

|             |                                                                                                                                      |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | 渡 辺 治 夫                                                                                                                              |
|             | わた なべ はる お                                                                                                                           |
| 学 位 の 種 類   | 農 学 博 士                                                                                                                              |
| 学 位 記 番 号   | 農 博 第 289 号                                                                                                                          |
| 学位授与の日付     | 昭 和 53 年 11 月 24 日                                                                                                                   |
| 学位授与の要件     | 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当                                                                                                              |
| 研 究 科・専 攻   | 農 学 研 究 科 農 林 生 物 学 専 攻                                                                                                              |
| 学 位 論 文 題 目 | Luminescence and Respiratory Activities of<br><i>Photobacterium phosphoreum</i><br>(発光細菌 <i>Photobacterium phosphoreum</i> の発光と呼吸活性) |

論文調査委員 (主 査) 教 授 瀧 本 敦 教 授 森 田 雄 平 教 授 山 田 秀 明

### 論 文 内 容 の 要 旨

発光細菌はルシフェラーゼの働きて還元型 FMN と C<sub>10</sub> 前後の直鎖アルデヒドが分子状酸素によって酸化される際に発光することが知られている。しかし発光の生理的制御機構にはまだ不明の点が多い。本研究は発光と酸素呼吸のいずれもが NADH を電子供与体とし酸素を電子受容体とする酸化反応であることに注目し、両者に含まれる電子伝達系の競合を中心に発光の制御機構を検討したもので、5つの章からなる。

第1章ではまず供試株 (*Photobacterium phosphoreum*) の細胞あたりの発光が他の株と同じく培養初期に一時低下した後、菌体数の増加とともに増大すること、および同じ株から得られた発光力の弱い突然変異株でも同じ現象が認められることを示している。これらのいずれにおいても、培養期間中におけるルシフェラーゼや NAD(P)H-FMN レダクターゼ量の増大は認められないこと、発光力の弱い突然変異株のチトクローム含量は野性株よりも大であることなどから、著者は培養中における発光活性の変化は発光系と呼吸系電子伝達の競合的活性変化に基づくものと推定した。

第2章では電子伝達の活性を支配する要因として一価カチオンの効果を検討している。この実験では外部から与えたイオンの透過性を高めるためにリゾチーム処理したスフェロプラストを用いている。このスフェロプラストに対して K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> は発光を促進し、Na<sup>+</sup> は逆に発光を抑制した。しかし *in vitro* では、ルシフェラーゼおよび NAD(P)H-FMN レダクターゼ活性は Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> のいずれによってもわずかながら促進され、膜系の NADH オキシダーゼの活性のみが Na<sup>+</sup> によって著しく促進された。したがって生体内では Na<sup>+</sup> による呼吸系の活性化が発光系への電子伝達を弱め、発光を抑制するものと考えた。

第3章では外液中の水素イオン濃度と発光・呼吸活性との関係を検討している。スフェロプラストの発光・呼吸活性はアルカリ側で促進され、それぞれ pH 9 および 10 で最高に達するが、*in vitro* での発光系酵素活性は pH 7, NADH オキシダーゼ活性は pH 8 で最大の値を示した。このことはスフェロプラスト (体内 pH は 6 前後) が pH 9~10 の溶液中におかれても、体内 pH は 7 を越さないことを意味し、ス

フィロプラストは水素イオンの出入りに対してかなりの抵抗性を有するものと考えられた。この考えはプロトンコンダクター CCCP 添加で発光活性が低下することによっても支持された。

第4章では陰イオンの効果を検討している。試験した陰イオンのうち  $\text{NO}_2^-$  のみがスフェロプラストの発光・呼吸活性を阻害した。 $\text{NO}_2^-$  は発光系酵素および NADH オキシダーゼの活性を阻害し、その阻害部位は末端オキシダーゼであることが推定された。

第5章では末端オキシダーゼの一つと考えられる d 型チトクロームを膜系から分離精製してオキシダーゼとしての性質を検討している。このチトクロームは b 型および d 型の吸収を示し、それらのピリジノフェロヘモクロームはこれまでに知られているいずれのヘムのフェロヘモクロームとも異った吸収を示した。したがってこれは新しいタイプのヘムを含む新しいチトクロームであると考えられる。このチトクロームは電子供与体としてアスコルビン酸および PMS を与えると酸化酵素として働くが、還元型チトクローム c を酸化することはできない。したがってこれはチトクローム c オキシダーゼではなく、おそらく生体内では CoQ から直接電子を受け取るものであろうと推察した。

この発光細菌は2種類以上の末端オキシダーゼを有することが吸収スペクトルおよび  $\text{CN}^-$  感受性から推察され、本研究で分離精製された“チトクローム b d 型”オキシダーゼは  $\text{CN}^-$  に対して比較的感受性が低く、 $\text{N}_3^-$  に非感受性のオキシダーゼであることが示されている。

## 論文審査の結果の要旨

発光細菌における発光の意義は明らかでないが、本研究はそれを知るための一つの手がかりとして、発光の生理的制御機構に関する研究を行ったものである。実験材料としてはイカから分離した *Photobacterium phosphoreum* を用いている。

細胞あたりの発光は培養初期に一時減少した後、菌体数の増加とともに急速に増大する。たゞしこの期間中に発光を触媒する酵素の量はほとんど変らない。発光と呼吸はいずれも NADH を電子供与体、酸素を電子受容体とする酸化反応であるから、著者は両者の間に電子伝達の競合があるものと考えた。そしてまず一価カチオンの作用を調べたところ、 $\text{K}^+$  と  $\text{Na}^+$  はともに発光系の酵素活性をやゝ促進するが、 $\text{Na}^+$  は呼吸系の活性を著しく促進し  $\text{K}^+$  にはそのような作用のないことを認め、菌体内の  $\text{K}^+$  と  $\text{Na}^+$  の濃度変化が発光活性を制御する要因の一つであると推論している。

また発光および呼吸に対する陰イオンの効果を調べた結果、 $\text{NO}_2^-$  のみが両活性を阻害した。この  $\text{NO}_2^-$  は末端酸化酵素を阻害するものと考えられたので、その阻害機構を調べるために末端酸化酵素を分離精製した。得られた酵素は b 型および d 型の吸収を示す新しいタイプのチトクロームで、それに含まれるヘムも新しい種類のものであり、これを“チトクローム b d 型”と呼んでいる。

分離精製した“チトクローム b d 型”酵素はアスコルビン酸と PMS を与えると容易に還元され、このようにして還元された酵素は酸素で酸化される。しかしこの酵素はチトクローム c を酸化することはできない。したがってこの酸化酵素はチトクローム c を含まない電子伝達鎖に存在するものと考えた。このほか、分離精製した酵素は  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{CN}^-$ 、 $\text{CO}^-$  などと複合体をつくること、この発光細菌には2種類以上の末端酸化酵素が存在することなどを明らかにしている。

このように本論文は発光細菌における発光活性の制御機構に関していくつかの新しい知見を加えるとともに、新しい型のチトクロームを見出したものであり、微生物の代謝生理とくにエネルギー代謝の分野に貢献するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。