



Title	キサンチン酸化酵素系の分光および蛍光測光法による反応機作の研究
Author(s)	木下, 龜雄
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/29556">https://hdl.handle.net/11094/29556</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	木下 龜雄
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1375 号
学位授与の日付	昭和 43 年 3 月 28 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
学位論文名	キサンチン酸化酵素系の分光および蛍光測光法による反応機作の研究
論文審査委員	(主査) 教授 中馬 一郎 (副査) 教授 山野 俊雄 教授 田中 武彦

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

生体内における酸化還元系には種々の酵素が関与するが、なかでも活性基に金属を含むフラビン蛋白質（金属フラビン酵素）の電子伝達系における生理的意義が近時注目されつつある。しかしながら、これら酵素の作用機作については知見に乏しく、とくに補欠分子族としてのフラビンおよび金属が酵素反応においていかなる位置を占め、またいかなる役割を果しているかについては議論の多いところである。

そこで著者は金属フラビン酵素としてフラビンアデニン・ジヌクレオチド (FAD), モリブデンおよび鉄を補欠分子族とするキサンチン酸化酵素を選びその反応に際してこれらの補欠分子族がどのような反応機構で反応に関与するかという点を中心に分光および蛍光測光法を用いて追求した。また本酵素反応に対するキレート剤の効果を検索し、さらにこれらの成績から反応模式を設定してアナログ計算機による速度論的解析を試みた。

## 〔方法〕

キサンチン酸化酵素は牛乳から久保らの方法で抽出精製し PFR (E<sub>280</sub>m $\mu$ /E<sub>450</sub>m $\mu$ ) が約 6, Avis らの比活性が APR 5 ~ 9 の酵素標品を実験に使用した。分光測光には島津 IV-50 型, Beckman DK-2 型, 日立 RSP-2 型ラピッドキャンニング分光光度計を使用し, 蛍光測定には日立 MPF-2 型蛍光光度計を用いた。基質としてはヒポキサンチンを, 受容体として酸素およびメチレン青を用い, 酸素消費量の測定は Clark 型酸素電極により, メチレン青還元は 665 m $\mu$  の吸光度測定により行った。嫌気条件での実験は光路長 1.0cm の Thunberg 型キュベットを使用して行った。また速度論的解析には日立 ALS-1000 型アナログ計算機を使用した。

## 〔成績〕

好気条件において酵素溶液に基質を添加すると酵素は還元されて  $450 \text{ m}\mu$  の吸光度が減少するがその経過は2相性である。

一方、嫌気条件において、 $450 \text{ m}\mu$  の吸光度は基質添加直後に好気反応の最終状態まで急速に減少しその後非常にゆっくりと減少した。この際、螢光強度は単調に減少し、 $450 \text{ m}\mu$  の吸光度の変化とは平行しないことを認めた。

好気条件で  $450 \text{ m}\mu$  の吸光度が2相性変化を示すときの可視部吸収スペクトルの変化をラピッド・スキャニング法で測定し反応各段階の差スペクトルを求めるとき、それぞれ  $450 \text{ m}\mu$  に極大を示すがいずれも FAD の吸収スペクトルとは一致しなかった。

これらの結果から、 $450 \text{ m}\mu$  の吸光度の変化はフラビン分子の還元のみを表わすものではなく他の発色団の変化をも含むものであることが推測される。

次に本酵素と熱変性により酵素から遊離した FAD との差スペクトルを求めたところ  $420$  および  $470 \text{ m}\mu$  に極大をもつスペクトルが得られ、これと等しい吸収スペクトルをもつ発色団が本酵素に存在することを示唆した。このスペクトルの概形は、一般の非ヘム鉄蛋白のそれと酷似しており、おそらく Fe によるものと考える。

本酵素反応系にキレート剤を添加し酸素消費およびメチレン青還元に対する影響を検討した。O-phenanthroline は酸素消費およびメチレン青還元を阻害し、その作用型式は酸素およびメチレン青に対して拮抗的であり、EDTA はメチレン青還元には効果はないが酸素消費を阻害し、酸素に対して拮抗的であった。 $\alpha, \alpha$ -dipyridyl は酸素消費およびメチレン青還元の両者を阻害し、基質に対して拮抗的であった。一方、Tiron は酸素消費を促進しメチレン青還元の還元経過を変化させることを観察した。

以上のキレート剤の作用を検討するため反応模式を設定し、それに基いて速度式を導きアノログ計算機を用いて解を求め実験結果と比較検討した結果本酵素反応においては酸素およびメチレン青への電子移動は別々の部位からなされるという結論を得た。また Tiron の作用についてはフラビン-金属間の酵素分子内電子移動を容易にするために酸素消費に促進されメチレン青還元経過は変形されるものであると推論した。

#### 〔総括〕

- 1) 好気、嫌気両条件において、基質添加後の本酵素の  $450 \text{ m}\mu$  の吸光度とフラビン螢光強度の時間変化は一致しなかった。
- 2) 好気条件の各反応段階から求めた差スペクトルはいずれも FAD の吸収スペクトルとは一致しなかった。
- 3) 本酵素の可視部吸収スペクトルから本酵素に含まれる FAD の吸収スペクトルを差引くと  $420$  および  $470 \text{ m}\mu$  に極大をもつ差スペクトルが得られた。
- 4) キレート剤を添加すると本酵素反応による酸素消費およびメチレン青還元は変化を受ける。
- 5) アノログ計算機による速度論的解析から酸素およびメチレン青への電子移動は別個の部位からなされていると考えられる。
- 6) 以上の結果から本酵素反応には 3) で述べた差スペクトルと同様の吸収スペクトルを示す発色

団, おそらく非ヘム鉄が関与しこれが本酵素反応の電子伝達経路の一員になっているであろうと推論した。

### 論文の審査結果の要旨

本論文は分光および螢光測光法によりキサンチン酸化酵素反応を追跡し, FAD分子以外の他の発色団, おそらく非ヘム鉄の関与を指摘し, キレート剤の効果から本酵素反応の電子伝達の一端を鉄原子がになっていることを明らかにしている。本酵素反応にFAD分子と並んで非ヘム鉄の関与を指摘した点はこの分野の研究に貢献するものである。