

Title	チトクロームbの研究
Author(s)	大西, 権
Citation	大阪大学, 1965, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28858
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 1 】

氏名・(本籍)	大 西 権 おおにしけん
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 7 6 0 号
学位授与の日付	昭 和 4 0 年 6 月 1 7 日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	チトクロームbの研究
論文審査委員	(主査) 教 授 奥 貫 一 男 (副査) 教 授 二 国 二 郎 教 授 佐 藤 了 教 授 成 田 耕 造

論 文 内 容 の 要 旨

牛心筋及び家バエ幼虫よりチトクロームbを単離精製し、その諸性質を比較検討した。論文は3部に大別され第1部では牛心筋より、第2部では家バエ幼虫よりおのおのチトクロームbの精製法及び得られた標品の性質を調べ第3部でそれらの性質を比較している。牛心筋よりの精製はコール酸による抽出沈澱法による単離、細菌プロティナーゼによる可溶化、ゲルろ過、イオン交換セルローズによるクロマトグラフィーを経て精製標品を得た。得られた標品は表面活性剤により可溶化されており、その吸収スペクトルは還元型で561.5, 531, 428.5m μ に吸収極大を示す。ヘム含量分析による最小分子量は21,300であった。嫌気条件下で酵母乳酸脱水素酵素存在下、乳酸により還元を受ける。スペクトルの観察からこの標品はCOとの結合能を持っており著しい自動酸化能を示すことが知られた。家バエ幼虫からは硫酸水溶液でチトクロームbが容易に抽出され、イオン交換樹脂で不純物をできるだけ除いた後ハイドロキシルアパタイトによるクロマトグラフィーを行なって精製を進め最後に結晶標品を得た。この標品は水溶性で吸収スペクトルは還元型で563, 530, 428.5m μ に吸収極大を示し、沈降平衡法による分子量測定で23,000を得た。これはヘム含量分析より得た最小分子量23,400とよく一致している。標品は弱い自動酸化能を示すがCOとは結合物をつくらない。酵母乳酸脱水素酵素により、この幼虫チトクロームbも還元されることが観察された。COとの結合性はヘム蛋白の変性の表示として使われていることから牛心筋チトクロームbはその精製過程で何らかの変化を受けており幼虫からはnativeな標品が得られたと考えられる。両チトクロームbのアミノ酸分析を行なった結果牛心筋のものは幼虫のものに比べて疎水性の残基が多く含まれており精製標品が一方は表面活性剤によってのみ可溶化されているのに対し他方(幼虫)は水溶性ヘム蛋白であるという性質をよく反映している。アミノ酸分析から推定される分子量は各チトクロームbとも前に得た値とおのおのよく一致していた。超遠心分析による観察から牛心筋チトクロームbは大きく会合しておりおそらく表面

活性剤とともにミセル状態になっていると考えられる。一方幼虫チトクローム b は monomer として水溶液になっていることが知られた。両チトクローム b の電子伝達因子としての性質を比較した結果牛心筋チトクローム b は幼虫のそれより低い酸化還元電位を示しているのに酵母より得た電子供与系, DPNH-チトクローム c 還元酵素存在下で DPNH による還元は牛心筋チトクローム b にのみ起り幼虫チトクローム b ではこの反応は起らなかった。これは両チトクローム b の酵素に対する親和性のちがいによるものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

大西権君の論文「チトクローム b の研究」は 3 篇からなり、ウシ心筋チトクローム (以下 Cyt) b とイエバエの幼虫から結晶化した Cyt b との性質を比較したものである。

第 1 篇ではウシ心筋 Cyt b の精製法を検討し、細菌プロティナーゼ法を確立した。すなわち、コール酸塩と硫酸アンモニウムを用いて抽出した Cyt b·c₁ 複合体から Cyt b をふくむ劃分を沈澱させ、微量の細菌プロティナーゼを加えて Cyt b を可溶化し、逐次、セハデックスおよび DEAE セルローズカラムを用いたクロマトグラフィーを施して残存プロティナーゼとタンパク質の部分消化生成物を除去して安定な Cyt b 標品を得た。その間、Cyt a, b および c₁ の各成分を単離するのに最適なコール酸塩濃度をそれぞれ決定し、超遠心分析および電気泳動的に均一質な Cyt b 標品を用いて、プロトヘム当りの最小分子量を 21,300 と測定したが、界面活性剤を含む溶液に可溶化した Cyt b 標品は会合して大きな粒子として存在することを明らかにした。

第 2 篇ではイエバエ幼虫の Cyt b を単離結晶化した結果を記している。イエバエ幼虫の Cyt b は硫酸アンモニウム溶液で抽出され、その 50%—90% 飽和で塩析される。これを集めて水にとかし、Amberlite CG 50 のカチオン交換樹脂カラム (0.02M リン酸塩緩衝液, pH 7.0) を通過させて Cyt c と分別、同緩衝液に平衡にした Duolite A 2 カラムにクロマトグラフィーを施して夾雑色素を除去、DEAE セルローズカラム (0.02M リン酸塩緩衝液, pH 8.0) を用いて共存する Cyt b₅₅₅ を分別後、流出液に硫酸アンモニウム 60%—90% 飽和で塩析する Cyt b₅₅₅ を集めて水にとかし、ヒドロキシルアパタイトカラム (0.02M リン酸塩緩衝液, pH 7.0) にクロマトグラフィーを施して精製、濃縮した標品に少しにごる程度に硫酸アンモニウムを加えて氷室に放置結晶化した。この結晶 Cyt b もプロトヘムを配合族とし、その 1 分子当りの最小分子量は 23,000 で典型的 Cyt b の吸収曲線をもつものである。一酸化炭素や青酸と結合しないが、自酸化性をあらわすことならびにペルオキシダーゼ活性をもたないことを明示した。

第 3 篇においてはウシ心筋およびイエバエ幼虫の Cyt b のアミノ酸分析を行なって、前者の疎水性、後者の親水性が、それぞれ構成アミノ酸の疎水性アミノ酸残基含量と親水性アミノ酸残基含量の差異にもとづくものとして説明できる根拠をあげた。また、酵母の還元助酵素—Cyt c 還元酵素を用いて、ウシ心筋 Cyt b は還元されるが、イエバエ幼虫のそれには親和性がみとめられないこと、前者の規準電位 -21mV、後者のそれは +11mV よりも少し高いことなど、物理化学的性質の差異の

あることを明らかにした。

要するに大西君の業績は精製困難とされていたウシ心筋 Cyt b の精製法を確立し、イエバエ幼虫の Cyt b を結晶化して両者の諸性質を比較検討したもので、生化学の知見に寄与するところが大である。のみならず、イエバエ幼虫の可溶性 Cyt b が変態によって不溶性の成虫 Cyt b になることを指摘し昆虫発生学にも新知見を寄与したものであるから、同君の論文は理学博士の学位論文として十分の価値あるものと認める。