

Title	チトクロムAの構造について
Author(s)	山本, 敬司
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30713
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

氏名・(本籍)	山 本 敬 司
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 2748 号
学位授与の日付	昭和48年3月24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	チトクロムAの構造について
論文審査委員	(主査) 教 授 松原 央 (副査) 教 授 浜口 浩三 教授 殿村 雄治

論 文 内 容 の 要 旨

(1) タンパク質分解酵素による精製チトクロムaはヘム鉄の酸化状態のちがいによってタンパク質部分の高次構造が変化することを、タンパク質分解酵素の感受性の差異をみることで調べたが、そのときヘム鉄の酸化状態にかかわらず一定限度(20%)のタンパク部分が分解されることを発見した。この限定分解をうけたチトクロムaをSephadexG75カラムで精製し(分解酵素処理チトクロムa)その性質を調べるとヘムa当りの酸化酵素活性の比活性、吸収スペクトル、Helix 含量、ミセル状態、銅含有量などは少しも変化がないが、ヘム当りのアミノ酸は約600残基に減少していることが分った。同時に修飾試薬に対してたやすく修飾をうけるアミノ酸残基はタンパク分解酵素によって除去され残余の残基はさらには修飾されはいいことも分った。このことより分解酵素処理チトクロムaは“高密度”な構造で、分解をうけた部分はHelixを含まない無定形の構造をとっているものと思われる。

(2) サブユニット構造—チトクロムaをSDSゲル電気泳動によってサブユニットに分離すると分子量一万から約四万までの6つのユニットにわかれそのうち10,000と15,000の二つのサブユニットの量が他にくらべ多い。一方分解酵素処理チトクロムaは上記の6つのサブユニットのうち小分子の10,000と15,000の分子量と同定される二つしか検出されなかった。これは(1)の結果と合わせて考えるとチトクロムaはこれら二種のサブユニットがいくつか集って分子量数万の分子を構成しているものと考えられる。

(3) ヘムaの存在状態—アルキルイソニトリル ($R-N\equiv C$) は二価のヘム鉄への配位子として知られているが、もしチトクロムaのヘムaがチトクロムa分子の中に埋没しておればイソニトリルのアルキル基が大きくなるとその立体障害のためヘム鉄とイソニトリルの反応性は大きく阻害されることが予想される。そこでエチル、i-プロピル、t-ブチルイソニトリルをそれぞれ合成し遊離のヘムaとの反応性をみたところ、イソニトリルのアルキル基のちがいによる反応性の差異はみとめられなかった。

一方環元型チトクロムaに対してはエチルイソニトリルの反応性をもっとも高くアルキル基が大きくなるにつれてその反応性はいちぢるしく減少することが分った。このことはチトクロムa中のへムaはクレバスの中にあつてイソニトリルと反応するとき、イソニトリルのアルキル基とクレバスの入口との間に立体障害があることを示唆している。

同じく酸化型チトクロムaのへムaの存在状態を知るためにエタノール、エチレングリコール、グリセリンのへムaに対する溶媒効果を調べた。遊離のへムaのこれら溶媒に対する効果はプロトへムやへムcでは各種の溶媒とも同じ効果を示すのと異つてピリジン中ではエチレングリコール、エタノールの順に大きくなる。このようにピリジン中ではshort rangeな効果を示す性質をもつエタノールの溶媒効果の大きさがへムaだけ特異的に大きいことはへムaのホルミル基とエタノールの直接的作用の可能性が考えられる。一方酸化型チトクロムaのへムaに対する溶媒効果はエチレングリコール、グリセリンは非常に小さいがエタノールはこれらより大きい値を示す。このことはへムaは酸化型においてもホルミル基を外側にしてチトクロムaのクレバス中に埋没していることを示している。

論文の審査結果の要旨

動物細胞ミトコンドリアでの末端呼吸酵素チトクロム酸化酵素の実体は未だ不明で、その構造と機能の関係を分光学的、蛋白質化学的手法を用いて解明しようとしたのが山本敬司君の論文である。大きく3つの部分に分けて考えられる。1. 今までこの不溶性酵素の精製は非常に困難を極め、可溶化にはコール酸や他の洗剤性溶剤を必要とした結果、ミセルの形成が起り、酵素の純化は甚だしく妨げられている。従つてその酵素化学的手法による研究は仲々進展せず、また分光学的研究結果にも多々論義を呼ぶ結果となっている。山本君はこのへム蛋白質が酸化還元によつてその高次構造を変えるかどうかを蛋白質分解酵素の感受性における差異で測定することを試みた。そして酸化型では20%を限度として蛋白質部分の分解は停止するが還元型ではさらに分解が進行し、小分子になってしまうということを発見した。このことは分解酵素の利用によつてミセル中に混入した不純物の除去が可能であることを暗示しており、しかも、生理活性並びに物理化学的性質には謂所チトクロムaとしての性質がそのまま残っているので新しい精製法として有効であると思われる。へム当りのアミノ酸は約600残基に減少していることは上記のことを支持している。しかもこの標品はサブユニット構造の研究に好適であるといえる。又、チトクロムaをSDSゲル電気泳動により分離すると今までへムa当り9万の分子量をもつといわれていたこの蛋白質が、分子量1万~4万の6つのサブユニットに分かれることがわかつた。その中で1万と1万5千に相当する2つの成分が多量に存在する。この系に上述の蛋白質分解酵素処理を施したチトクロムaをかけてみると1万と1万5千分子量に相当する2つの主成分のみしか認められないことが判明した。このことは非常に重要で、チトクロムaはこの2つのサブユニットがいくつか集つて分子量数万の一分子を構成し活性体となることを示唆する。今後の構造と機能の研究に一つの大きな前進をもたらしたものと理解される。3. へムaの蛋白質中における存在様式を検索するためアルキルニトリルの各種誘導体を合成しへムaの鉄と配位させ、それによつて変化

するスペクトルの状態からこれを知る方法を採用している。還元型チトクロムaに対してはエチルイソニトリルの反応性が最も高く、アルキル基が大きくなるにつれて反応性は減少する。すなわちへムaは蛋白質のクレバスの中に入りており大きいアルキル基は立体障害のために鉄まで近づけないものと理解される。一方溶媒効果についての検索を行っているが、他の溶媒に比しピリジン中でエタノールがとくに大きい効果を示すということを発見しているが、へムaのホルミル基とエタノールの直接的な接触を考慮に入れると説明がつく。一方酸化型チトクロムaに対してもエタノールは大きい効果を示すので、チトクロムaのへムaは蛋白質のクレバス中に埋没しているがホルミル基を外に出しているのではないかと想像している。

以上の研究は同君によって今迄に未踏の分野であったチトクロムaの蛋白質部分に対する開拓がなされたものであることを証するとともに、今後のこの分野での急速な展開を約束したものであり、参考論文と併せ考え理学博士学位論文として十分価値あるものと認める。