



Title	Spinacia oleracea (ホウレンソウ) のNADH-硝酸還元酵素に関する研究
Author(s)	中川, 弘毅
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32394">https://hdl.handle.net/11094/32394</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	中川 弘毅
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 4447 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	Spinacia oleracea (ホウレンソウ) の NADH-硝酸還元酵素に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 佐藤 了 教授 松原 央 教授 福井 俊郎

### 論文内容の要旨

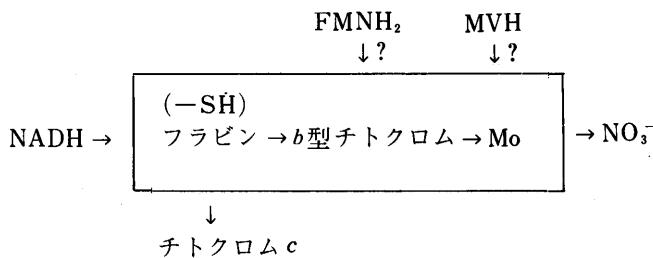
同化型硝酸還元は、植物界に広くみられ、硝酸 ( $\text{NO}_3^-$ ) をアンモニア ( $\text{NH}_4^+$ ) にまで還元する生体有機チッ素供給の初期段階を担っている。この  $\text{NO}_3^-$  の同化的還元においては、まず  $\text{NO}_3^-$  が硝酸還元酵素 (Nitrate oxidoreductase EC 1,6,6,1) (NR) のはたらきにより、次式のように亜硝酸 ( $\text{NO}_2^-$ ) に還元される。



ホウレンソウの NR は NADH を電子供与体として  $\text{NO}_3^-$  を  $\text{NO}_2^-$  に還元する (DN) 活性の他に、その関連酵素活性として、NADH-チトクロム c (またはフェリシアナイト) 還元活性および  $\text{FMNH}_2^-$ 、還元型メチルビオローゲン (MVH) 硝酸還元活性をも有し、分子内電子伝達系を形成していると考えられる。

近年 *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* および *Chlorella vulgaris* 等から、同化型 NR が高度に精製され、その補欠分子族およびサブユニット構造等の解析が行なわれているが、高等植物からは、その NR の不安定性のため未だ高純度の酵素標品が得られておらず、その分子的性状は不明な点が多い。著者は、ホウレンソウ抽出液の NR が、リン酸イオンのような、いわゆるアンチケイオントロピックイオンが高濃度に存在するとき、いちじるしく安定化されることを見い出した。そこで、この性質を利用し、ホウレンソウ葉の NR を、硫酸分画、リン酸カルシウムゲルによる吸脱着、ブルーデキストラン-セファロースによるクロマトグラフィー、ゲル漏過および DEAE セルロースクロマトグラフィー等の方法によって、2.1% の収率で 280 倍に精製した。この高純度精製標品は、比活性 1750 単位/mg タンパク質を有し、電気泳動的にも、免疫学的にもほぼ均一であり、分子量約 6 万のサ

ブユニット 2 個から成る分子量 12 万のタンパク質であり、他起源の NR と同様、分子内にモリブデン、*b* 型チトクロムおよびフラビンを有することが示され、*Neurospora* の例を参考にすると、本酵素の分子内電子伝達は下図のように考えられる。



ホウレンソウの硝酸還元は、主に葉部で営まれ、いっぽう DN 活性の認められなくなったホウレンソウ根部抽出液中には、熱に不安定な、非透析性の NR 不活性化因子が存在することが示された。

ホウレンソウ幼植物を、NO<sub>3</sub><sup>–</sup>をチッ素源とする Hoagland 液から NH<sub>4</sub><sup>+</sup>をチッ素源とする培養液に移すと、DN 活性は低下するが、これを再び NO<sub>3</sub><sup>–</sup>あるいは NO<sub>2</sub><sup>–</sup>を含む培養液に移すと再び活性は増大する。精製 NR に対する抗体を用いた実験から、この活性低下期の幼植物中には、不完全な NR 分子が混在し、NO<sub>3</sub><sup>–</sup>添加による活性増大は、NR の *de novo* 合成に由来するというより、不完全な NR の活性化に由来することが示された。

### 論文の審査結果の要旨

NADH 硝酸還元酵素（以下 NR と略す）は植物における窒素同化の第一段階である硝酸塩から亜硝酸塩への還元を触媒する。これまで緑藻やアカパンカビの NR は精製されて性質が詳しく調べられているが、高等植物の NR は不安定であるために、均一な精製標品は得られていなかった。中川君はホウレンソウ (*S. oleracea*) 抽出液中の NR が高濃度のリン酸塩によって著しく安定化されることを発見し、これを足がかりとしてこの酵素を高等植物からはじめて均一に精製する方法を開発し、その性質を明らかにした。それによると本酵素の分子量は約 12 万で、分子量 5.9 万のサブユニット 2 個から構成されている。また、フラビン、557 nm に  $\alpha$  吸収帯を示すヘム成分、およびモリブデン（モルあたり約 1 原子）を含んでいる。本酵素は NADH のほかに還元型 FMN および還元型 ビオローゲン色素を電子供与体として硝酸塩を還元する活性（末端硝酸還元酵素活性）および NADH によってフェリシアナイドやチトクロム c を還元する活性（ジアホラーゼ活性）をもっているが、前者は青酸やアジドで強く阻害され、後者は S H 試薬や熱によって容易に失活することが明らかにされた。中川君はさらに精製 NR に対する抗体を調製し、これを用いてホウレンソウ幼植物における NR 活性の増大が *de novo* のタンパク質合成によって起こることを示した。硝酸塩を窒素源として生育しているホウレンソウをアンモニウム塩を窒素源とする水耕液に移すと NADH によって硝酸を還元する活性はほとんど

消失するが、上記の末端硝酸還元酵素活性はかなり残存しており、またNRに対する抗体と交叉反応するタンパク質が存在している。この状態の植物を硝酸塩を含む溶液に戻すと完全な活性が急速に回復するが、この過程はタンパク質合成を伴わず、不完全なNR分子の完全な分子への転換によることが示唆された。

以上のように、中川君の業績は高等植物の代謝に重要な役割を果たしているNRについて多くの点を明らかにしたものとして、理学博士の学位に値すると思われる。