

Title	スピルリナプラテンシスのフェレドキシン-NADP+還元酵素に関する研究
Author(s)	柁木, 龍一
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32639
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)	榎 木 龍 一
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 4 8 7 6 号
学位授与の日付	昭和 55 年 3 月 25 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	スピルリナプラテンシスのフェレドキシン—NADP ⁺ 還元 酵素に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 松原 央 (副査) 教授 浜口 浩三 教授 福井 俊郎

論 文 内 容 の 要 旨

フェレドキシン-NADP⁺還元酵素 (FNR) は光合成電子伝達系の末端酵素であり, 還元型フェレドキシン (Fd) を電子供与体として NADP⁺ の還元を触媒する。本研究では, 藍藻 *Spirulina platensis* から FNR を均一に精製し, その物理化学的性質及び酵素的性質 (特に還元型 Fd を基質とする酵素反応機構) を明らかにすることを目的とした。

1. 二分子種の FNR の精製と諸性質

藻体の 80% アセトン処理, 33—80% 硫酸分画, Sephadex G-100 のカラムクロマトグラフィーの後, DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーにより精製したところ, FNR が二つの分画に分かれることが見出された。同カラムで再クロマトグラフィーを行なうことにより, ゲル電気泳動的に均一な二種の FNR II 及び I (カラムの溶出順) が得られた。精製標品はともに分子量が 3.3 万の FAD を含んだフラビン酵素であり, アミノ酸分析・キモトリプシン消化物のペプチドマップ及び Edman 法による N 末端分析の結果より, FNR I は II の限定分解物であることが示唆された。酵素活性は, ① *S. platensis* のチラコイド膜分画を用いた NADP⁺ 光還元活性, ② NADPH-DCIP 還元活性, ③ Fd 依存性チトクロム C 還元活性で測定した。いずれにおいても, FNR I と II は同程度の活性を示し, 至適 pH・基質に対する km 値にも差は見られなかった。以上の結果より *S. platensis* の FNR は生合成後修飾 (限定分解) を受け, 機能的には差のない二分子種を生じたと考えられる。

2. 還元型 Fd を基質とした酵素反応機構

嫌気的条件下で dithionite により還元した Fd の NADP⁺ を電子受容体とする酵素的酸化反応を 420 nm の吸光度変化で測定した。反応の時間経過の解析より, Fd の酸化反応は見掛け上一次であり, そ

の見掛けの一次反応定数 (k_{app}) はFd及びピリジンヌクレオチドの総濃度により依存することがわかった。この k_{app} とFd濃度から初速度を計算し、その基質濃度依存性及び反応生成物の一つである酸化型Fdの阻害効果を調べた。その結果、この酵素反応においては二つの基質、還元型Fdと $NADP^+$ が順次酵素に結合し、それらを含む複合体を形成した後、反応生成物である $NADPH$ と酸化型Fdが順次遊離する機構が示唆された。

論文の審査結果の要旨

光合成系Iにおける末端電子伝達系でフェレドキシンからの電子を $NADP^+$ に移す酵素、フェレドキシン- $NADP^+$ 還元酵素 (FNR) の研究は古くから行われている。しかしその材料を高等植物に求めた例が大部分で、その分子的性質の解明が困難であった。ところが柁木君は高等植物に代えて、藍藻の酵素に焦点を絞って研究したところ、その分子的、酵素的性質の有利さのために新しい局面を切り開き世界的に最前線に躍り出たと思われる。

まずこの酵素の精製途上で、他の研究者が植物酵素でも認めていた多成分の存在を認めた。しかし蛋白質化学的手法の応用によってこれらは抽出精製過程で起こる部分分解の結果によることを明確にし、従来から議論のあった多成分存在の原因を解明し、他の研究者へのよい参考となしえた。またこの藍藻の酵素はモノマーとして存在し、分子量33,000、FADを1分子含むことを明確にした。一方この酵素は葉緑体による $NADP^+$ の光還元活性以外に $NADPH$ -ジオホラーゼ活性やフェレドキシン依存性チトクロムC還元酵素活性を示すが、この逆反応 (非自然系反応) では恐らくピン・ポン機構といえる反応性を示していることがわかった。そこで本来の正反応では酵素反応はどのような機構で進行するかを追究するために嫌気的条件下で反応を進めうる系を開発し、これを用いて各種条件下で正反応を検討した。還元型フェレドキシンをFNRで酸化する反応は偽一次反応で、この時の反応速度常数はフェレドキシンと $NADP^+$ の各含量に依存すること、又初期反応速度はこの一次反応速度常数から求めている。各種詳しい動力的観測から、基質-フェレドキシン、 $NADP^+$ は逐次結合形式でFNRに結合し、複合体を形成すること、次いで電子授受が終わり、それらがFNRから離れることを示唆している。これは前述の非自然系反応でみられたピンポン機構とは全く異なるもので、正反応における電子伝達機構を考慮する上で重要な一石を投じたものといえる。

以上のように柁木君の研究が従来の定説に対して反省を求めると同時に、新しい方向への進展の門を開いたという意味で重要性が高く、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。