The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	パルスラジオリシス法によるカタラーゼの反応性に関する研究
Author(s)	清水, 範英
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33936
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【10】

氏名・（本籍）	清水範英（しみずのりひで）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 6372 号
学位授与の日付	昭和59年3月24日
学位授与の要件	理学研究科 高分子学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**パルスラジオリシス法によるカタラーゼの反応性に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教授 林 晃一郎 （副査） 教授 高木 俊夫 教授 勝部 幸輝

論文内容の要旨

生体内には金属イオンを含む蛋白質が多く存在するが，その中でもヘム蛋白質は特によく知られている。ヘムとはテトラピロール環からなるポルフィリンに鉄イオンが配位した化合物である。

カタラーゼはヘム蛋白質の一種で，過酸化水素の分解を触媒する酵素である。本研究では，カタラーゼの反応性についてパルスラジオリシス法及びフラッシュフォトリシス法などを用いて検討した。

過酸化水素やスーパーオキサイドアニオン（O_2^-）によって代表される活性酸素の生体に及ぼす影響が注目され，近年では，その分子レベルでの研究が進められている。O_2^- の消去に作用する酵素であるスーパーオキサイドディスミューターゼ（SOD）が反応生成物である過酸化水素によって活性阻害を受けることが知られているが，近年，O_2^- がカタラーゼ活性阻害に作用することが報告された。本研究では酸素飽和条件下におけるパルスラジオリシス法を用いてO_2^- とカタラーゼとの反応性を調べ，O_2^- によるカタラーゼ活性の阻害機構について検討した。その結果，O_2^- はカタラーゼと直接反応し，酸素化型中間体（Compound Ⅲ）を形成することが判明した。また，その2次反応速度数はpH 7.4 で 2×10^5 M^{-1} s^{-1} と決定された。この中間体は不活性であるため，O_2^- によるカタラーゼ活性の阻害は酸素化型中間体の形成によるものであることが判明した。

次に，過酸化水素を利用して基質の酸化を行なうペルオキシダーゼとO_2^- との反応について2種のアイソザイムであるAタイプとCタイプを用いて検討した。ペルオキシダーゼCはカタラーゼと同様にO_2^- と反応して酸素化型中間体を生成し，また，その2次反応速度定数はpH 7.4で7×10^5 $M^{-1}s^{-1}$ と決定された。これに対し，ペルオキシダーゼAではO_2^- との反応は全く観測されなかった。しかし，定常的にO_2^- を発生させた場合には酸素化型中間体が生成することから，ペルオキシダーゼAとO_2^- との反応はCタイ

プに比べてかなり遅いと推測される。

さらに，カタラーゼの還元に関する検討を行なった。鉄3価のカタラーゼはジチオナイトのような還元剤では還元できないが，プロフラビンによる光還元によって還元された。生成した還元型カタラーゼ（Fe^{2+}）とCO及びO_2との結合過程をフラッシュフォトリシス法によって追跡し，結合速度はpH 8.7で各々3.8×10^3，9.2×10^3 $M^{-1}s^{-1}$と決定された。また,COとの平衡定数は1.5×10^5 M^{-1}と求められた。そして，低温において，酸素化型中間体が安定に存在するため，その吸収スペクトルを測定した。

論文の審査結果の要旨

カタラーゼは過酸化水素の分解を触媒する酵素としてよく知られたヘム蛋白質であるにもかかわらず他のヘム蛋白質に比べてその化学的性質に関する情報は乏しい。過酸化水素やその他の活性酸素の生体に及ぼす影響は酸素毒現象として関心を集めており,活性酸素の消去系の代表的存在であるカタラーゼの基礎研究は，今後の重要な課題である。清水君は，カタラーゼの反応性をパルスラジオリシス法等を用いて研究し，カタラーゼの生体防御における役割に関する重要な知見を得た。本論文は3章から成っている。

第1章では，O_2^-とカタラーゼとの反応をパルスラジオリシス法を用いて検討し，O_2^-によるカタラーゼ活性阻害の機構を明らかにした。従来のような定常的にO_2^-を発生させる方法では動力学的考察が不可能であり，また，2次的に発生する他の活性種も測定上の問題となる。同君は，パルスラジオリシス法のO_2^-の動力学的研究への応用を試み，これをカタラーゼに適用した。本研究により，両者の直接反応による酸素化型中間体の形成がO_2^-によるカタラーゼ活性阻害の本質であることが明らかにされた。

第2章では，西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）のO_2^-に対する反応性がパルスラジオリシス法によって検討した。この酵素においてもO_2^-との直接反応によって酸素化型中間体の形成することが確認され，生体内で同中間体の生成する可能性が示唆されている。HRPの酸素化型中間体がペルオキシダーゼ活性を有することから，同君の研究結果は，酸素化型中間体が基質酸化の速度の調節の役割を果しているという考えを支持するものとして注目に価する。

第3章では，カタラーゼのヘム鉄の還元が試みられた。これまで，カタラーゼのヘム鉄の適切な還元法は報告されていなかった。したがって，同君の研究結果は，初の成功例として価値あるものである。また，還元型カタラーゼと一酸化炭素との親和性の測定から，同酵素が4つのサブユニットを持つにもかかわらず，アロステリック酵素ではないことを指摘したのは，非常に興味深い。

以上のように，清水君の研究は，カタラーゼの反応性の基礎的研究を行ない，同酵素の生体防御における役割に関する重要な情報を与えるものであり，理学博士の学位論文として十分価値あると認める。