

Title	緑のう菌の亜硝酸塩還元酵素の研究
Author(s)	島田, 秀夫
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32372">https://hdl.handle.net/11094/32372</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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)	島 田 秀 夫
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 4 4 4 6 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 12 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	緑のう菌の亜硝酸塩還元酵素の研究
論文審査委員	(主査) 教授 松原 央
	教授 堀尾 武一 教授 佐藤 了 助教授 山中 健生

### 論 文 内 容 の 要 旨

呼吸には酸素を利用する方式や硝酸塩を利用する方式などがある。緑のう菌の本酵素は硝酸塩呼吸に欠かせない一員で、硝酸塩の還元物である亜硝酸塩をさらに一電子還元し、一酸化チッ素に変える反応を触媒する。1分子(分子量67,000)にヘムc, dの異なるヘムを1分子ずつ有するが、その他の金属や補欠分子族はない。本酵素はまた顕著なチトクロームオキシダーゼ作用をも示す。この両触媒反応にヘムd部位が関与していることが示唆されてきた。本論文では両反応に直接関与する反応中間体の検出及び同定に成功し、ヘムd部分が活性部位として働くことを示すとともに亜硝酸塩還元反応に於いてはヘムc部分もまた直接反応に関与する結果を得た。最後に両ヘム部分が関与する亜硝酸塩還元反応の機構を提出する。

酵素を従来とは異なる方法で98%の純度にまで精製し、得られた標品(従来のと殆んど変わらない性質を有する)を用いタンパク質化学的研究を試みヘムc, d, が同じ一本のポリペプチドに結合していること、そして酵素はその2量体として存在することを示唆する結果を得た。ヘムc, d両部分のpH, 温度, 還元剤そして酸化還元反応に対する挙動, 外部配位子存在下での挙動等種々条件下での両ヘム部分の振舞いを光吸収スペクトル法で綿密に検討した。

電子供与体存在下, 本酵素による酸素還元反応中及び還元型酵素に酸素を添加することにより酸素化型中間体を把えた。また本酵素による亜硝酸塩還元反応を電子供与体存在下に行うと, ヘムc, d両部分で一酸化チッ素酵素複合体( $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{NO}$ ,  $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{NO}$ )の形成が見られかつそれらが直接反応に関与していることを明らかにした。ウシのチトクロームcを使って電子供与体, 亜硝酸塩共存下pH3で亜硝酸塩還元反応のモデルを確立した。この反応の中間体( $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{NO}$ ,  $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{NO}$ )と同じ性質のものが

酵素による反応中にも見られたことよりモデル反応を参考にし次の亜硝酸塩還元反応の機構を提出した。亜硝酸塩と $H^+$ との平衡にある $NO^+$ が還元型酵素のヘム *c*, *d* 両部分と結合し NO-酸化型酵素複合体 ( $Fe^{3+}-NO \rightleftharpoons Fe^{2+}-NO^+$ ) となり、そこに電子が供与されて NO-還元型酵素複合体 ( $Fe^{2+}-NO$ ) を生じそれが還元型酵素と NO に分離する環式のスキームである。ヘム *c*, *d* 2 個の活性部位の関与する反応型式は直接の電子供与体である還元型チトクローム *c*-551 (緑のう菌) が二次反応型式で亜硝酸塩存在下本酵素で酸化された結果からも支持される。また還元力が強い条件下では亜硝酸塩還元反応中ヘム *c*, *d* 両部分の挙動がよく同調しており、ヘム間相互作用の可能性も示した。

### 論文の審査結果の要旨

呼吸方式のうち、緑のう菌の亜硝酸塩還元酵素は硝酸塩呼吸に欠かせぬ一員で、亜硝酸塩を一電子還元し一酸化チッ素に変える反応を触媒する。一分子中にヘム *c* とヘム *d* が共存し、酸素の還元にも関与しているこの酵素の反応機作は興味の深いものである。島田君は上記両反応に直接関与する反応中間体の検出及び同定に成功し、ヘム *d* 部分が活性部位として作動していることを示し、同時に亜硝酸塩還元反応に於いては、ヘム *c* 部分もまた直接反応に関与する結果をえた。最後に両ヘム部分が関与する硝酸塩還元反応の新しい機構を提出した。

著者は新しい酵素標品の精製法をも開発し、蛋白質化学的な研究も試み *c*, *d* が同じ一本のポリペプチド鎖に結合する分子量 67,000 の分子で、酵素反応としては 2 量体が必要であること、又 pH, 温度、還元剤などによるヘム *c*, *d*, 両部分の挙動、外部配位子存在下での挙動等を分光学的手法で綿密に検討している。

亜硝酸塩と  $H^+$  との平衡にある  $NO^+$  が還元型酵素のヘム *c*, *d* 両部分と結合し、NO-酸化型酵素複合体 ( $Fe^{3+}-NO \rightleftharpoons Fe^{2+}-NO^+$ ) となり、電子の供与で NO-還元型酵素複合体 ( $Fe^{2+}-NO$ ) を生じ、それが還元型酵素と NO に分離する環式スキームを提出しているが、*c*, *d* 活性部位の関与する型式はチトクローム *C*-551 が二次反応形式で  $NO_2$  存在下この酵素で酸化された結果からも支持される。同時にヘム間相互作用の可能性も示した。

このように島田君の研究は緻密で独創的であり、これをもとに明解な反応機作の仮説を提出しており、理学博士の学位論文として十分に価値あるものと認める。