The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	キサンチン酸化酵素系の分光分析および電子スピン共鳴による研究
Author(s)	魚住, 光郎
Citation	大阪大学, 1965, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28821
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【66】

氏　名・(本籍)	魚　住　光　郎（うお ずみ みつ ろう）
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　6 3 2　号
学位授与の日付	昭 和 40 年 3 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**キサンチン酸化酵素系の分光分析および電子スピン共鳴による研究**
論文審査委員	(主査) 教 授 久保　秀雄　(副査) 教 授 岩間　吉也　教 授 山野　俊雄

論　文　内　容　の　要　旨

〔研究目的〕

キサンチン酸化酵素は助酵素 FAD の他に M_o と F_e を含む。これらの素子が基質の酸化と共転してそれぞれ還元される。これは周知のことであるが，それでは，これらの素子が酵素反応の上で，どのような特異的な役割を演じているのか，さらに電子伝通系として，どのような順序性をもつものかについては明らかではない。これを解明しようとするのがわたしの研究目的である。

〔研究方針〕

FAD から生じる遊離基が見つけ出されている。 FAD と FADH とは光吸収の極大を異にする。ここに分光分析が有力な手段となる。 金属イオンの原子価変動に伴い， 常磁性が出現する。 遊離基 FADH と共にマイクロ波を吸収する。 ここに電子スピン共鳴が適切な研究示標となる。 分光分析と電子スピン共鳴とは相補的に知見を提供する。この観点にたってキサンチン酸化酵素の反応機転を追究しようとした。これがわたしの研究方針であった。これらの方法によるために不可欠の条件は，酵素試料の量において大きくその質において純であることである。ここに酵素試料の量と質を挙げる精製法を検討しなければならない。先人の方法を比較追試し，適切な改良法を工夫することを予備研究とした。

〔方法および実験成績〕

燐酸緩衝液（pH 7.0，0.1M）を溶媒とした時，キサンチン酸化酵素は燐酸カルシウム・ゲルに強く吸着され硫安を加えてイオン強度を上げると溶出される。この性質を有効に活用して，牛乳キサンチン酸化酵素を他の蛋白質より分離し精製する。

示されている酵素液 (1) あるいは，酵素液 (2) を硫安分画か結晶化の方法によって更に純化する。

このようにして容易かつ収量の大きいキサンチン酸化酵素を得るに至った。その物理化学的性質は

牛　乳
↓ 第二燐酸ナトリウム（0.1 M）に分散（40 °C）遠心してクリームをのぞく
抽出液
↓ 燐酸カルシウムゲルに吸着させて上清をすてる沈澱より酵素液を溶出する
酵素液(1)
↓ 燐酸カルシウムゲルに吸着させて上清をすてる沈澱より酵素液を溶出する
酵素液(2)

繁雑であり収量の少ない Avis の方法で得たものに優るものである。

キサンチン酸化酵素に基質を加えて変化する可視部吸収スペクトルは，酵素に含まれる FAD の還元に対応する変化の他に，470 mμ に吸収極大をもち，430 mμ ならびに 500～600mμ に肩をもつ物質による変化との２つの吸収曲線構成成分に分けられる。

嫌気状態で酵素に基質を作用させて，酵素の可視部吸収スペクトルの変化と基質の変化を定量的にしらべると，酵素側の E 450mμ は Morell のいう活性酵素と不活性酵素に対応する二相性の変化を示すが，基質の変化は一相性に経過し，E 450 mμ が変化しない中間の時期においても基質は酸化されつづける。この E 450 mμ の変化が認められない時期における基質の変化に対応する酵素内での変化は，$F_e^{+3} \rightarrow F_e^{+2}$ であることは，定量的に証明される。このことから，FAD 以外の他の発色群は M_0 の化合物であるとしてよい。溶液中に酸素が存在するとき，基質の作用によって FAD はただちに還元されるが，FAD以外の発色群すなわち M_0 化合物は褪色せず，溶液中の酸素がなくなってはじめて褪色する。このことは，FAD は分子状酸素とは反応しにくいが M_0 の還元型は酸素と反応しやすく，その反応が非常に速やかで，酸素の存在するかぎり M_0 の還元が進まないことを意味している。

キサンチン酸化酵素は，酸化型で電子スピン共鳴吸収を示さないが，基質を加えると吸収が見られる。これは，酵素系が還元されて，$F\dot{A}DH$ と M_0^{+5} による電子スピン共鳴吸収が現われた結果である。

$F\dot{A}DH$ は g=2.00 に M_0^{+5} は g=1.96 に吸収の山をもち，その吸収の強度は反応の進行に伴い，時間的に変化する。一般にある反応の進行に伴う電子スピン共鳴吸収の変化を，ごく短時間で測定するには，rapûd flow 法によって，水溶液状態で行ない得る。この方法を用いるに当り磁場固定，磁場変換，磁場櫛形掃引の三法を検討したが，いずれも現在の段階での電子スピン共鳴装置の精度では，酵素を試料とする実験に対しては感度が不足している。この難点を避ける途は，測定を低温（−196° C）で行なえばよい。そのため反応開始後，限られた短時間で反応を停止させるため，液を凍粘する方法を工夫した。これをキサンチン酸化酵素に適用し，その基質による還元に伴う電子スピン共鳴吸収の変化を追跡した。

キサンチン酸化酵素を基質で還元したとき見られる E 450mμ の二相性減少に対応して，FADHと M_0^{+5}のに基づく吸収の増減が認められる。これは，$FAD \rightarrow F\dot{A}DH \rightarrow FADH_2$ および $M_0^{+6} \rightarrow M_0^{+5} \rightarrow M_0^{+4}$ の変化がほぼ平行して，二相性に起っていると考えると説明される。

好気的条件で基質を加えたときは，嫌気のときに比べて M_0^{+5} の吸収強度が著しく大きい。これは，$M_0^{+5} \underset{O_2}{\rightleftarrows} M_0^{+4}$ なる反応の右側より左側に傾くためと見られる。同一実験条件で，E 450mμ の変化と M_0^{+5} の吸収強度の変化を観測し照合してみると，溶液中の酸素が消費されてから減少する E 450mμ の変化と，$M_0^{+5} \rightarrow M_0^{+4}$ による M_0^{+5} の吸収の減少がよく平行する。

〔総　　括〕

準乳キサンチン酸化酵素を燐酸カルシウムゲルに吸着させ効率よく精製し得た。

キサンチン酸化酵素において次のように電子伝達がなされていると推論される。

基質⟶(FAD, M_0)活性⟶F_e⟶(FAD, M_0)不活性

金属モリブデンの酸化型は可視部に吸収をもち，470mμ に極大，430mμ と 500～600 mμ に肩を示すのを特徴とする。キサンチン酸化酵素の脱水素機転を始動するものは，FAD であり自酸化的役割を果すものは，金属モリブデンである。従って，前者は，この酵素に脱水素酵素的性格を，後者は酸化酵素的性格を与えていると結論される。

論文の審査結果の要旨

第一編はキサンチン酸化酵素の純化結晶化法の改良の検討，得たる酵素の物理化学的性質の同定について述べ，第二編においては，この酵素系の反応に伴う可視部光吸収の解析，第三編では電子スピン共鳴吸収を目標として遊離基の出現と変動および常磁性金属イオンの検出と消長につき，その成績を述べている。その結論として，この酵素系における各要素間を移動する電子の道筋を帰納している。

助酵素 FAD と遊離基 $FAD\dot{H}$ とは可視部極大吸収位置を異にする。これにより FAD-FAD 相互間の電子移動が捉えられる。不対電子をもつ $FAD\dot{H}$ と F_e^{+2}, M_0^{+5}, M_0^{+3} は ESR 応答を示す。こうして分光分析と ESR とは相補的に知見を提供する。

著者の提示している酵素純化法の特徴は燐酸カルシウムゲルを適当操作段階に加えるにある。操作は簡単化され，収量は10の単位で倍加する。

この酵素の発色群は FAD と M_0 化合物による二つである。450 mμ の吸収は二相性に変化する。一相と他相との中間において動的平衡として変化しない時期がある。このときにおける電子受容体は鉄原子であることは定量的に証明できる。化学組成は同じであるが電子状態の異なる FAD 換言すると正常状態 FAD と励起状態 FAD との橋渡しをするものとして F_e^{+3} の存在理由が認められる。

溶液中に用いらるべき酸素が存在する間は FAD は還元されるが M_0^{+6} の還元は起らない。酸素が存在しなくなると M_0 の還元が始まる。FAD の還元は酸素の存否に直接従属しない。FAD は脱水素酵素的に M_0 は酸化酵素的に作用し，F_e は FAD の励起に関係する。

この酵素における ESR 吸収は 3 ケ所に見られる。第一のものは g=2.00, △H=16 gauss, 第二のものは g=1.96, △H=24 gauss, 第三のものは g=2.1, △H=400～500 gauss, FAD, M_0^{+5}, F_e^{+3} のシグナルである。

これらのシグナルの出現と消長を時間的に追い，FAD→$FAD\dot{H}$→$FADH_2$ と M_0^{+6}→M_0^{+5}→M_0^{+4} との相関を分析することによって，これに基質量の変化と酸素圧の消長なる相反するベクトル的圧を加えて，この動向から，好気と嫌気での M_0 の態度を抽象し，次のように結んでいる。

キサンチン酸化酵素においては，いわゆる活性酵素と不活性酵素間の電子伝達をするものは F_e^{+3}→

F_e^{+2} であり，FAD は FAD→$F\dot{A}DH$→$FADH_2$ と還元され，M_0 は FAD より電子をとって M_0^{+6}→M_0^{+5}→M_0^{+4} と還元され，M_0 イオンの還元型は酸素により直接酸化され，酵素反応は進められる。

キサンチン酸化酵素の脱水素機転を始動するものは FAD であり，自酸化的役割を果すものは金属モリブデンであり，いわゆる不活性酵素の助酵素的作用を営むものは鉄イオンである。

以上の成績を通覧するに，助酵素 FAD の他に，鉄，モリブデンを含み，かつ，FAD に反応の遅速二様の状態をもつ複雑なる酵素の営む電子伝達径路を位置づけた点において学位論文としての価値あるものと認める。