

Title	NADPH-アドレノドキシシン還元酵素とNADPHの反応機構に関する研究
Author(s)	坂元, 寛志
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33649
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	さ 坂	も と 元	ひ ろ 寛	し 志
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6153	号	
学位授与の日付	昭和58年7月28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	NADPH-アドレノドキシン還元酵素とNADPHの反応機構に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授 山野 俊雄			
	(副査) 教 教 萩原 文二 教 授 田川 邦夫			

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

アドレノドキシン還元酵素は、副腎皮質ミトコンドリアに存在し、シトクロムP-450に連なる電子伝達系の一成分である。本酵素は、一分子あたり一個のFADを補酵素として持つフラビン酵素であり、NADPHにより還元され、その還元分子種がアドレノドキシンを介して、シトクロムP-450に電子を伝達する。本酵素のNADPHによる還元分子種としては、嫌氣的条件では、二電子還元型が報告され、この分子種がアドレノドキシンへの一電子伝達に重要な役割を果たすとされてきた。一方、好氣的条件では、セミキノン型の生成も報告されている。しかし、嫌氣下におけるセミキノン型生成の可能性もあり、多くの問題が残されている。本研究では、嫌氣下においてNADPHによる本酵素の還元によって生じる数種の還元分子種の同定を行い、その生成メカニズムを考察し、本酵素とアドレノドキシンとの間の電子伝達機構の解明に役だてる事を目的とする。

(方法ならびに成績)

方法 アドレノドキシン還元酵素はウシ副腎より精製した。本酵素の還元は、亜二チオン酸、NADPH、またはEDTA存在下光還元で行った。反応は、嫌氣的にツンベルグセル中で行った。又、この反応は、温度依存性が著しく、その吸収スペクトルの温度変化は、本反応の解明に重要な知見を与えた。

成績 ①過剰のNADPHによる嫌氣的還元における本酵素の吸収スペクトルの温度依存性：この吸収スペクトルには、575 nmに極大、625 nmに肩を示すものと、700 nm前後に幅広い吸収を示すものが存在した。これらは、それぞれ、本酵素のセミキノン型および二電子還元型と NADP^+ の電荷移動錯体

(Charge Transfer Complex) の存在を示す。セミキノン型の存在は ESR 測定によっても確認された。酸化型による 450nm の吸収は、痕跡程度であった。この吸収スペクトルは、427nm 及び 667 nm に等吸収点を持って、温度に依存して可逆的に変化した。すなわち、低温側で、セミキノン型による吸収が増加し、高温側で、Charge Transfer Complex による吸収が増加した。以上の事は、セミキノン型と二電子還元型がみかけ上、平衡に存在する事を示すものと思われる。しかし、本反応の NADPH 濃度依存性を調べると、 $[NADPH]/[AdR]$ (AdR: アドレノドキシン還元酵素) が、10 以下では 450nm の吸収が明らかに存在し、酸化型も存在する事が示された。②本酵素の EDTA および $NADP^+$ 存在下光還元における吸収スペクトルの温度依存性: 本酵素を EDTA のみの共存下で光還元すると、本酵素はすみやかに二電子還元されるが、EDTA, $NADP^+$ 共存下で光還元を行うと、340, 450, 575 nm に吸収極大を示し、700 nm 前後に幅広い吸収を示した。この吸収スペクトルも著明な温度依存性を示し、398, 417, 645nm に等吸収点をもって可逆的に変化した。すなわち、低温側では、340, 450, 575nm の極大吸収が増加し、700nm 前後の吸収が減少した。この 575nm および 700nm の吸収変化の温度依存性の傾向は、①の結果と一致した。③ EDTA, $NADP^+$ 共存下光還元時の吸収スペクトルの経時変化: 340, 450, 575nm の吸収の経時変化を観察すると、450nm の吸収の減少および 575nm の吸収の増加は、340nm の吸収の増加に比し、より速くおわる。しかし、340nm の吸収は照射時間と共に増加した。この標品について同時に 340nm で励起した時の 460nm のケイ光強度の経時変化を観察すると 340nm の吸収変化と同様の傾向を示した。この 340nm の吸収変化は NADPH の生成によることが高速液体クロマトグラフィーによって確認された。

(総括)

本酵素の過剰の NADPH による還元および EDTA, $NADP^+$ 共存下光還元の実験より、本酵素反応には、数種の酸化還元分子種よりなる一つの平衡が達成される事が示された。その分子種としては、少くとも、セミキノン型、二電子還元型と $NADP^+$ の Charge Transfer Complex および酸化型が考えられる。又、光還元により NADPH が生成される事は、この反応は、還元型酵素から $NADP^+$ への電子供与の逆反応を示しているものと思われる。すなわち、この平衡は、本酵素と NADPH の反応の正逆両反応よりなるものと思われる。この結果と、酸素の関与なしにセミキノンが生成する事から、セミキノン生成のメカニズムの一つの可能性として、本酵素の酸化型、二電子還元型などの間の不均化反応が考えられる。これらの結果は、本酵素からアドレノドキシンへの一電子伝達に関し、本酵素の二電子還元型以外に、セミキノン型の関与も考慮しなければならない事を示している。

論文の審査結果の要旨

著者は副腎皮質ミトコンドリアの NADPH-アドレノドキシン還元酵素 (AdR) の嫌気的な反応を NADPH および EDTA-光還元系を用いて解析した。その結果、AdR は酸化型、還元型およびセミキノン型の 3 分子種の平衡状態にあることがわかった。さらにこの酵素ではセミキノン型が Charge -

Transfer Complex と温度平衡にあることも判明した。

ステロイドホルモン生合成に関与する電子伝達系の機作解明の上からも、また非ヘム鉄たんぱく関与のフラビン酵素の比較研究の上からも意義ある研究と考えられる。