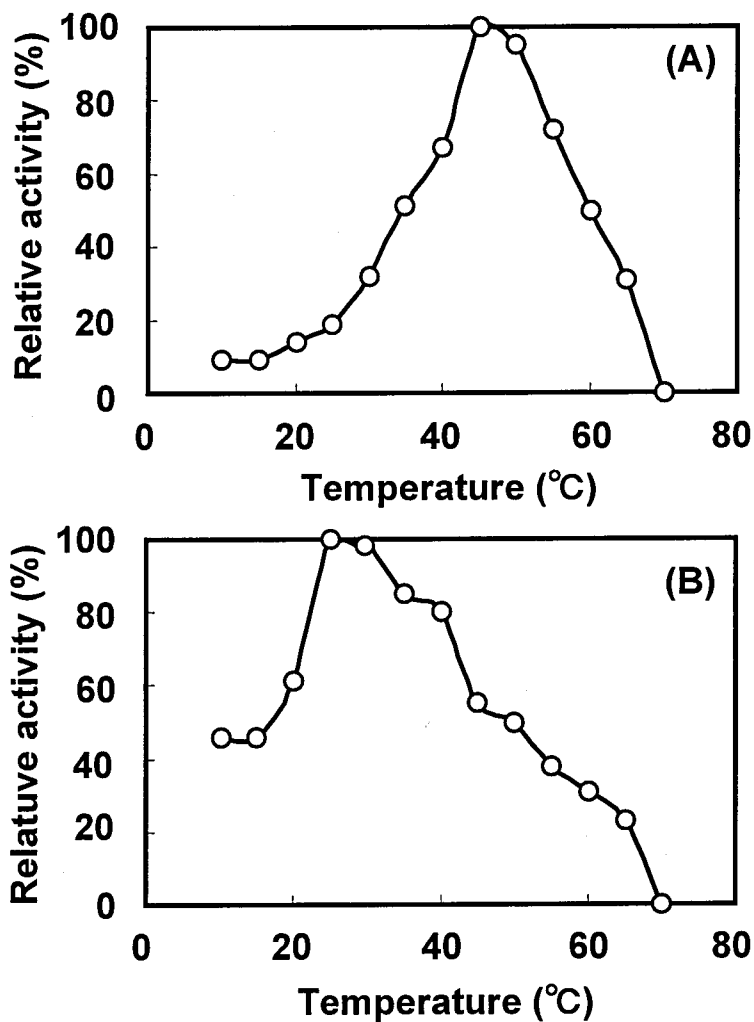


Fig. 5-13. Effect of temperature on enzyme complexes activity.

(A) 4-oxalocrotonate decarboxylase was assayed in Tris-HCl buffer (pH 8.0) solution.

(B) 2-oxopent-4-enoate hydratase were assayed in 100 mM sodium potassium-phosphate buffer (pH 8.3) solution. Enzymes activities were assayed at various temperatures.

3. 触媒化学的性質

(1) 各種試薬の影響

本酵素の活性に与える各種試薬の影響について検討し、得られた結果を Table 5-2(A), (B) に示す. 4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼは Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} 等の 2 価の金属イオン, 酸化剤である $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, *p*-クロロメルクリ安息香酸および *N*-エチルマレイミド等の-SH 基修飾試薬, Tiron により強く阻害された.

2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼは 1 mM の Hg^{2+} にのみ強い阻害を受けた.

Table 5-2(A). Effects of various compounds on 4-oxalocrotonate decarboxylase activity for 4-oxalocrotonate.

Compound	Concentration (mM)	Remaining Activity (%)
None	1.0	100
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	23
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	72
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	1.0	36
AgNO_3	1.0	68
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	88
HgCl_2	1.0	76
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.0	67
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 5\text{H}_2\text{O}$	1.0	9
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	47
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	61
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	61
CH_2ICOOH	1.0	64
PCMB ^{a)}	1.0	54
DTNB ^{b)}	1.0	61
α, α' -Dipyridyl	1.0	67
<i>N</i> -Ethylmaleimide	1.0	58
Tiron	1.0	59
EDTA	1.0	66
<i>o</i> -Phenanthroline	1.0	63
NaN_3	1.0	68

a) PCMB, *p*-chloromercuribenzoic acid.

b) DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid).

Table 5-2(B). Effects of various compounds on 2-oxopent-4-enoate hydratase activity for 2-oxopent-4-enoate.

Compound	Concentration (mM)	Remaining Activity (%)
None	1.0	100
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	104
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.0	105
K ₃ Fe(CN) ₆	1.0	71
AgNO ₃	1.0	80
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	95
HgCl ₂	1.0	0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.0	72
MnSO ₄ ·4~5H ₂ O	1.0	73
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.0	73
NiSO ₄ ·6H ₂ O	1.0	79
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	84
CH ₂ ICOOH	1.0	86
PCMB ^{a)}	1.0	75
DTNB ^{b)}	1.0	75
α,α'-Dipyridyl	1.0	79
N-Ethylmaleimide	1.0	80
Tiron	1.0	77
EDTA	1.0	78
o-Phenanthroline	1.0	74
NaN ₃	1.0	74

a) PCMB, *p*-chloromercuribenzoic acid.

b) DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid).

4. 酵素反応速度論

(1) 4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼ

8.32 μM~166.45 μM の 4-オキサロクロトン酸を基質として反応を行い, Lineweaver & Burk³⁷⁾ のプロットから, K_m および V_{max} はそれぞれ 13.1 μM, 0.15 μmol·min⁻¹·(mg·protein⁻¹)であった。

(2) 2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼ

11.74 μM~176.07 μM の 2-オキソペント-4-エン酸を基質として反応を行い, Lineweaver & Burk³⁷⁾ のプロットから, K_m および V_{max} はそれぞれ 56.1 μM, 0.17 μmol·min⁻¹·(mg protein⁻¹)⁻¹であった。

第4節 酵素反応生産物の分離・同定および反応機構の解析

<方法>

1. 酵素反応時におけるUV-VIS スペクトルの変化

第1章3節 Table 1-12 に従い、4-オキサロクロトン酸を基質とした反応液に精製酵素 ($0.41 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 0.02 ml を添加することで反応を開始した。5 分ごとに吸収スペクトルの変化を測定した。

2. 酵素反応生産物の分離と同定

(1) 酵素反応

(i) 4-オキサロクロトン酸由来酵素反応生産物の同定

0.19 mM 4-オキサロクロトン酸 24 ml, 3 mM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 24 ml を加えた 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 216 ml に, 精製酵素 ($310 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 10 ml を添加することで酵素反応を開始し, 24 °C で 1.0 時間, 100 rpm で振とうを続けた。

(ii) 2-オキソペント-4-エン酸由来酵素反応生産物の同定

0.14 mM 2-オキソペント-4-エン酸基質溶液 (100 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液, pH 8.5) 162 ml に 3 mM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 18 ml を加え, 精製酵素 ($260 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 2.4 ml を添加することで酵素反応を開始し, 24 °C で 30 分間, 100 rpm で振とうを続けた。

(2) 酵素反応生産物の誘導体化

(i) 4-オキサロクロトン酸由来酵素反応生産物の同定

酵素反応終了後, 反応液をエバポレーターで 30 ml まで減圧濃縮し, 6.0 N HCl を用いて pH 3.0 に調整した。その後, 酢酸エチルで 3 回抽出を行い, 有機溶媒層を得た。有機溶媒層は無水硫酸ナトリウムを用いて脱水処理の後減圧乾固を行い, デシケーター内で 1 晩乾燥した。乾固した酵素反応生産物 (2-オキソペント-4-エン酸) に 5% 塩化水素-メタノール溶液 (和光純薬, 大阪) 250 μl を加えて 85°C, 1.5 時間反応させ, カルボキシル基をメチルエステル化した。メチルエステル化した化合物を GC-MS 分析に供した。

(ii) 2-オキソペント-4-エン酸由来酵素反応生産物の同定

酵素反応生産物の抽出は前述の方法に従った。乾固した酵素反応生産物 (4-ヒドロキシ-2-オキソバレリン酸) を同様にメチルエステル化し, デシケーター内で一晩乾燥させ, さらに *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide-アセトニトリル混合液 (v/v, 1:0.2) 300 μl を加えて 85°C, 1.5 時間反応させ, 水酸基およびカルボキシル基をトリメチルシリル化し, 1 晩デシケーター内で乾燥させた。トリメチルシリルおよびメチルエステル化した化合物を GC-MS 分析に供した。

(3) GC-MS 分析

トリメチルシリルおよびメチルエステル誘導体化した各化合物は日立 G-3000 ガスクロマトグラフ（日立製作所，東京）を連結した日立 M-2500 二重収束質量分析計で行った。条件を以下に示す。

[条件]

- ・カラム：TC-1 fused silica capillary column (0.25 mm × 30 m, GLサイエンス, 東京) ;
100°C (1 min) → (10°C/min) → 280°C
- ・キャリアガス：He, liner velocity 2.5 cm/min
- ・INJ/DET：250°C/280°C
- ・検出：MS (ionization, 70eV)

<結果>

精製酵素を用いた際の酵素反応時における吸収スペクトルの変化を Fig. 5-14 に示した。反応開始後，4-オキサロクロトン酸由来の 235 nm の吸光度の減少とともに 2-オキソペント-4-エン酸由来の 265 nm の吸光度の減少も見られた。

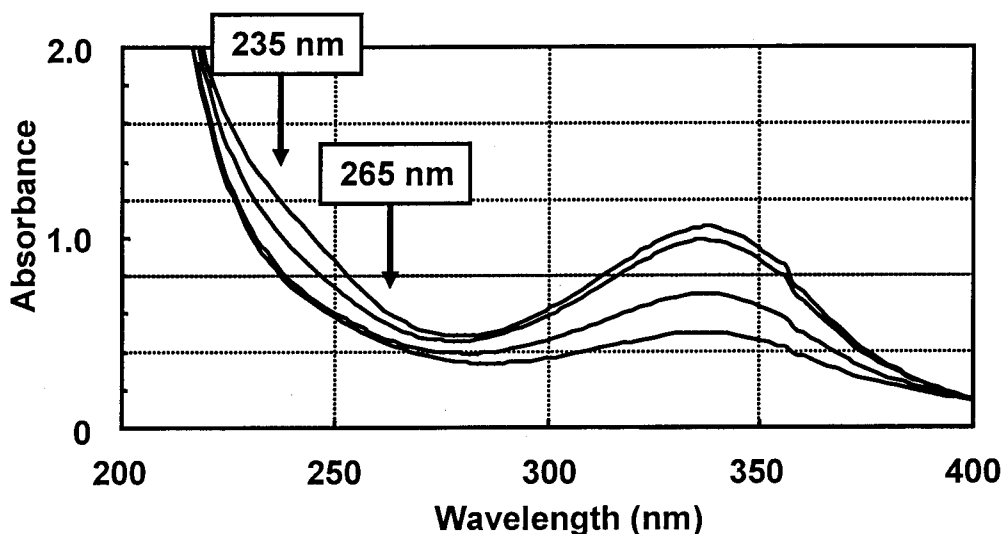


Fig. 5-14. Absorption spectrum of the reaction products formed from 4-oxalocrotonic acid in an assay with enzyme complexes.

The reaction mixture contained 2.7 ml of 0.19 mM 4-oxalocrotonic acid solution in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.3 ml of 3 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.02 ml of purified enzyme ($0.41 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). The reaction was started by adding the enzyme solution. After incubation at 24°C , the sample was scanned with a spectrophotometer and spectrum was recorded every 5 min.

2. 酵素反応生産物の同定

(i) 4-オキサロクロトン酸由来酵素反応生産物の同定

誘導体化した酵素反応生産物を GC-MS 分析し、構造解析した (Fig. 5-15). リテンションタイム 6.2 分 (Compound D) にメインピークが見られた. Compound D 由来のフラグメンテーションを解析すると, m/z 128 (M^+), 113 (M^+-CH_3), 87 ($M^+-CH_2CHCH_2$), 69 ($M^+-COOCH_3$), 59 ($M^+-COCH_2CHCH_2$), 41 ($M^+-COCOOCH_3$) であり, 同化合物はメチルエステル化された 2-オキソペンント-4-エン酸であると同定した. さらに, オーセンティックの 2-オキソペンント-4-エン酸を用いて同様に誘導体化し, 分析を行ったところリテンションタイムとフラグメンテーションパターンは一致した.

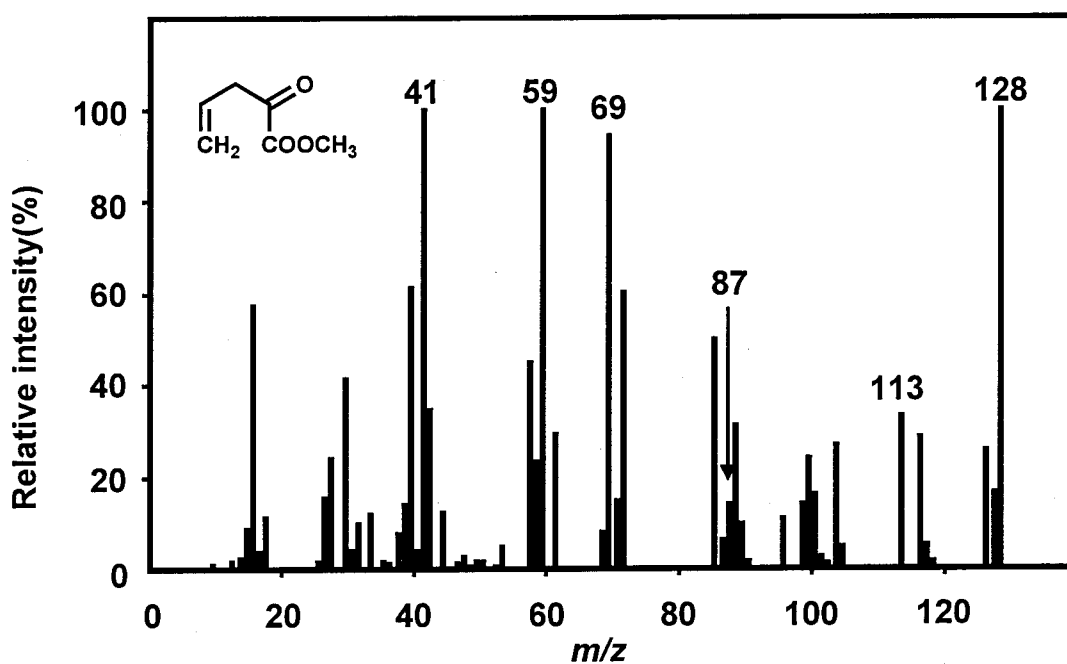


Fig. 5-15. Mass spectrum of methylated compound D.

(ii) 2-オキソペント-4-エン酸由来の酵素反応生産物の同定

誘導体化した酵素反応生産物を GC-MS 分析し、構造解析した (Fig. 5-16). リテンションタイム 6.9 分 (Compound E) にメインピークが見られた. Compound E 由来のフラグメンテーションを解析すると, m/z 290 (M^+), 275 ($M^+ - CH_3$), 231 ($M^+ - COOCH_3$), 201 ($M^+ - OSi(CH_3)_3$), 147 ($[(CH_3)_2Si=O-Si(CH_3)_3]^+$), 73 ($[Si(CH_3)_3]^+$), 59 ($[COOCH_3]^+$) であり, 同化合物はトリメチルシリルおよびメチルエステル化された 4-ヒドロキシ-2-オキソバレリン酸であると同定した.

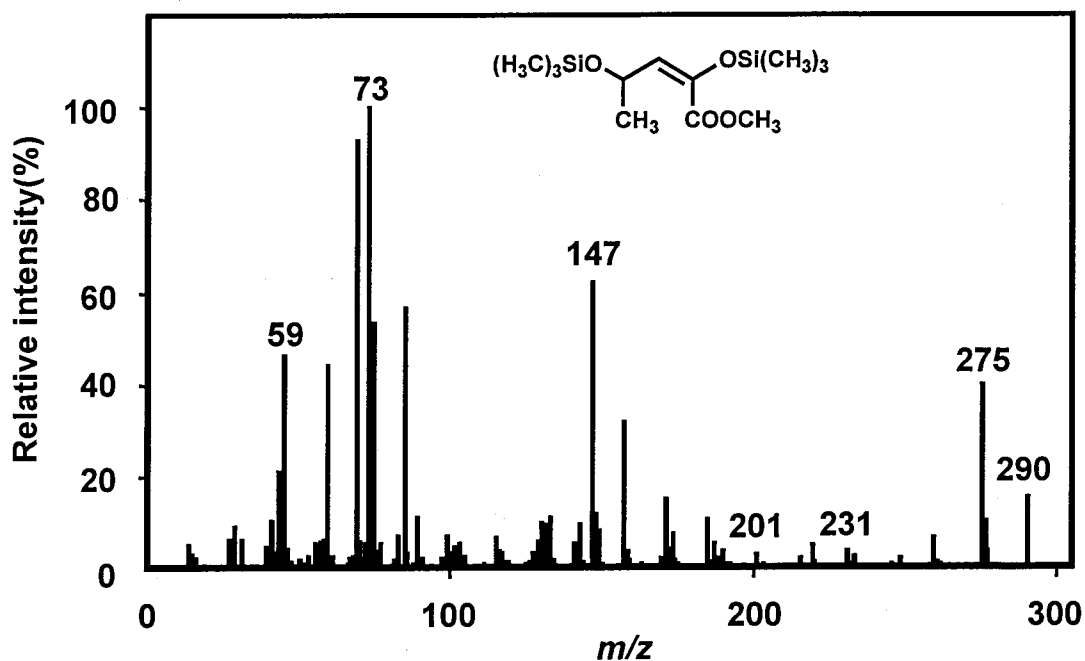


Fig. 5-16. Mass spectrum of trimethylsilylated compound E.

第5節 要約と考察

第1章において10 d株の無細胞抽出液より Mg^{2+} 依存型4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼ (4OD) および 2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼ (OEH) 活性を見いだした. 3種類の陰イオン交換樹脂を用い, 溶出法や緩衝液のpHを変えながら合計5回イオン交換クロマトグラフィーを行った. 全ての段階において得られた活性画分は4-オキサロクロトン酸 デヒドロゲナーゼおよび2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼの両酵素活性を示し, それぞれの酵素の高活性画分は一致した. また, ゲルろ過クロマトグラフィーや疎水クロマトグラフィーにおいても両酵素を分離することが出来なかった. Native-PAGE においては1本のメインバンドと1本のマイナーバンドが見られたが (Fig. 5-6(A)), SDS-PAGEにて1:1の割合で2本の明瞭なバンドが見られたことから (Fig. 5-6(B)), 4-オキサロクロトン酸以降の代謝に関与する2種類の酵素が酵素複合体を形成していると結論した. Native-PAGE において見られたマイナーバンドは泳動途中に複合酵素から乖離したサブユニットであると考えられる. *Pseudomonas* sp. AP-3 株¹¹⁾ および *Pseudomonas putida* mt-2 株³⁹⁾ においても同様の反応を触媒し, 異なる活性を示す2種類の酵素による酵素複合体について報告されている. また, AP-3株においてNative-PAGE においてマイナーバンドが見られることも報告されている¹¹⁾. 精製した酵素を用いた酵素反応機構の解析により, 10株由来の本酵素は4-オキサロクロトン酸 デヒドロゲナーゼおよび2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼであり, 両酵素は酵素複合体を形成していると結論した. また, 本酵素はその活性発現に Mg^{2+} のみを要求した. 本酵素を *Pseudomonas* sp. AP-3株由来の同酵素複合体¹¹⁾ と特性について比較するといくつかの相違が見られた.

精製酵素を用いて酵素反応を行い, 吸収スペクトルの変化および蓄積した酵素反応生産物の同定から反応機構を解析した. 4-オキサロクロトン酸を基質とした反応液に酵素液を添加すると基質由来の235 nmにおける吸収の減少および反応生産物と考えられる2-オキソペント-4-エン酸由来の265 nm付近の吸光度も減少した.

そこで精製酵素を用いて4-オキサロクロトン酸と反応を行い, 蓄積した酵素反応生産物を分離同定したところ, 2-オキソペント-4-エン酸であった. さらに, 2-オキソペント-4-エン酸を基質として反応を行い, 蓄積した酵素反応生産物を分離同定したところ, 4-ヒドロキシ-2-オキソバレリン酸であった (Fig. 5-15, 16). よって, 4-オキサロクロトン酸 (Fig. 5-17, Compound III) は4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼおよび2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼにより, 2-オキソペント-4-エン酸 (Fig. 5-17, Compound IV) を経て4-ヒドロキシ-2-オキソバレリン酸 (Fig. 5-17, Compound V) に変換されると結論した (Fig. 5-17).

精製した本酵素の分子量はゲル濾過法では470,000, SDS電気泳動ではサブユニットの分子量が29,000および27,000であった. 4-オキサロクロトン酸デカルボキシラーゼは Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} 等の2価の金属イオン, 酸化剤である $Fe(CN)_6^{3-}$ やモノヨード酢酸, PCMB,

N-Ethylmaleimide 等の-SH 基修飾試薬, Tiron により強く阻害されたが, 2-オキソペント-4-エン酸ヒドラターゼは Hg^{2+} にのみ阻害を受けた. また, 本酵素の N 末端アミノ酸配列を解析したところ, 29,000 のサブユニットにおいてはデータベース上の既報のタンパク質とは全く類似性を示さなかったが, 27,000 のサブユニットにおいて *Pseudomonas putida* 由来の 2-ヒドロキシペント-2,4-ジエノエート ヒドラターゼ (accession No. AB107791) とアミノ酸レベルで 80%以上の類似性を示した. このことから 29,000 および 27,000 のサブユニットをそれぞれ 4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼ, 2-オキソペント-4-エン酸 ヒドラターゼであると結論した.

Pseudomonas sp. AP-3 株由来の 4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼおよび 2-オキソペント-4-エン酸 ヒドラターゼ¹¹⁾と特性について比較したところ, いくつかの相違が見られた (Table 5-3). AP-3 株由来の両酵素もまた酵素複合体を形成しており, 活性の発現に Mg^{2+} および Mn^{2+} を要求し, AP-3 株由来の両酵素は互いに酵素化学的諸性質において類似していた¹¹⁾. しかし, 10d 株由来のデカルボキシラーゼおよびヒドラターゼは, 酵素活性にあたる pH の影響および温度の影響, 各種試薬の影響においてその性質に大きく相違が見られた. また, 10d 株由来の両酵素は活性の発現に Mg^{2+} のみを要求し, Mn^{2+} を含めた他の金属イオンや-SH 基修飾試薬, キレート試薬において, デカルボキシラーゼは著しい阻害を受け, ヒドロラーゼは Hg^{2+} にのみ阻害を受けた. また N 末端アミノ酸配列においても相違が見られた.

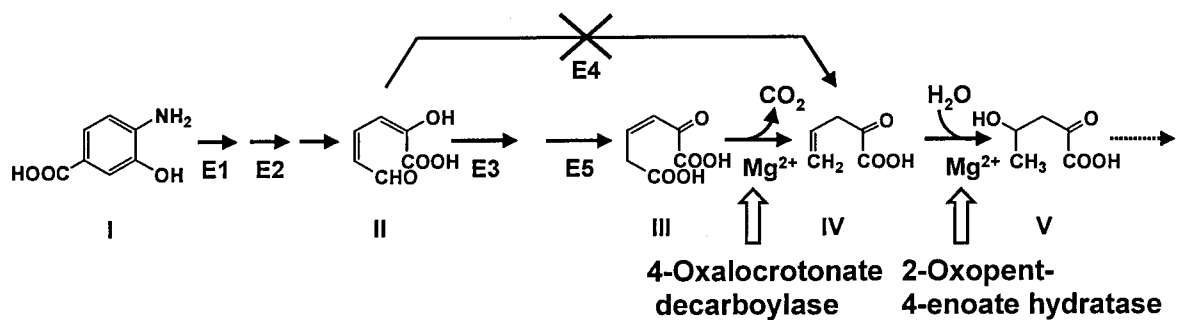


Fig. 5-17. Proposed pathway of 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde metabolism in *Bordetella* sp. strain 10d.

I, 4-amino-3-hydroxybenzoic acid; II, 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde; III, 4-oxalocrotonic acid; IV, 2-oxopent-4-enoic acid; V, 4-hydroxy-2-oxovaleric acid; E1, 4-amino-3-hydroxybenzoate 2,3-dioxygenase¹⁶⁾; E2, 2-amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde deaminase¹⁹⁾; E3, 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde dehydrogenase; E4, 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde hydrolase; E5, 4-oxalocrotonate tautomerase.

Table 5-3. Comparison of decarboxylases and hydratases.

	<i>Bordetella</i> sp. strain 10d		<i>Pseudomonas</i> sp. AP-3 ¹¹⁾
	4-oxalocrotonate decarboxylase	2-oxopent-4-enoate hydratase	40C ^{a)} , OEH ^{b)}
Molecular weight			
Native enzyme		470,000	300,000
Subunit	29,000	27,000	40C ^{a)} (28,000) OEH ^{b)} (29,000)
Thermostability		~65°C	~35°C
pH stability	6.5-8.0	4.5-7.5	5.0-8.0
Optimal pH	7.0	5.0	7.5
Optimal temperature	45°C	25°C	N. A.
Effects of reagents	Fe ²⁺ (23%) Mn ²⁺ (9%) Fe(CN) ₆ ³⁻ (36%) Co ²⁺ (47%) Iodoacetic acid (64%) PCMB (54%) N-Ethylmaleimide (58%) Tiron (59%)	Hg ²⁺ (0%)	40C ^{a)} Fe ²⁺ (17.2%) Fe ³⁺ (29.8%) Fe(CN) ₆ ³⁻ (27.6%) Ag ⁺ (0%) Cu ²⁺ (0%) Hg ²⁺ (0%) OEH ^{b)} Fe ²⁺ (13.6%) Fe ³⁺ (9.5%) Fe(CN) ₆ ³⁻ (76.0%) Ag ⁺ (0%) Cu ²⁺ (20.3%) Hg ²⁺ (0%)
NH ₂ -terminal	40C ^{a)} YLEAKVIQALAVDIXEMNEV OEH ^{b)} MDDKKIQYGDALYEALVERA		40C ^{a)} MKISRIAQRQ OEH ^{b)} MSEQNAKLAA

a) 4-oxalocrotonate decarboxylase

b) 2-oxopent-4-enoate hydratase

第6章 代謝経路

第1節 序

第5章までに4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸を唯一の炭素源、窒素源およびエネルギー源として生育する4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸資化性菌 *Bordetella* sp. 10d株における代謝酵素系の精製と特性解析および反応機構の解析を行った。第6章では4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝における最終代謝産物を明らかにするために同代謝経路の中間体である2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを基質として本菌由来の無細胞抽出液と反応させ、蓄積した最終代謝産物を分離・同定する。第5章までに得られた結果をまとめ、本菌における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝経路について述べ、既報の芳香族化合物代謝経路との比較を行う。

第2節 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝における最終代謝産物の分離・同定

1. 酵素反応生産物の分離と同定

(1) 酵素反応および酵素反応生産物の定量

100 mMリン酸カリウム-ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 40 ml に、1.42 mM 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド溶液 14 ml (0.198 mmol), 1.4 mM NAD⁺ 2.0 ml をあらかじめ添加し、精製酵素 (10.6 mg·ml⁻¹) 4.0 ml を添加することで酵素反応を開始した。反応は25 °Cで20分間、100 rpmで振とうを続けた。

(2) 酵素反応生産物の誘導体化

酵素反応終了後、反応液をエバポレーターで10 mlまで濃縮し、6N HClを用いてpH 3.0に調整した。その後、酢酸エチルで3回抽出を行い、有機溶媒層を得た。有機溶媒層は無水硫酸ナトリウムを用いて脱水処理を行った後、エバポレーターで減圧乾固した。酵素反応生産物に、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンメタノール溶液 (0.297 mmol) と6N HClを数滴添加し、30分間室温に放置することでカルボニル基をヒドラゾン化した。ヒドラゾン誘導体化した化合物を5%のHClを含むメタノール溶液中にて85°Cで1.5 h反応させた。誘導体化した酵素反応生産物をGC-MS分析に供した。

(3) GC-MS分析

ヒドラゾン誘導体化した化合物は日立 G-3000 ガスクロマトグラフを連結した日立 M-2500 二重収束質量分析計 (日立製作所, 東京) で行った。条件を以下に示す。

[条件]

- ・カラム: TC-1 fused silica capillary column (0.25 mm×30 m, GLサイエンス, 東京);
100°C (1 min) → (10°C/min) → 300°C
- ・キャリアガス: He, liner velocity 2.5 cm/min
- ・INJ/DET: 250°C/280°C
- ・検出: MS (EI法, ionization, 70eV)

<結果>

1. 酵素反応生産物の同定

誘導体化した酵素反応生産物を GC-MS 分析し, 構造解析した. リテンションタイム 13.2 分 (Compound F) にメインピークが見られた. Compound F 由来のフラグメンテーションを解析すると, m/z 282 (M^+), 251 (M^+-OCH_3), 222 ($M^+-H-COOCH_3$), 207 ($M^+-H-COOCH_3-CH_3$), 195 ($M^+-H-COOCH_3-CH_3-C$), 181 ($[C_6H_3(NO_2)_2N]^+$) (Fig. 6-1) であり, 誘導体化した酵素反応生産物はケト基が 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン化されカルボキシル基がメチルエステル化されたピルビン酸であると同定した.

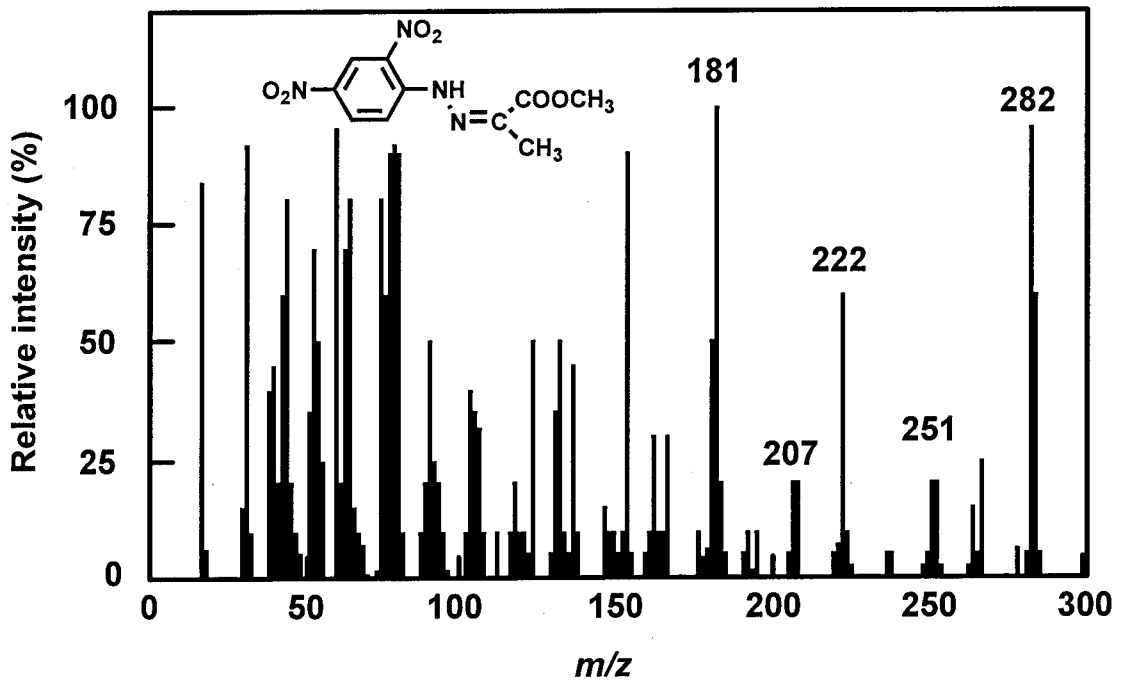


Fig.6-1. Mass spectrum of 2,4-dinitrophenylhydrazone compound F.

第3節 *Bordetella* sp. 10d における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝経路の決定および既報の代謝系との比較.

第1章から本章第2節までの本菌における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝酵素系の解析により代謝経路を次のように結論した (Fig. 6-2(C)). 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 (Fig. 6-2(C), Compound I) は4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾ (Fig. 6-2(C), E1) により, ベンゼン環の開裂を受け2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド (Fig. 6-2(C), Compound II) に変換される¹⁶⁾. 2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドは *in vitro* においてその大部分が非酵素的に2,5-ピリジンジカルボン酸 (Fig. 6-2(C), Compound V) に変換されるが, 第2章で明らかにした2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド デアミナーゼ¹⁹⁾ (Fig. 6-2(C), E2) により脱アミノ反応を受けた後2-ヒドロキシ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド (Fig. 6-2(C), Compound III) となり, 非酵素的な脱炭酸反応を経て2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドに変換される (Fig. 6-2(C), Compound IV)¹⁹⁾. 第1章および第3章より本菌 NAD⁺依存型2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ (Fig. 6-2(C), E3) のみにて2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを代謝し, 2-ヒドロキシムコン酸 (Fig. 6-2(C), Compound VI) に変換すると結論した. 第4章および第5章より2-ヒドロキシムコン酸は4-オキサロクロトン酸 タータメラゼ (Fig. 6-2(C), E6) により4-オキサロクロトン酸 (Fig. 6-2(C), Compound VII) に変換され, 4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼ (Fig. 6-2(C), E6) および2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼ (Fig. 6-2(C), E7) の酵素複合体により, 2-オキソペント-4-エン酸 (Fig. 6-2(C), Compound VIII) をへて4-ヒドロキシ-2-オキソバレリン酸 (Fig. 6-2(C), Compound IX) に至ると結論した. また, 第6章第2節により (Fig. 6-1), 本菌における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸の最終代謝産物はピルビン酸 (Fig. 6-2(C), Compound X) であると結論した. 今回, 4-ヒドロキシ-2-オキソバレリン酸をピルビン酸に変換する4-ヒドロキシ-2-オキソバレリン酸 アルドラーゼについて特性解析をしていない. 既報の有機合成法⁴¹⁾ では酵素活性測定のための4-ヒドロキシ-2-オキソバレリン酸の調製が困難であったからである.

本菌における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝経路と既報の芳香族化合物代謝経路との比較を行った. Heらは2-アミノフェノールのメタ開裂経路において2-アミノフェノールのメチル, クロロ, ヒドロキシ, カルボキシ誘導体における代謝もまた, 2-アミノフェノールメタ開裂経路を経て代謝されると提案している^{2) ~6)}. 当研究室にて報告した2-アミノフェノール資化性菌 *Pseudomonas* sp. AP-3 株もまた, 同様の経路「modified meta-cleavage pathway」によって2-アミノフェノールを代謝した¹¹⁾ (Fig. 6-2(A)). 10d 株における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝において, 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸がプロトカテキン酸などの隣接した水酸基を有する代謝中間体を経ることなく直接初発酵素によりベンゼン環の開裂を受ける点で類似していた. しかし, 脱アミノ反応以

降の代謝系において modified *meta*-cleavage pathway とは異なっている。つまり、①ベンゼン環開裂直後、脱アミノ反応を受けること、②脱アミノ反応後、非酵素的な脱炭酸反応が見られること、③AP-3 株では見いだされなかった 4-オキサロクロトン酸 タータメラーゼが代謝系に存在することである。

本菌の 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝はカルボキシル基を中心に C2 位と C3 位の位置でベンゼン環の開裂を受けるという点で *Bacillus circulans* におけるプロトカテキン酸代謝経路³³⁾ と類似している。このプロトカテキン酸代謝経路においてプロトカテキン酸は 2-ヒドロキシ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドをへて 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドに変換された後、NAD⁺非依存型 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド ハイドロラーゼによるヒドロリティックルートと NAD⁺依存型 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼによるデハイドロゲネイティブルートによって代謝される。2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドが両ルートによって代謝されることはカテコールの代謝経路³⁹⁾ では一般的である (Fig. 6-2(B))。しかし、10d 株ではデハイドロゲネイティブルートのみで 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを代謝する。このような代謝系は非常に珍しく、フェノール資化性菌 *Comamonas teststeroni* TA441 に見られるのみである⁴²⁾。以上のことより、10d 株における 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝は既報の 2-アミノフェノール類およびカテコール類の代謝^{13, 38)} とは代謝・酵素系の点で全く異なると結論した。

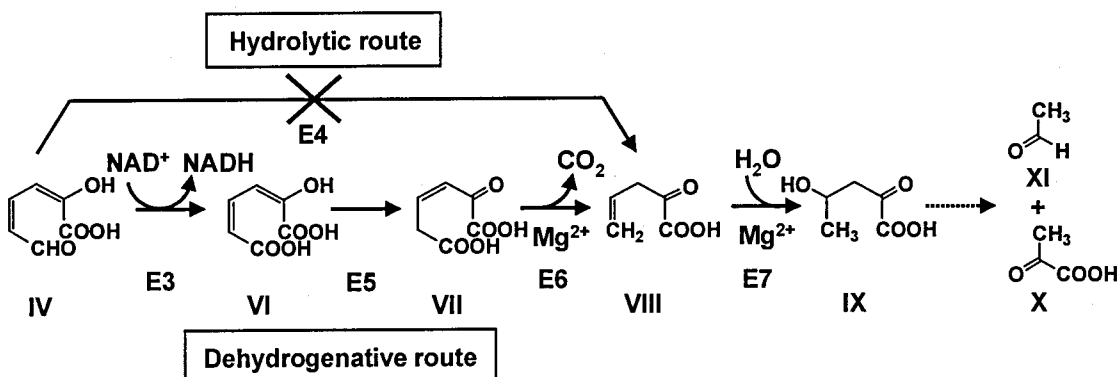
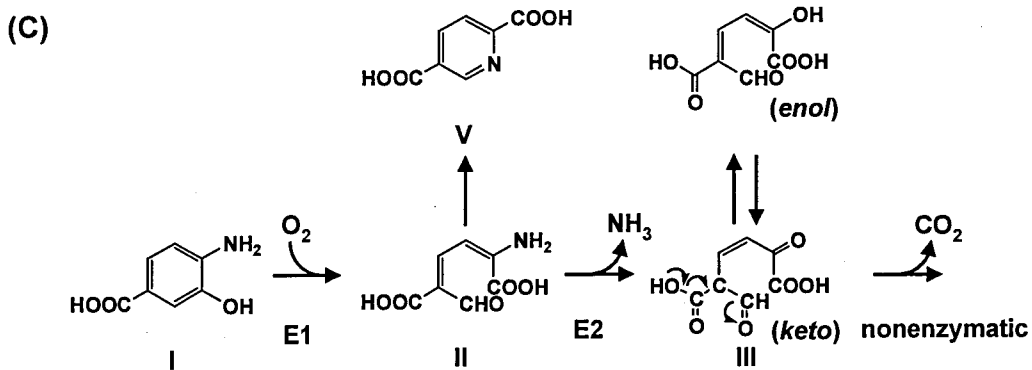
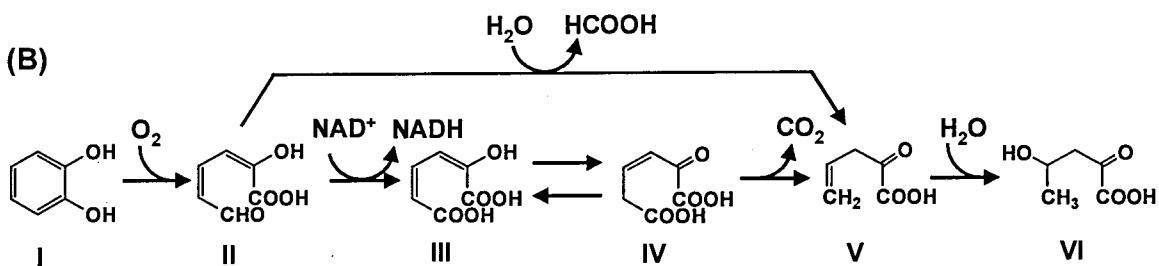
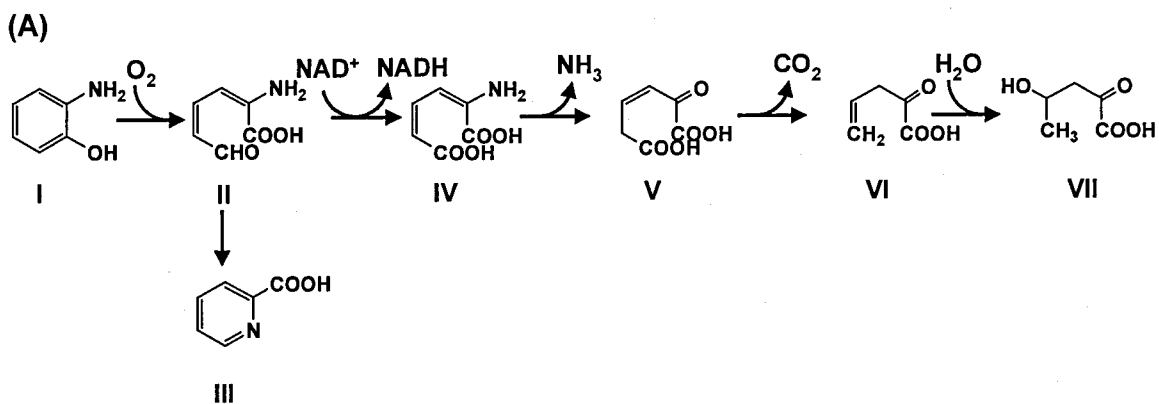


Fig. 6-2. Proposed pathway of 4-amino-3-hydroxybenzoic acid in *Bordetella* sp. strain 10d (C) and comparison to the modified *meta*-cleavage pathway of 2-aminophenol (A), and to the *meta*-cleavage pathway of catechol (B).

(A) 2-Aminophenol metabolism in *Pseudomonas* sp. strain AP-3^{11,31}. I, 2-aminophenol; II, 2-aminomuconic 6-semialdehyde; III, picolinic acid; IV, 2-aminomuconic acid; V, 4-oxalocrotonic acid; VI, 2-oxopent-4-enoic acid; and VII, 4-hydroxy-2-oxovaleric acid. (B) Catechol metabolism in *Pseudomonas putida*³⁹. I, catechol; II, 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde; III, 2-hydroxymuconic acid; IV, 4-oxalocrotonic acid; V, 2-oxopent-4-enoic acid and VI, 4-hydroxy-2-oxovaleric acid. (C) Proposed pathway of 4-amino-3-hydroxybenzoic acid in *Bordetella* sp. strain 10d^{16,18}. I, 4-amino-3-hydroxybenzoic acid; II, 2-amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde; III, 2-hydroxy-5-carboxymuconic 6-semialdehyde; IV, 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde; V, 2,5-pyridinedicarboxylic acid; VI, 2-hydroxymuconic acid; VII, 4-oxalocrotonic acid (keto form); VIII, 2-oxopent-4-enoic acid; IX, 4-hydroxy-2-oxovaleric acid; X, pyruvic acid; and XI, acetaldehyde; E1, 4-amino-3-hydroxybenzoate 2,3-dioxygenase; E2, 2-amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde deaminase; E3, 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde dehydrogenase; E4, 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde hydrolase; E5, 4-oxalocrotonate tautomerase; E6, 4-oxalocrotonate decarboxylase; and E7, 2-oxopent-4-enoate hydratase.

総括

本論文では4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸資化性菌 *Boedetella* sp. 10d 株における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝および酵素系を明らかにすることを目的として研究を進め、次のような成果を得ることができた。

4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸は4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼによってベンゼン環の開裂を受けた後、2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドに変換される¹⁷⁾。4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸培地にて本菌を培養し、得られた無細胞抽出液を用いて酵素反応を行ったところ、基質である4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸由来の吸光度の減少とともに、別の酵素反応生産物の蓄積を示す吸光度の増加が見られた。酵素反応生産物は分光光学的に2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドであると推定し、2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドは次段階の反応を触媒する酵素系によりさらに代謝されたと予想した。そこで、既報の芳香族化合物代謝経路より推定される様々な代謝中間体を基質として酵素反応を行い、10d 株の4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝に関与する酵素系を検索した。その結果4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾ 以外に、5種類の酵素活性を見出すことが出来た。これらの酵素活性はコハク酸-グルコース培地で培養して得た菌体の無細胞抽出液にもわずかに見られたが、極めて低いことからジオキシゲナーゼを含む代謝酵素系すべては誘導的に生合成されると結論した。そこで、新たに見出した5種類の代謝酵素系を精製し、その特性解析および反応機構の解析により、本菌における2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド以降の代謝系を明らかにし、4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝経路を推定することにした。

4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾ の次段階で作用する酵素、つまり2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド分解酵素の精製、特性解析およびその反応機構の解析を行った¹⁸⁾。本酵素の基質となる2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドは非常に不安定な化合物であった。そのため、4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸と部分精製した4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ¹⁶⁾ を用いて基質の供給と酵素反応を同一の反応系で行なう酵素活性測定法を新たに確立した。10d 株由来の本酵素の分子量は、ゲル濾過法で34,000、SDS-PAGEで15,000であることから本酵素は15,000のサブユニットからなるホモダイマーであった。精製酵素を用いた酵素反応時における吸収スペクトルの変化と酵素反応生産物の同定、および化学量論より4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸はベンゼン環の開裂後、本酵素による脱アミノ反応を受け、非酵素的な脱炭酸反応を経て2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドに変換されると結論した。よって精製した酵素は「2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド デアミナーゼ」¹⁸⁾ と称することにした。2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド デアミナーゼは基質特異性が高く、2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドにのみ反応した。本酵素は熱に安定で2価および3価の金属イオンに対して著しい阻害を受けた。決定したN

末端アミノ酸配列 20 アミノ酸残基についてホモロジー検索を行ったところ、高い類似性を示すタンパク質は見られなかった。酵素自身の吸収スペクトルにおいて本酵素は極大吸収が 266 nm にシフトし、可視領域にも吸収が見られた。蛍光光度分析の結果、オーセンティックの FAD とは励起スペクトルにおいて類似していたが、蛍光スペクトルでは極大波長に相違が見られた。よって、本酵素は FAD とは異なるフラビン分子種を含有するフラビン酵素であると結論した。また、*Pseudomonas* sp. AP-3 株における 2-アミノムコン酸 デアミナーゼ¹¹⁾ と比較して、脱アミノ反応における相違が見られた。さらに酵素の特性において温度安定性、Native な状態での分子量、各種試薬の影響、N 末端アミノ酸配列において相違が見られた¹⁶⁾。よって本酵素は新規のデアミナーゼ酵素であると結論した。

2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼの精製および特性解析、反応機構の解析を行った。10d 株由来の無細胞抽出液中に 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド代謝に関与する酵素として、NAD⁺依存型の 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ活性のみを見出した。同デヒドロゲナーゼの精製を試みたが非常に不安定であったため、単一になるまで精製を行うことができなかった。よって特性解析には部分精製酵素を用いた。部分精製酵素を用いた酵素反応時における吸収スペクトルの変化と酵素反応生成物の同定より 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドは NAD⁺依存型 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼにより 2-ヒドロキシムコン酸に変換されると結論した。本酵素は NAD⁺依存型で 2 価の金属イオン、-SH 基修飾試薬により阻害を受けた。本酵素は基質特異性が広く 2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド以外に C₆~C₃ の直鎖状アルデヒドおよびベンズアルデヒドに対しても活性を示した。*Pseudomonas* sp. AP-3 株由来の 2-アミノムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ¹¹⁾ と比較すると、各種試薬の影響および基質特異性において相違が見られた。

4-オキサロクロトン酸タータメラーゼの精製および特性解析を行った。10d 株由来の本酵素は、ゲル濾過法で 51,000、SDS-PAGE で 12,000 であったことから本酵素は 12,000 のサブユニットからなるホモテトラマーであった。精製酵素を用いた酵素反応時における吸収スペクトルの変化から 2-ヒドロキシムコン酸は 4-オキサロクロトン酸 タータメラーゼにより 4-オキサロクロトン酸に変換されると結論した。本酵素は熱に安定で 2 価の金属イオン、アルカリ金属イオン、-SH 基修飾試薬、キレート試薬により阻害を受けた。*Pseudomonas putida* mt-2 株由来の同酵素³⁹⁾ とはサブユニットの分子量および -SH 基修飾試薬における阻害等の点で相違が見られた。

4-オキサロクロトン酸デカルボキシラーゼおよび 2-オキソペント-4-エン酸ヒドラターゼの精製および特性解析を行った。*Pseudomonas putida* mt-2 株および *Pseudomonas* sp. AP-3 株由来の 4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼおよび 2-オキソペント-4-エン酸ヒドラターゼ^{11), 39)} は酵素複合体を形成していることから、10d 株由来の両酵素もまた、同様に酵素複合体を形成していることが予想された。そこで 2 種類の酵素について精製を並行して行ったところ酵素精製のどの段階においても両酵素の溶出塩濃度、高活性画分の

範囲が一致した。また、Native-PAGE においては1本のメインバンドと1本のマイナーバンドが見られたが、SDS-PAGE にて1:1の割合で2本の明瞭なバンドが見られたことから、10d株由来の両酵素もまた酵素複合体を形成していると結論した。両酵素はその活性発現に Mg^{2+} のみを要求した。精製した本酵素の分子量はゲル濾過法では470,000、SDS電気泳動ではサブユニットの分子量が29,000および27,000であった。酵素反応生成物の同定より4-オキサロクロトン酸は4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼおよび2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼにより、2-オキソペント-4-エン酸を経て4-ヒドロキシ-2-オキソバレリン酸に変換されると結論した。酵素化学的諸性質において両酵素はその特性において互いに相違が見られた。4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼは2価の金属イオン、酸化剤、-SH基修飾試薬により強く阻害されたが、2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼは Hg^{2+} にのみ阻害を受けた。また、pHの影響、温度の影響においても互いに相違が見られた。また、N末端アミノ酸配列の解析により、29,000および27,000のサブユニットをそれぞれ4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼ、2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼであると結論した。*Pseudomonas* sp. AP-3株由来の同酵素複合体¹¹⁾と比較すると、AP-3株由来の両酵素は酵素化学的諸性質において互いに類似した性質を示すという点で本菌との相違が見られた。そのほか活性の発現に要求する金属イオンおよび、酵素活性に与えるpHの影響、温度の影響、各種試薬の影響およびN末端アミノ酸配列においても相違が見られた。

本菌における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝に関与する代謝および酵素系の解析により、最終代謝経路を次のように結論した (Fig. 6-2(C))。4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸は4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼにより、ベンゼン環の開裂を受け2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドに変換される¹⁶⁾。2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドは2-アミノ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒド デアミナーゼにより脱アミノ反応を受けた後2-ヒドロキシ-5-カルボキシムコン酸 6-セミアルデヒドに変換され、非酵素的な脱炭酸反応を経て2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドに至る¹⁸⁾。本菌は2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼのみで代謝し、2-ヒドロキシムコン酸 6-セミアルデヒドを2-ヒドロキシムコン酸に変換すると結論した。2-ヒドロキシムコン酸は4-オキサロクロトン酸 タータメラゼにより4-オキサロクロトン酸に変換され、酵素複合体を形成する4-オキサロクロトン酸 デカルボキシラーゼおよび2-オキソペント-4-エン酸 ハイドラターゼにより、2-オキソペント-4-エン酸を経て4-ヒドロキシ-2-オキソバレリン酸に変換される。また、本菌における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸の最終代謝産物はピルビン酸であると結論した。

本菌における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝経路と既報の芳香族化合物代謝経路との比較を行った。本菌における4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝は、初発酵素によるベンゼン環の開裂および脱アミノ反応においては2-アミノフェノール代謝経路¹¹⁾と類似し

ていた。しかし、脱アミノ反応以降の代謝系に置いては相違が見られた。つまり、10d 株における 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝において、4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸がプロトカテキン酸などの隣接した水酸基を有する代謝中間体を経ることなく直接初発酵素によりベンゼン環の開裂を受ける点で類似していた。しかし、脱アミノ反応以降の代謝系において modified *meta*-cleavage pathway とは異なっている。①ベンゼン環開裂後、脱アミノ反応を受けること、②脱アミノ反応後、非酵素的な脱炭酸反応が見られること、③AP-3 株では見いだされなかった 4-オキサクロトン酸 タータメラゼが代謝系に存在することである。次に、本菌における 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝経路を *Bacillus circulans* におけるプロトカテキン酸代謝経路³³⁾を比較した。本菌の 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝はカルボキシル基を中心に C2 位と C3 位の位置でベンゼン環の開裂を受けるといふ点で *Bacillus circulans* におけるプロトカテキン酸代謝経路³³⁾と類似している。しかし、2-ヒドロキシシムコン酸 6-セミアルデヒド以降の代謝系において相違が見られた。*B. circulans* におけるプロトカテキン酸代謝では 2-ヒドロキシシムコン酸 6-セミアルデヒドは NAD 非依存型 2-ヒドロキシシムコン酸 6-セミアルデヒド ハイドロラーゼによるハイドロリティックルートと NAD 依存型 2-ヒドロキシシムコン酸 6-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼによるデハイドロゲネイティブルートによって代謝される。2-ヒドロキシシムコン酸 6-セミアルデヒドが両ルートによって代謝されることはカテコールの代謝経路³⁹⁾では一般的である (Fig. 6-1(B))。しかし、10d 株における 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝経路はデハイドロゲネイティブルートのみで 2-ヒドロキシシムコン酸 6-セミアルデヒド代謝を行う点で相違が見られた。これらのことより、10d 株における 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝は既報の 2-アミノフェノール類およびカテコール類の代謝^{11), 39)}とは異なると結論した。

本研究において 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸資化性菌 *Bordetella* sp. 10d における 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝を明らかにし、既報の芳香族化合物代謝経路との相違を見出すことができた。また、代謝酵素系の解析から 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸 2,3-ジオキシゲナーゼ^{16, 17)}以外に、新規な酵素として 2-アミノ-5-カルボキシシムコン酸 6-セミアルデヒド デアミナーゼ¹⁸⁾を見出し、その特性を明らかにすることができた。芳香族アミン類の基本となる化合物、2-アミノフェノールの誘導体である 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸の微生物代謝を明らかにすることで、今後他のアミン類の微生物分解についても参考になるであろうと考えられる。

今後の課題としては 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸代謝に関与する酵素遺伝子群およびそれらの制御機構を明らかにすることである。本代謝経路を構成する酵素系は全て誘導的に生合成されているが、酵素をコードする遺伝子群においては同一のオペロンを形成せず¹⁷⁾、DNA 上に酵素遺伝子が分散して存在している可能性が考えられる。それらを解析することで芳香族化合物の微生物代謝における新たな制御機構を見出すことが期待できる。

Summary

Bordetella sp. strain 10d grown on 4-amino-3-hydroxybenzoic acid as a sole carbon, nitrogen, and energy source. *Bordetella* sp. strain 10d metabolizes 4-amino-3-hydroxybenzoic acid via 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde. Cell extracts from 4-amino-3-hydroxybenzoate-grown cells showed high 4-amino-3-hydroxybenzoic acid 2,3-dioxygenase, 2-amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde deaminase, NAD⁺-dependent 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde dehydrogenase, 4-oxalocrotonate tautomerase, 4-oxalocrotonate decarboxylase, and 2-oxopent-4-enoate hydratase activities, but no 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde hydrolase activity. These enzymes involved in 4-amino-3-hydroxybenzoate metabolism were purified and characterized.

2-Amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde is an unstable intermediate in the *meta*-cleavage pathway of 4-amino-3-hydroxybenzoic acid in *Bordetella* sp. strain 10d. The enzyme was purified to homogeneity and characterized using a new coupled enzyme assay with 4-amino-3-hydroxybenzoic acid 2,3-dioxygenase. The enzyme is a homodimer with 15-kDa subunits. The deaminase from strain 10d contained an FAD-like cofactor as indicated by the absorption peak of the purified enzyme at 266 nm. The N-terminal amino acid sequence of the purified enzyme did not show significant levels of identity to sequences in database programs. The yellow compound formed from 4-amino-3-hydroxybenzoic acid by this purified enzyme and purified 4-amino-3-hydroxybenzoate 2,3-dioxygenase in a coupled assay was identified as 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde by GC-MS analysis. A mechanism for the formation of 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde via enzymatic deamination and nonenzymatic decarboxylation is proposed based on results of spectrophotometric analyses. The

purified enzyme, designated 2-amino-5-carboxymuconic 6-semialdehyde deaminase, is a new type of deaminase.

Unfortunately, we could not homogeneously purify the 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde dehydrogenase from strain 10d, but several properties were revealed. The dehydrogenase from strain 10d characterized in the present study had a broad substrate specificity and its dehydrogenase activity toward formaldehyde, acetaldehyde, propionaldehyde, butyraldehyde, and benzaldehyde. The dehydrogenase from strain 10d was inhibited by some sulfhydryl reagents.

The 4-oxalocrotonate tautomerase was purified to homogeneity and characterized. The enzyme is a homotetramer with 12-kDa subunits. The 4-tautomerase from strain 10d was inhibited by some metal ions, salts and sulfhydryl reagents. The tautomerase from strain 10d differed from that of other tautomerases in some properties.

4-Oxalocrotonate decarboxylase and 2-oxopent-4-enoate hydratase from strain 10d formed a complex in a molar ratio of 1:1. Analysis of the NH₂-terminal amino acid sequence of the 27 and 29 kDa proteins from strain 10d identified the proteins as 2-oxopent-4-enoate hydratase and 4-oxalocrotonate decarboxylase, respectively. The decarboxylase and hydratase from strain 10d differed from each other in most of these respects. Mg²⁺ was essential for both enzyme activities, but the decarboxylase was inhibited by other metal ions, sulfhydryl reagents, and chelate reagents, and the hydratase was inhibited only by Hg²⁺.

We propose a pathway for the metabolism of 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde in strain 10d via a dehydrogenative route based on the analysis of the enzymes and the identification of intermediates. Our results reported here indicated that strain 10d

does not have a 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde hydrolase involved in a hydrolytic. The metabolic pathway for 4-amino-3-hydroxybenzoic acid is similar to those for 2-aminophenol derivatives in the benzene-ring-cleavage step and the deamination step. However, the 4-amino-3-hydroxybenzoic acid metabolic pathway notably differs from these metabolic pathways after the deamination step. The pathway for 4-amino-3-hydroxybenzoic acid in strain 10d is similar to the protocatechuic acid pathway in *Bacillus circulans* in the oxidative cleavage between positions C2 and C3 of protocatechuic acid. However, after protocatechuic acid is converted to 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde via 2-hydroxy-5-carboxymuconic 6-semialdehyde, the 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde is metabolized via a dehydrogenative route and a hydrolytic route. We conclude that the metabolic pathway of 4-amino-3-hydroxybenzoic acid is different from those of other 2-aminophenolic compounds.

参考文献

1. “14102 の化学商品”, 化学工業日報社, 東京 (2002) .
2. S. F. Nishino and J. C. Spain, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2520-2525(1993).
3. T. Spiess, F Desiere., P. Fischer, J. C. Spain, H. J. Knackmuss and H. Lenke, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 446-452(1998).
4. E. Katsivela, V. Wray, D. H. Pieper and R. M. Wittich, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1405-1412(1999).
5. J. F. Wu, C. W. Sun, C. Y. Jiang, Z. P. Liu and S. J. Liu, *Arch. Microbiol.*, **183**, 1-8(2005).
6. T. Muraki, M. Taki, Y. Hasegawa, H. Iwaki and P. C. K. Lau, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1564-1572(2003).
7. S. F. Nishino, J. C. Spain and Z. He, Strategies for aerobic degradation of nitroaromatic compounds by bacteria: Process discovery to field application. In: J. C. Spain, J. B. Hughes, H. J. Knackmuss (eds) Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. Lewis publishers, NY. pp. 33-38(2000).
8. M. A. Hughes and P. A. Williams, *J. Bacteriol.*, **183**, 1225-1232(2001).
9. Z. He and J. C. Spain, *Arch. Microbiol.*, **171**, 309-16(1999).
10. J. K. Davis, Z. He, C. C. Somerville and J. C. Spain, *Arch. Microbiol.*, **172**, 330-339(1999).
11. S. Takenaka, S. Murakami, Y. J. Kim and K. Aoki, *Arch. Microbiol.*, **174**, 265-272(2000).
12. V. Shingler, J. Powlowski and U. Marklund, *J. Bacteriol.*, **174**, 711-724(1992).
13. U. Lendenmann and J. C. Spain, *J. Bacteriol.*, **178**, 6227-6232(1996).
14. Z. He and J. C. Spain, *J. Bacteriol.*, **180**, 2502-2506(1998).

15. H. S. Park and H.S. Kim, *J. Bacteriol.*, **183**, 5074-5081(2001).
16. S. Takenaka, T. Asami, C. Orii, S. Murakami and K. Aoki, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 5871-5877(2002).
17. S. Murakami, Y. Sawami, S. Takenaka and K. Aoki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 489-494(2004).
18. C. Orii, S. Takenaka, S. Murakami and K. Aoki, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3248-3254(2004).
19. K. Aoki, N. Kodama, S. Murakami and R. Shinke, *Microbiol. Res.*, **152**, 129-135(1997).
20. M. Nozaki, *Methods. enzymol.*, Academic press, New York, **17A**, 522-525(1970).
21. R. H. Wiley and A. J. Hart, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1942-1944(1954).
22. W. L. Collinsworth, P. J. Chapman and S. Dagley, *J. Bacteriol.*, **113**, 922-931(1973).
23. L. H. Chen, G. L. Kenyon, F. Curtin, S. Harayama, M. E. Bembenek, G. Hajipour and C. P. Whitman, *J. Biol. Chem.*, **267**, 17716-17721(1992).
24. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275(1951).
25. B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427(1964).
26. K. Weber and M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412(1969).
27. P. Matsudaira, *J. Biol. Chem.*, **262**, 10035-10038(1987).
28. P. Klatt, K. Schmidt, E. R. Werner and B. Mayer, *Methods. Enzymol.*, **268**, 358-365(1996).
29. S. A. Cook and A. K. Shiemke, *Arch. Biochem. Biophys.*, **398**, 32-40(2002).
30. K. Koile, Y. Hakamada, T. Yoshimatsu, T. Kobayashi and S. Ito, *Biosci. Biotech.*

- Biochem.*, **60**, 1764-1767(1996).
31. S. Takenaka S. Murakami R. Shinke and K. Aoki, *Arch. Microbiol.*, **170**, 132-137(1998).
 32. K. P. C. Vollhardt and N. E. Schore, Organic chemistry: Structure and Function IN (K. P. C. Vollhardt and N. E. Schore N. E., eds), W.H. Freeman, New York., pp. 1045-1046(1998).
 33. R. L. Crawford, *J. Bacteriol.*, **121**, 531-536(1975).
 34. V. Job, G. L. Marcone, M. S. Pilone and L. Pollegioni, *J. Biol. Chem.*, **277**, 6985-6993(2002).
 35. Y. Nishiya and T. Imanaka, *FEBS Lett.*, **438**, 263-266(1998).
 36. L. Pollegioni, F. Ceciliani, B. Curti, S. Ronchi and M. S. Pilone, *Biochem. J.*, **310**, 577-583(1995).
 37. H. Lineweaver, and D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658-666(1934).
 38. J. Inoue, J. P. Shaw, M. Reikik and S. Harayama, *J. Bacteriol.*, **177**, 1196-1201(1995).
 39. S. Harayama, M. Reikik, K. L. Ngai and L.N. Ornston, *J. Bacteriol.*, **171**, 6251-6258(1989).
 40. R. G. Annett and G. W. Kosicki, *J. Biol. Chem.*, **244**, 2059-2067(1969).
 41. S. Dagley and D. T. Gibson, *Biochem. J.*, **95**, 466-474(1965).
 42. H. Arai, T. Ohishi, M. Y. Chang and T. Kudo, *Microbiology.*, **146**, 1707-1715(2000).

謝辞

本論文をまとめるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました青木健次教授、山形裕士教授、竹田真木生教授に心より感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始適切なご指導をいただきました青木健次教授、竹中慎治助手、有益なご助言をいただきました村上周一郎助教授に深く感謝いたします。

自然科学研究科生命科学専攻生命化学講座の皆様、ならびに農学部生物機能化学微生物機能化学講座の皆様には、研究の現場においてともに研究できたことを感謝いたします。