

Title	嫌気培養酵母における非ミトコンドリア型電子伝達系とヘム蛋白
Author(s)	川口, 久美子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29739
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	川 口 久 美 子 かわ ぐち く み こ
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 1 6 0 8 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 理 学 専 攻 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
学位論文題目	嫌 気 培 養 酵 母 に お け る 非 ミ ト コ ン ド リ ア 型 電 子 伝 達 系 と ヘム蛋白
論文審査委員	(主査) 教 授 萩 原 文 二 (副査) 教 授 奥 貫 一 男 教 授 佐 藤 了

論 文 内 容 の 要 旨

酵母は嫌気培養するとミトコンドリア (Mt) を欠き、チトクローム (cyt.) も通常 Mt にみられる a, b, c, c₁ は存在せず, a₁, b₁ などが存在することが古くから知られている。ところがこれら cyt. a₁, b₁ は吸収スペクトルで観察されているだけでその実体については不明のままである。一方嫌気細胞には弱い酸素呼吸がみられるがその機構についても明らかにされていない。最近我々はこれらの点を明らかにするために、嫌気培養細胞のヘム蛋白の種類とその細胞内局在性を好気細胞のこれと比較検討し表 1 に示すような結果を得た。そして嫌気細胞の酸素呼吸は従来報告されていたように cyt. a₁ によるのではなく、cyt. a₁ の吸収帯とされていたものはむしろ cyt. c ペルオキシダーゼ (CCP) によるものであることを指摘した。又細胞レベルの研究で、p-450 の含有量とその呼吸活性がほぼ平行して増減するのでこれらの間に何らかの関係があることが示唆された。

本論文では、Mt 形成の機構を解明する手掛りとしてこれら嫌気細胞内に存在するヘム蛋白の存在様式と機能を追求した。表 1 に示されるように、CCP は Mt 局在のヘム蛋白であるが Mt のない嫌気細胞にも存在するので、このヘム蛋白が Mt 形成過程の指標酵素として用い得ると考えられた。表 2 には嫌気及び好気細胞中の CCP の細胞内分布を示してある。嫌気細胞内で CCP は好気細胞の Mt に相当する大顆粒分画にその大部分が回収される。そしてこの CCP は好気細胞のものと同ーであることが証明された。小顆粒分画には CCP は殆ど回収されず、RNA 含量からこの分画はむしろリボゾームから成り立っているものと思われる。大顆粒分画に局在している CCP は超音波処理で Mt における場合と同様に大部分抽出される。又これは低張処理でも容易に抽出されるが Mt に局在する CCP は低張処理では抽出されにくいので、嫌気細胞の CCP を含む顆粒は Mt よりよりこわれやすい胞状をなしているものと思われる。嫌気細胞は好気条件に移すと数時間で Mt が形成され CCP はその殆どが Mt に回収される。しかし高濃度のグルコース、クロラムフェニコール存在下では、

表1 嫌気及び好気培養細胞におけるヘム蛋白の分布

ヘム蛋白	野生株		呼吸欠損変異株		細胞内局在
	嫌気	好気	嫌気	好気	
cyt. a	-	+	-	-	ミトコンドリア 又は大顆粒
cyt. b	-	+	-	-	
cyt. c ₁	-	+	-	-?	
cyt. c	-	+	-	+	
CCP	+	+	+	+	
cyt. b ₁	+	+	+	+	顆粒
p-450	+	微量	+	微量	
*p-420	+	微量	微量	微量	
カタラーゼ	微量	+	微量	+	可溶性
酵母ヘモグロビン	微量	+	微量	+	

* CO 結合型が 420m μ に吸収を示す未固定の物質

表2 野生株におけるチトクロームCペルオキシダーゼの細胞内分布

生育条件	大顆粒分画	小顆粒分画	上清分画
嫌気	456**	0	84
好気	1112	0	2

** 値は k sec⁻¹/1000mg蛋白ホモジネート

Mt の形成は抑制され CCP は新成された cyt. c と共に大顆粒分画に回収される。以上の事実は嫌気細胞に存在する CCP を含む顆粒が Mt と密接な関係があることを示しており、この顆粒が Mt 前駆体様のものであることを示唆している。

一方嫌気細胞に比較的多量見出される CO 結合性のヘム蛋白 p-450 は、Mt が形成される好気条件下に移すと急速に減少し Mt 形成を抑制すると減少が抑えられ、又この p-450 の増減に伴いアンチマイシンA不感性の呼吸が平行して増減することは先に報告した。

細胞分画を行うと p-450 は CCP の局在する大顆粒分画にその殆どが見出される。そしてこの標品は NADPH を酸化する能力があり、その活性は p-450 の含量に比例する。p-450 に対するこの酸素呼吸活性の比、すなわち p-450 に対するターンオーバーナンバーは約 80~120 min⁻¹ というほぼ一致した値を示した。この呼吸活性は酸素に対して親和性が強く、みかけ上の Km は 2~4×10⁻⁶M で全細胞でみられた値とほぼ一致する。これらのことから NADPH の添加でみられる呼吸活性に p-450 が関与していることが示唆されるがこれは以下の実験結果からも明らかにされた。1) PCMS p-フェニールイソシアナイドの NADPH による呼吸活性の阻害と、それらの試薬による p-450 の吸収スペクトルの変化が平行して現われること。2) p-450 が CO と結合性の強いことはスペクトル変

化で観察されるがこの呼吸活性も強く CO で阻害される。

この呼吸活性の電子伝達系には p-450 の他にフラビン蛋白である NADPH 脱水素酵素が関与していることが明らかになった。即ち、大顆粒分画をプロテアーゼ処理すると p-450 は全く可活化されないが、NADPH 脱水素酵素は容易に可溶化され、それと平行して呼吸活性が減少することが観察される。以上のことより大顆粒分画における NADPH による呼吸は NADPH 脱水素酵素及び p-450 の関与する電子伝達系を介しており、この活性は、全細胞のアンチマイシン A 不感性呼吸を反映しているものと考えられる。この標品には cyt. b_1 も回収されるがこの電子伝達系への cyt. b_1 の関与は不明である。又 NADH も酸化する能力があるが、この活性は NADPH に比べて非常に弱く酸素に対する親和性も弱いので NADPH とは別の電子伝達系によるものと思われる。この標品の構成するヘム蛋白及び電子伝達系は肝ミクロソームと非常によくにており酵母では Mt を形成する脂質の合成に関与していることが推察されるが、p-450 及びその呼吸活性が Mt 形成と共に著しく減少するのでその生理的意義については現在のところ明らかでない。

論文の審査結果の要旨

本論文は嫌気培養状態の酵母内に存在するヘム蛋白質の組成、存在様式、ならびに機能などを高性能の測定手段を用いて、詳細に研究を行ない、嫌気培養酵母の呼吸の本体を明らかにするための貴重な知見を得たものである。得られた結論のうち主なものをあげると次のようになる。

- (1) 従来チトクローム a_1 といわれていたものは実在する成分ではなく、酵母に多量に含有されているチトクローム C パーオキシダーゼの吸収帯を見誤っていたものであることが判った。したがって嫌気培養酵母の呼吸はチトクロームに a_1 よるものでないと考えらるべきである。
- (2) 上記のチトクローム C パーオキシダーゼは好氣的酵母ではミトコンドリアに局在することは判っていたが、本論文の研究で、この成分が上記のように嫌気培養細胞にも存在することがわかったのみならず、これがミトコンドリアの前駆体と考えられる大顆粒中に局在することが証明された。なお、大顆粒又はミトコンドリアよりのパーオキシダーゼの溶出され方が異なることから、両顆粒の組成や構造上の差異も示唆された。
- (3) 嫌気培養酵母の顆粒にはチトクローム p-450 が含有されることが証明され、しかもこれが嫌気培養細胞の呼吸を行なうオキシダーゼ的な役割をはたしているらしいことが種々の角度からの検討によって強く示唆された。

以上のように、この研究は今まで判っていなかった嫌気状態の酵母の細胞内顆粒や、呼吸の機構をある程度明らかにしたものであって、理学博士の学位論文として十分な価値があるものと認定する。