



Title	光合成細菌の3種のNADHおよびNADPH－低Em色素オキシドレダクターゼの精製と性質
Author(s)	佐伯, 和彦
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35205
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

氏名・（本籍）	佐 伯 和 彦
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 7 1 7 7 号
学位授与の日付	昭 和 61 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	光合成細菌の3種のNADHおよびNADPH——低Em色素オキシド レダクターゼの精製と性質
論文審査委員	(主査) 教 授 堀 尾 武 一 (副査) 教 授 佐 藤 了 教 授 松 原 央

論 文 内 容 の 要 旨

光合成細菌 (*Rhodospirillum rubrum*) のヒドロゲナーゼは、電子供与体として還元型メチルビオローゲン (MV) ($E_m, \tau = -0.44$ V) を用いると、還元型フェレドキシンを用いるよりも約20倍早い速度で水素を発生する。本研究では、NADHあるいはNADPHによってMVを効率よく還元することのできる3種の酵素 (NADH-MV還元酵素, およびNADPH: MV還元酵素LとH) が、光合成的に生育した *R. rubrum* の細胞質に存在することを見出し、精製を行って性質を調べた。

NADH-MV還元酵素は、菌体抽出液から4.4%の収率で1,500倍に精製された。精製は、抽出、硫酸分画、さらにセファロース、DEAE-セファロース、フェニル-セファロース、ブルーセルロファイン、TSK-Gel G 3000 SWを用いるクロマトグラフィによった。DEAE-セファロースを用いるイオン交換クロマトグラフィの過程で、この酵素およびNADPH: MV還元酵素LとHは互いに分離された。精製標品は、SDS-および非SDS-ゲル電気泳動においてはほぼ単一バンドをしめした。この酵素は、分子量 (M_r) 22万、等電点 (pI) 4.8 をもち、その1分子は $M_r = 5$ 万7千の単量体の4個で構成され、単量体あたりほぼ1個のFADを含んだ。活性の至適pHは8、NADHおよびMVに対する K_m はそれぞれ $115 \mu\text{M}$ および 1.3 mM 、そして分子活性は $1.3 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ であった。また、活性は20—100 mMのアンモニアイオンで約2.4倍に促進された。この酵素は、ベンジルビオローゲン (BV) ($E_m, \tau = -0.36$ V)、メチレンブルー (+0.011 V)、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCPI) (+0.217 V) をMV還元速度の85—66%の速度で還元した。MV, BV, メチレンブルーおよびDCPIを電子受容体として用いた場合、NADHによる活性はNADPHによる活性の、それぞれ、83, 133, 41および5.5倍であった。

NADPH-MV還元酵素Lは、菌体抽出液から1.7%の収率で2,400倍に精製された。精製は、抽出、硫

安分画、さらにセファロース、DEAE—セファロース、フェニル—セファロース、マトレックスレッドゲル、TSK—Gel G 3000 SWを用いるクロマトグラフィによった。精製された酵素標品は非SDS—ゲル電気泳動的においてはほぼ単一のバンドをしめした。この酵素はMr 7 万, pI 4.2 をもち、その1分子はMr = 5 万 2 千とMr = 3 万 6 千の2種の単量体それぞれ1個ずつで構成されていた。活性の至適pHは8—9, NADHおよびMVに対するKmはそれぞれ3.8 μ Mおよび1.6 mM, そして分子活性は $3.2 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ であった。この酵素は、BVあるいはDCPIをMV還元速度のそれぞれ128 および47%の速度で還元した。MV, BVおよびDCPIを電子受容体として用いた場合には、NADPHによる活性はNADHによる活性の、それぞれ110, 75および1.8倍であった。

NADPH—MV還元酵素Hは、菌体抽出液から15%の収率で5,500倍に精製された。精製は、上記のNADPH—MV還元酵素Lの場合とほぼ同じ操作によった。精製された酵素標品は、SDS—ゲル電気泳動においてはほぼ単一のバンドをしめした。この酵素はMr 11 万, pI 4.1 をもち、その1分子はMr = 4 万 2 千の単量体の2—3個から構成されていた。活性の至適pHは8, NADHおよびMVに対するKmはそれぞれ130 μ Mおよび1.5 mM, そして分子活性は $1.2 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ であった。この酵素はBVをMV還元速度とほぼ同じ速度で還元した。MVおよびBVを電子受容体として用いた場合には、NADPHによる活性はNADHによる活性の、それぞれ、92および86倍であった。

精製NADH—MV還元酵素に対するラット抗血清は、抗原および菌体抽出液によるNADH : MV 酸化還元活性をそれぞれ90と78%阻害したが、クロマトフォアによるNADH : MV酸化還元活性、およびNADPH—MV還元酵素LとHおよび菌体抽出液によるNADPH : MV 酸化還元活性を阻害しなかった。

論文の審査結果の要旨

光合成細菌は太陽光をエネルギー源として、水素ガスを発生したり、空気中の窒素をアンモニアなどの窒素化合物の形で生体内に固定することができる。これらの反応の最終段階には、それぞれ、ヒドロゲナーゼおよびニトロゲナーゼが関与することが知られている。けれども、上記の反応に必要な還元力を供給する光合成電子伝達系との関連性、特に、電子伝達系から供給される電子を上記の反応に渡す電子運搬反応に関しては、未解決な問題が多い。

佐伯和彦君は、光合成細菌Rhodospirillum rubrumのヒドロゲナーゼが、非常に低い酸化還元電位(E_m)をもつメチルビオロゲンの還元型からの水素発生反応を効率よく触媒する事実に基き、光合成電子伝達系によって生成されるNADHおよびNADPHによるメチルビオロゲンの還元を触媒する酵素の検索をR. rubrumを用いて行った。その結果、菌体の細胞液中に、NADHによるメチルビオロゲン還元酵素およびNADPHによるメチルビオロゲン還元酵素LとHの計3種が存在することを発見し、それぞれを高度に精製し、酵素化学的性質を詳細に調べた。上記の3種の酵素は、いずれも、 E_m の高い酸化還元化合物よりも E_m の低いメチルビオロゲンやベンジルビオロゲンを効率よく還元した。また、NADH酵素はアンモニウムイオンによって著しく活性化されるのに対して、2種のNADPH酵素はむしろ阻害された。これ

らの結果は、光合成細菌だけでなく、嫌気性微生物において、水素発生、窒素固定などに必要な低E_m 電子運搬体の還元を上記のNADH酵素および2種のNADPH酵素の関与が期待されることを示唆するとともに、光合成細菌の窒素代謝の調節機構の解明に寄与する可能性が高い。

上記の理由に基き、佐伯和彦君の研究業績は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。