

Title	酵素間の相互作用に関する研究
Author(s)	堀内, 成人
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/28169
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

【11】

氏名・(本籍)	堀	内	成	人
	ほり	うち	なる	と
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	3	8	号
学位授与の日付	昭和34年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科生理系 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	酵素間の相互作用に関する研究			
	(主査)		(副査)	
論文審査委員	教授 久保 秀雄	教授 市原 硬	教授 須田 正巳	

論文内容の要旨

(1) 目的

最近 mitochondria microsome 等の複合酵素系についての研究が活発に行われ、これら諸酵素間の相互作用の機構について討論されている。これにふれる一つの足場として、DPN 酵素間における相互交渉は岩坪、亘らによって認められ、Nygard, Kaplanらも同じ方向に研究を進めている。この現象を更にフラビン酵素について検討した結果、山野らはキサンチン酸化酵素に固く結合した FAD が遊離のものと同様、D-アミノ酸々化酵素の補酵素として働き得ることを見出した。

著者はこの成績を更に詳細に検討し、キサンチン酸化酵素の FAD が Negelein-Brömel 蛋白の補酵素作用をあらわす場合、キサンチン酸化酵素から離れて NB 蛋白側に移行するものか否かを明らかにするとともに、NB-XO 複合酵素系於ける基質から各種水素受容体に至る水素運搬機構について調べた。

(2) 方法

Negelein-Brömel 蛋白：教室の方法によって、豚腎より精製結晶した D-アミノ酸々化酵素に、Warburg の酸性処理を施して脱フラビンをした。

キサンチン酸化酵素：Ball の方法を改良して生牛乳より抽出。

Cytochrome c：奥貫等の方法でイーストより抽出。

実験方法としては主として無酸素的 Thunberg 管法によった。即ち恒温槽に設置した干渉フィルター光電分光光度計、および日立自記成分光光度計で Thunberg 管内の反応の進行を追跡した。

(3) 結果

1. NB蛋白と FAD のメタクロマジーについて

NB 蛋白に遊離 FAD を加えた場合その最大吸収 $450m\mu$ は $465m\mu$ にづれる。一方 XO の FAD のそれは $450m\mu$ である。XO に NB 蛋白を加えても最大吸収は $450m\mu$ のままである。この事か

ら XO の FAD が遊離して NB 蛋白へ移ったものではないといえる。

2. XO-NB 蛋白で Xanthine を基質とした場合に Alanine を加えると Xanthine の酸化はどうか
Xanthine が酸化して生じる尿酸を $295\mu\text{M}$ で追求した。XO-NB 系に Alanine を追加しても尿酸の産成はさまたげられない。この場合も XO の FAD ははづれていないと考えられる。

3. XO-NB 蛋白系で Alanine を基質とした場合に Xanthine を加えると Alanine の酸化はどうか、
Alanine が酸化して生じる焦性ブドウ酸を定量した。XO-NB 系に Xanthine が共存すると焦性ブドウ酸の産成は Alanine 単独の場合よりやや少くなる。

4. Cytochrome c の還元

XO-NB 蛋白系で Alanine を基質とすると無酸素的にはかなりの速度で Cytochrome c を還元する、一方遊離 FAD-NB 蛋白系ではその還元は約 $\frac{1}{4}$ に低下する。XO-NB 蛋白系に遊離 FAD を加えていくと次第に Cytochrome c の還元速度はおそくなり、 $[\text{XO.FAD}] = [\text{Free.FAD}]$ とするとその速度は XO-NB 蛋白系と遊離 FAD-NB 蛋白系の算術平均となる。即ち遊離 FAD と XO の FAD とが NB 蛋白に対し拮抗していると考えられる。

5. 種々の酸化還元色素を受容体とした場合

O-Chlorophenol-indo2 : 6 dichlorophenol ($E'_0 = 0.254\text{V}$, PH7.0) methylen blue ($E'_0 = 0.011\text{V}$, PH7.0) は遊離 FAD-NB 蛋白系, XO-NB 蛋白系ともに Alanine より水素受容体となり得る。一方 XO で Xanthine を基質とした場合に水素受容体となり得る。Indigotrisulphonate ($E'_0 = -0.081\text{V}$, PH7.0) Ni-leblne ($E'_0 = -0.116 \sim -0.150\text{V}$, PH7.0) 等は Alanine を基質とした XO-NB 蛋白系の水素受容体とはならない。

6. methylen blue を受容体としたときの Adenine の阻害

XO が Xanthine と基質とする場合の強力な阻害剤である。Adenine は高濃度でも, Alanine を基質とした XO-NB 蛋白系には阻害を示さない。これによって Alanine の酸化は XO-NB 蛋白系に於て NB 蛋白側で起っていると考えられる。

(4) 総括

XO-NB 蛋白系に於て FAD はキサンチン酸化酵素に結びついたままであり, Alanine を酸化する時も XO から離れていない。又この系で同時に Alanine 酸化反応を行わしても Xanthine の酸化速度は全く影響をうけない。

Adenine の阻害が現れない XO-NB 蛋白系に於て, Alanine の酸化は NB 蛋白側で行われる。ここで移動した水素は FAD を介して XO の電子運搬系を通り, Cytochrome c に電子を与える。

種々の E'_0 の異った色素との反応性から XO-NB-Alanine 系の E'_0 は XO-Xanthine 系の E'_0 に比べて高く, TrissF AD-NB-Alanine 系の E'_0 に近いものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

目 的

作用族を共有する二つのフラビン酵素(キサンチン酸化酵素及び D-アミノ酸々化酵素)間の相互交渉を

調べ、その水素運搬機構を知る。

材料と方法

D- アミノ酸々化酵素のアポ酵素(Negelein-Brömelの蛋白)：

久保らの方法により腎臓から結晶化したD-アミノ酸々化酵素に Warburg の脱フラビン操作を施したもの。純度 60~100%のものを使用。

キサンチン酸化酵素： Ballll の方法を改良した著者の方法により牛乳より分離，超遠心より精製。純度85%以上。

チトクローム c： 奥貫法により酵母より抽出純化したもの。

実験成績

キサンチン酸化酵素に結合した FAD が、D- アミノ酸々化酵素の FAD の代りとして働きうるという山野らの成績に続いて、著者は、

アラニン→(NB+XO)→チトクローム c(或は色素)

の系における水素運搬機構を調べ、興味ある成績を得ている。

この反応に於て最も注意すべき点は (NB+XO) 系に於て FAD が XO から離れて NB 側に移っていないかどうかの証明であって、著者はこの問題を次のようにして解決している。

1. (NB+XO)単独に存在する場合

D- アミノ酸々化酵素及びキサンチン酸化酵素に含まれる FAD は夫々特徴ある吸収極大を示す。

NB=FAD.....465 m μ

XO450 m μ

もし(NB+XO)系に於て FAD が XO から NB 側に移るところの混合系の吸収スペクトルは 465m μ に極大をもつ筈である。実測の結果は450m μ に極大をもつ。それ故 FAD は XO に結合したままである。

2. アラニン+(NB+XO)→焦性ブドウ酸+NH₄⁺+(NB+XO=H₂)

アラニンを添加した場合、基質が加わることにより、瞬間的に XO から NB に FAD が転移する可能性がある。もしこのときこの系にキサンチンを加えると、キサンチンの酸化は XO 中に FAD がなくなっている為、遅くなる筈である。

① キサンチン+XO→尿酸+XOH₂

② アラニン+(NB+XO)+キサンチン→焦性ブドウ酸+尿酸+(NB+XOH₂)

この二つの反応に於ける尿酸生成速度を 295m μ の吸収から測定したところ、尿酸主成速度は等しかった。

それ故アラニン酸化のときだけ FAD が XO からNBに移行したとは考えられず、FAD は XO に結合したままで働いている。

3. 逆に焦性ブドウ酸の生成を調べたときもキサンチン添加によってやや遅くなるのみであった。

4. アラニン酸化の行われる場処。

キサンチン酸化を強く拮抗的に抑制するアデニンを加えても、(NB+XO)系によるアラニン酸化は抑制をうけない。それ故アラニンは NB 蛋白側に結合され酸化をうける。

5. アラニン→(NB+XO)→チトクローム c における電子運搬機構

次の3つの場合を比較する。

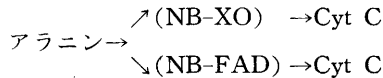
- (1) アラニン→(NB+XO)→チトクローム c
- (2) アラニン→(NB+XO+FAD)→チトクローム c
- (3) アラニン→(NB+FAD)→チトクローム c

(1)が最も速かであり各速度は次の通り

$$\Delta E_{550}/30\text{分}$$

- (1) 0.244
- (2) 0.144
- (3) 0.065

(2)の反応速度は(1)と(3)の平均 $\frac{0.224+0.065}{2} = 0.145$ と誤差3%で一致している。すなわち、(2)は



の道で反応が進んだものと考えられる。このことから NB 蛋白は XO 及び FAD に対し等しい親和性を示したといえる。又 FAD と XO は NB に対し拮抗的に結合したとも考えられる。これからNBの同一の場所に両者が交渉をもつといえる。この実験から、XO の FAD が離れて NB 側に移る事も否定出来る。もし移るものなら(1)(2)(3)の反応はすべて同一速度で進行する筈であるから。

(2)に於て FAD を増せば速度は(3)に近づく。

6. アラニン→(NB+XO)→酸化還元色素系における水素運伝

E'_0 の異った種々の色素が上記の反応によって還元される速度を調べてみると $E'_0 = (0.25 \sim 0.01 \text{ volt})$ の間の色素は還元をうけるが $E'_0 = (-0.081 \text{ volt以下})$ の電位の低い色素は還元されない。

それ故アラニン-(NB+XO)系の E'_0 は 0 volt に近いものと推定される。これに対しキサンチン-XO 系では電位の低い色素も還元し、前者に比べて遙かに E'_0 が低いと考えられる。

以上の成績を総括すると D- アミノ酸々化酵素は遊離 FAD と同様にキサンチン酸化酵素に結合した FAD を作用族として働くことができ、その水素(電子)運伝機構が明らかにされたといえる。

この成績は従来考えられていた酵素反応機構に対して一新知見を提供し得たものと見るべきものであり、学位論文たるに価するものと思われる。