



| | |
|--------------|---|
| Title | 牛心筋チトクロム酸化酵素の機能単位に関する研究 |
| Author(s) | 都築, 紀宏 |
| Citation | 大阪大学, 1969, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/29714 |
| 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。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【14】

| | |
|---------|--|
| 氏名・(本籍) | 都 築 紀 宏 づき とし ひろ |
| 学位の種類 | 理 学 博 士 |
| 学位記番号 | 第 1 6 1 1 号 |
| 学位授与の日付 | 昭 和 4 4 年 3 月 2 8 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 | 牛心筋チトクロム酸化酵素の機能単位に関する研究 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 奥貫 一男 (副査) 教授 佐藤 了 教授 萩原 文二 |

論 文 内 容 の 要 旨

心筋型電子伝達系におけるチトクロム酸化酵素の生物学的意義は充分明らかにされているが、その構成成分及び作用機作に関してはいまだ不明な点が多々ある。本論文は奥貫らの方法で精製した牛心筋チトクロム a 標品（以下チトクロム酸化酵素と記す）の属性を種々検討したものである。当酵素標品は 4 量体（ヘム a を基準にする。ヘム a 当りの分子量は 10~12 万）として存在するが、表面活性剤の作用で 2 量体に解離する時にのみ酵素活性の増大がみられ、2 量体が更に分解する際には必須成分として含まれている銅の遊離、その ESR スペクトルの変化、急激な酵素活性の失活などが起り、酵素活性を持った単量体の分離はできなかつた。スペクトル的には 2 量体と 4 量体は同一と考えられるが、しかし 2 量体は PCMS の作用を容易に受けて分解するので PCMS による酵素活性の阻害はこの状態で起るものと思われる。これらの結果よりチトクロム酸化酵素の機能単位は 2 量体であることが確かめられた。

当酵素標品は還元され易いヘム成分と還元され難いヘム成分を含むが、アルカリ性条件下 (pH 9.3~9.5) ではこの区別が更に顕著になり一酸化炭素は後者のみと反応することが容易に確かめられた。しかしサクシニル化した酵素標品ではこの様な還元性の難易はみられなかつた。この方法を利用して、銅に由来すると考えられている 830 m μ 吸収帯の挙動を調べると速やかに還元される成分と同程度の速さで還元されるので、この吸収帯は上述の還元され難い成分とは無関係と思われる。

液体水素温度 (20°K) で当酵素の ESR 測定を行うと 2 種類の低スピンヘム a ($g_x=1.55$, $g_y=2.0$, $g_z=3.01$ 及び $g_x=1.88$, $g_y=2.26$, $g_z=2.54$) が検出され高スピンヘム a の含量は僅かであった (磁化率の測定より $g=6.0$ と $g=4.3$ を示すヘム a を合わせて 16~20%)。この測定においても還元され易い成分 ($g_z=3.01$ を示す) と還元され難い成分 ($g_y=2.26$ を示す) の区別が可能で後者はシアニオンと容易に反応した、エーレンベリー及び米谷はチトクロム a₃ 成分のヘム a は常温では高ス

ピン状態を、低温 (-200°C 程度) では低スピン状態をとることを示唆したが $-196^{\circ}\text{C}\sim 0^{\circ}\text{C}$ までの磁化率の測定結果からは両スピン間の熱的平衡は認められず、彼らのいう a_3 成分も常温で低スピン状態をとるものと考えられる。ただ、ファン・ジェルダらは不完全に還元されたチトクロム酸化酵素において高スピンヘム a の ESR シグナル ($g=6.0$) を得ているので、 a_3 成分にスピン状態の変化が起るとすれば、それは熱的平衡によるのではなく、酸化還元に伴う酵素分子の構造変化と密接な関連があると思われる。以上の結果よりチトクロム酸化酵素標品中には反応性及び配位子の異なる低スピンヘム a が含まれている事が知られた。

しかし当酵素の酸素化型 (一旦還元した酵素を酸素と反応させた時得られる) では吸収スペクトル上及び動力学的にも両成分は区別され難い。酸素化型酵素の ESR 測定をすると、大部分の銅と、40~50%の早く還元される成分のヘム a ($g_z=3.01$ を示す) が酸化状態で検出され、この結果より銅は後者よりも容易に空気酸化されることが知られた。又、この結果は $830\text{ m}\mu$ の吸収帯の挙動と一致するので、この吸収帯は2価の銅錯化合物に由来するものといえよう。当酸化酵素の反応機構にどのようにこの銅錯化合物が役立つかなどの興味深い諸問題は今後の研究にまきたい。

論文の審査結果の要旨

ウシ心筋チトクロム(以下 Cyt) 酸化酵素の機能単位に関する研究と題する都築君の論文は、Cyt c と協力して細胞呼吸の末端酸化酵素活性をあらわす Cyt a の解離合合、活性と ESR スペクトル測定とを比較研究した成績に係るものである。

高純度 Cyt a 標品はエマゾールをふくむ緩衝液中では沈降定数 22—23 S の四量体として存在することおよび適当なドデシル硫酸塩 (SDS) 処理によって酵素活性を2—3倍に増大することが知られている。SDS 処理を強く施すと蔗糖密度勾配法で遠心分離すると16—17 S と 6—7 S の区分に分れ、前者にのみ酵素活性が認められる、おそらく四量体が本処理で二量体に、さらに単量体から subunit にまで解離するものと推定される。Cyt 酸化酵素活性の機能単位が二量体であることを再確認した後、SDS 処理による二量体生成に伴って、活性に必須な銅の結合様式の変化や ESR スペクトルの変化などを精査し、つぎの結果を得た。

Cyt a 標品中には還元され易いヘム a 成分と還元されにくいヘム a 成分がふくまれているが、一酸化炭素は後者と反応することが確かめられた。Cyt a は $830\text{ m}\mu$ に2価の銅に由来すると考えられている吸収帯を示すが、これはすみやかに還元されるヘム a 成分をもつ区分と推定され、CO 結合性区分と無関係であることが知られた。さらに、銅の ESR シグナルは小さくなり、逆にヘム a のシグナルは大きくなる液体水素温度 (20°K) では低スピンヘム a の検出が容易になるので、この低温度で Cyt a 標品の ESR スペクトルを測定したところ、2種類の低スピンヘム a ($g_x=1.55$, $g_y=2.0$, $g_z=3.01$ および $g_x=1.88$, $g_y=2.66$, $g_z=2.54$) が検出され、配位子との反応性から、 $g_z=3.01$ のヘム a 成分をもつものが還元されやすい区分で、 $g_z=2.54$ を示すものが還元されにくい区分であることが知られた。また一方、Cyt a を還元した後酸素と反応させると酸素化 Cyt a となるが、この場合にも $830\text{ m}\mu$ の吸収帯は観察されるから、銅は2価であると推定できる。さらに酸素化型 Cyt a の ESR

スペクトルを測定してみると大部分の銅と約50%の還元されやすいヘム a をもつ区分 ($g_z=3.01$) が酸化状態で検出され、還元されにくいヘム a をもつ区分 ($g_z=2.54$) のシグナルは消えているので還元状態にあると推定される。すなわち、還元型 Cyt a に O_2 が結合すると (2または) 3 個の電子が O_2 に受容されるが、最後の電子 1 個が供与されないため、酸素化型として観察され、酸化型になりきれないと解釈できる成績が得られた。

以上要するに、都築君の論文は Cyt 酸化酵素の作用機構に重要な知見寄与を成したものであるから、参考論文の成績とあわせ考え、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。