

Title	パン酵母のチトクロームaの酵素化学的研究
Author(s)	指吸, 俊次
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29734
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

【 4 】

氏名・(本籍)	指 吸 俊 次
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 1506 号
学位授与の日付	昭和 43 年 6 月 19 日
学位授与の要件	理学研究科生理学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	パン酵母のチトクローム a の酵素化学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 奥貫 一男 (副査) 教授 殿村 雄治 教授 佐藤 了

論 文 内 容 の 要 旨

パン酵母 *Saccharomyces* から得られるチトクローム・オキシダーゼは、すでに Sekuzu ら及び Duncan and Mackler が報告しているように、スペクトル及び酵素活性ならびに、それらに与える呼吸阻害剤の影響などは、これまで動物心筋の酵素で示されて来た結果と非常によく一致している。酵母のチトクローム・オキシダーゼ活性は、動物心筋のそれより著しく強いことが特徴であるが、その他の細部にわたる性質は未知である。今回の研究では、酵素の精製をさらにすすめて得られた高純度の標品を用いて、酵素活性に対する種々の試薬の影響、銅の役割、蛋白質部分のアミノ酸組成について検討した。

チトクローム a (オキシダーゼ) は、Sekuzu らの方法に従い、酵母菌体をフレンチプレス処理をして得られる電子伝達顆粒から、コール酸塩によりチトクロームを抽出し、これを 0.5% コール酸塩を含む 0.25M ショ糖溶液中で、硫酸による塩析をくり返して精製した。精製標品は、酵素蛋白質 1 mg 当り 9.5 μ moles のヘム a を含み、これより逆算して得られる蛋白質部分の最小分子量は、約 105,300 であった。この値は、アミノ酸分析の結果から得られた値 108,700 とよく一致している。酸化型チトクローム a は、280, 350, 423, 600, 820 ~ 840 $m\mu$ に吸収極大をもち、還元型では、443, 517, 603 $m\mu$ に極大をもつ。近赤外部の吸収極大は、動物心筋の酵素で認められているように、銅による吸収である可能性が強く、吸光係数は、830 $m\mu$ での (酸化型一還元型) が $0.887 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ という値が得られた。その他のスペクトルの性質は、Sekuzu らの標品と殆んど変りがなかった。

蛋白質の変性剤である SDS, guanidine 塩酸の活性に対する影響を調べると、これら両試薬とも著しい阻害効果を示した。またその他、SH 試薬、アルデヒド試薬、銅キレート剤などでも活性が阻害された。これら種々の試薬による活性の阻害度、様式を、これまで動物心筋の酵素で報告されている結果と比較してみると、今回の研究で得た精製標品は、これらの試薬の影響を非常にうけやすい状態

にあることが考えられ、また酵素に含まれる銅、ヘム a 側鎖のアルデヒド基は活性に関与していることが示唆された。

酵素に含まれる銅は、SDS 存在下で、銅キレート剤を用いて分光学的に定量し、ヘム a と当モル含むことを確認し、また、SDS 存在下で PCMB による SH 基の定量の結果と考え合わせて、銅は、蛋白質の SH 基に結合して存在することが示唆された。また銅のオキシダーゼ反応への関与は、その酸化還元を、ESR 法で検討し、アスコルビン酸-チトクローム c 系による酵素の嫌氣的還元で、酸化型チトクローム a に認められる銅のシグナルが、殆んど消失することからも強く示唆された。また銅は、10mM KCN に透析するとかかり除去されることを見出した。これまで動物心筋のチトクローム a では、何らかの処理をしないと、シアン透析で銅を除去出来ないことが示されているが、酵母のチトクローム a の場合、上記の種々の試薬の活性の阻害などを考え合わせて、酵素が、動物心筋のそれより、より小さな解合状態にあると考えれば、充分説明し得る結果である。

酵素の蛋白質部分のアミノ酸分析の結果、パン酵母のチトクローム a は、His, Pro, Met を除く全アミノ酸が、動物心筋のそれより多く含まれており、特に酸性、疎水性アミノ酸の含量が多いことがわかった。従って、酵母のチトクローム a は、動物心筋のチトクローム a より、より酸性、疎水性的性質をもつと考えられる。

以上の結果から、酵母チトクローム a のアミノ酸組成は、動物心筋のそれと異なるが、末端呼吸酵素としての機能は、両者で殆んど変りがないと思われる。

論文の審査結果の要旨

指吸君の論文は、パン酵母細胞から高純度に精製したチトクローム (Cyt) a 標品を得て、その酵素活性に対する種々の試薬の影響、その分子内に存在する銅原子の役割、タンパク質部分のアミノ酸組成などを、ウシ心筋から得た Cyt a の標品と比較検討した結果をまとめたものである。

Cyt a は瀬層らの方法により、酵母細胞をフレンチプレス処理で破壊し得られた電子伝達顆粒からコール酸塩を用いて抽出、硫酸アンモニウムによる分画塩析などをくりかえして高純度に精製したものである。このようにして得られた Cyt a 標品は最小分子量が約 105,300 で、1 分子内にヘム a 1 分子と銅 1 原子をふくんでいる。その酸化型は 280, 350, 423, 600, 820~840 m μ に還元型は 443, 517, 603 m μ に吸収極大をもつ。830 m μ 付近の吸収極大は、ウシ心筋から得た Cyt a 標品の場合と同じく、分子内の銅原子に由来すると考えられる。

酵母の Cyt a 標品はウシ心筋から得た標品と同様に、タンパク質の変性剤、SH 試薬、アルデヒド試薬、銅キレート剤などでその酵素活性が阻害される。また分子内の銅原子はアミノ酸残基のイオウ原子と結合し存在することがわかった。そして ESR スペクトルの研究から Cyt a 内の銅原子が酵素反応に関与していることが明らかになった。酵母の Cyt a 標品は、ウシ心筋から得た標品よりも、酸性および疎水性アミノ酸残基を多くふくむが末端呼吸酵素としての機能においては、心筋の Cyt a ほとんど差がないことがわかった。

要するに、指吸君の論文は、進化学的に下等な生物の Cyt a もほ乳動物のそれと大同小異である

ことを、酵素化学的に明らかにしたもので、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価値があるものと認める。