Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | アドレノドキシン還元酵素のセミキノン生成機構 |
| Author(s) | 野中, 泰樹 |
| Citation | 大阪大学, 1986, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/35429 |
| 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

【12】

| | |
|---|---|
| 氏名・(本籍) | 堅(の) 中(なか) 泰(やす) 樹(き) |
| 学位の種類 | 医 学 博 士 |
| 学位記番号 | 第 7338 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和61年5月12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 | **アドレノドキシン還元酵素のセミキノン生成機構** |
| 論文審査委員 | (主査)<br>教 授 田川 邦夫<br>(副査)<br>教 授 中馬 一郎 教 授 和田 博 |

## 論文内容の要旨

［目　的］

アドレノドキシン還元酵素は副腎ミトコンドリアに存在するステロイド水酸化反応を触媒する酵素系の一成分である。本酵素はＦＡＤを補酵素とするフラビン酵素であり，ＮＡＤＰＨからの電子を鉄イオウ蛋白質であるアドレノドキシンを介してシトクロムＰ－450に伝達する。この際，二電子供与体であるＮＡＤＰＨからの電子を一電子受容体であるアドレノドキシンに伝達する電子伝達反応の機構の解明は本酵素の生理的機能の理解に不可欠である。本研究では，フラビン酵素の種々の酸化還元状態を考慮し，特に完全酸化状態と完全還元状態との中間状態と考えられているセミキノン状態に注目し，本酵素のセミキノン生成の機構を解明する事によって二電子から一電子への変換機構を考察した。また本酵素の補酵素であるＦＡＤとＮＡＤＰ(Ｈ)との相互作用の様式を検討するために $^{1}$Ｈおよび $^{31}$Ｐ ＮＭＲ測定を行った。

［方　法］

アドレノドキシン還元酵素は牛副腎より精製した。さらに本酵素の構造を静的に決定するためにＸ線解析を行いうる本酵素の単結晶を作成した。セミキノン生成の機構を調べるため，アドレノドキシン還元酵素を50mM PIPES－HCl，pH7.4に溶解し，25℃，嫌気条件下でＮＡＤＰＨ溶液にて滴定し，その吸収スペクトルを日立二波長分光光度計557型を用いて測定した。ＮＭＲスペクトルは200MHzのVarian XL－200 Fourier transform spectrometerにて12.0℃で測定した。試料はアドレノドキシン還元酵素，510μＭ；ＮＡＤＰ$^{+}$，2.1mMを含み，嫌気にした後，ＮＡＤＰＨ generating systemを加え，ＮＭＲセルを封じた。遊離のＮＡＤＰ$^{+}$及びＮＡＤＰＨの濃度はＮＭＲスペクトルにて各々，複数個のピークの

面積から測定した。

［結　　果］

アドレノドキシン還元酵素を嫌気条件下でＮＡＤＰＨを用いて滴定し，可視分光スペクトルにて測定したところ，ＮＡＤＰＨが酵素に対して１：１に達するまでは約500－900nmに幅広い吸収スペクトルを示す電荷移動錯体の生成が見られた。つぎにＮＡＤＰＨを過剰に加えたところ電荷移動錯体が急激に減少するとともに575nmにピークを，635nmに肩を示すセミキノンの吸収スペクトルが出現した。そしてセミキノンの濃度はＮＡＤＰＨが酵素に対して３倍付近になった時に，最大に達した。この事は明らかにセミキノンの生成には本酵素に対し過剰のＮＡＤＰＨが必要である事を示している。さらにＮＡＤＰＨを加えたところ，セミキノンもまた減少し可視部にはほとんど吸収スペクトルを示さない完全還元体が生成された。$^{31}$Ｐ ＮＭＲを用いて検討したところ，本酵素に結合するＮＡＤＰ$^{+}$はただひとつである事が分かった。さらに$^{1}$ＨＮＭＲによって種々の還元状態でのＮＡＤＰ(Ｈ)の結合数を調べたところ本酵素の酸化還元状態にかかわらずただ一つである事が示唆された。また本酵素の立体構造を決定するため本酵素の単結晶を作成し，1.6㎜の大きさの結晶を得た。Ｘ線解析によりこの結晶はＰ２$_1$の空間群に属しその単位格子はａ＝83.6Å，ｂ＝62.6Å，ｃ＝59.3Å，$\alpha=\gamma=90°$　$\beta=107.1°$ であり，非対称単位当り一分子存在した。

［総　　括］

１）アドレノドキシン還元酵素の単結晶の作成に成功し，その結晶定数を決定した。

２）本酵素の$^{31}$Ｐ及び$^{1}$Ｈ ＮＭＲを行い，ＮＡＤＰ(Ｈ)と本酵素との相互作用について検討した。

３）本酵素とＮＡＤＰ(Ｈ)との電荷移動錯体は酸化型および還元型電荷移動錯体が平衡している系である事が示唆された。

４）アドレノドキシン還元酵素のセミキノンは本酵素がＮＡＤＰＨと結合している状態で初めて存在する事が示唆された。

５）本酵素のセミキノンの生成機構について考察を加えた。

## 論文の審査結果の要旨

アドレノドキシン還元酵素は副腎ミトコンドリアに存在するステロイド水酸化反応系に含まれるＦＡＤを補酵素とするフラビン酵素である。この反応系において，二電子供与体であるＮＡＤＰＨからの電子を一電子受容体であるアドレノドキシンに伝達する電子伝達機構の解明は本酵素の生理的機能の理解に不可欠であるにもかかわらず，今日まで不明であった。本論文の著者は，フラビン酵素の種々の酸化還元状態を考慮し，特に酸化状態と還元状態との中間状態と考えられているセミキノン状態に注目し，本酵素のセミキノン生成の機構を解明する事によって二電子から一電子への変換機構を明らかとした。また本酵素の補酵素であるＦＡＤとＮＡＤＰ(Ｈ)との相互作用の様式を検討するために$^{31}$Ｐ ＮＭＲ測定を行った。また本酵素の結晶のＸ線解析をも行い，立体構造解明にも道を開いた。以上の結果は本酵素

の研究上重要な知見であるとともに，フラビン酵素一般の研究に大きな寄与をなしたと考えられる。したがって，本論文は充分学位に値するものと評価する。