

氏 名	木 下 英 明 きのした ひで あき
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	論 農 博 第 813 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 7 月 23 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	ポーログラフたん白波の理論と応用に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 千 田 貢 教 授 千 葉 英 雄 教 授 米 澤 大 造

論 文 内 容 の 要 旨

この論文は、通常ステン残基を含むたん白質がアンモニア緩衝液中でコバルトイオン共存下であたえる特徴的な接触水素イオン還元電流、いわゆるブルディチカ電流によるポーログラフ波の基礎理論とその応用性について研究した成果をまとめたものである。

1. ブルディチカ電流をあたえるたん白質（以下活性たん白質とよぶ）が電極表面に吸着されて存在すると、零価コバルト-たん白質錯体が一定時間過渡的に電極表面に形成されると考え、ブルディチカ電流はこの錯体濃度に比例すると仮定して理論式を導いた。コバルト濃度が充分小さいときの電流値 I_B は次の式であたえられる。

$$I_B = AFk_B \Gamma f_{Co} \quad (1)$$

ここで A は電極表面積、 F はファラディ定数、 Γ は吸着した活性たん白質の表面濃度、 f_{Co} はコバルトイオンのフラックスである。 k_B は活性たん白質に固有の定数で、コバルト-たん白質錯体の安定度と触媒能とによってきまる。ポーログラフたん白波の各活性たん白質に特徴的な波形、波高、挙動は、 k_B と Γ と f_{Co} の三因子にわけて解析することが重要である。

2. たん白質の吸着性が強く、 Γ が拡散律速によってあたえられると考えられる電極電位の範囲について、(1)式から、滴水銀電極 (DME) 及び吊り下げ水銀滴電極 (HMDE) におけるブルディチカ電流の理論式を導いた。

3. これ等の理論式は、SH/SS たん白質及びへムたん白質の示すブルディチカ電流を定量的に説明することを、ウシ血清アルブミン、ウマ心筋チトクローム、及びクジラミオグロビンについて詳細にわたって実証した。

4. SH/SS たん白質について、SH 基一箇あたりの $k_B(-1.4 \text{ V})$ 値は数種の球状たん白質で $1.2 \sim 1.5 \times 10^{12} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ の範囲にあったが、 κ -カゼイン等での k_B 値はかなり異った。また球状たん白質においても、その吸着状態が変るとその k_B 値も幾分変ることが見出された。これらの k_B 値はコバルト錯体形成の中心となる SH 基に基本的に支配されるが、またたん白質のコンホメーションを含めた化学構造にも

影響される。

ヘムc基をもつ4種のチトクロームのブルディチカ電流においてヘムc基一箇あたりの k_B (-1.4 V)値は $4.3 \times 10^{12} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ であった。ポーラログラフ波のその他の特徴からも、ヘムc基のブルディチカ電流はSH基によるそれと明瞭に区別される。両者が共存するたん白質の電流は両者の寄与の和となる。

システイン残基を含まないクジラミオグロビンでもブルディチカ電流が見出され、これがプロトヘム基によることが示された。SH基が存在する場合は両者の寄与の和の電流が発生する。

これ等 k_B 値の加成性はpH 5.6~9.4において成立つ。

5. ブルディチカ電流はDMEで 10^{-8}g/ml オーダー、HMDEで 10^{-9}g/ml オーダーのたん白質で測定を行うことができる。共存たん白質及びアミノ酸は、著しい低濃度では独立加成性が成立つが、比較的高濃度またはHMDEで吸着時間が長くなると各成分の吸着特性の影響があらわれてくる。

6. チトクロームcのヘム基構造を化学修飾するとブルディチカ電流は変化する。とくに、第6配位子をメチオニンからリジンに変えると k_B 値はほぼ1/2になる。この事実をもとにして*Desulfovibrio vulgaris*のチトクローム c_3 のヘム第6配位子はリジン(pH 9.4)と推定された。

7. ヒトヘモグロビンのブルディチカ電流は2,3-Diphosphoglycerateと錯体を形成させると減少する。これはテトラマーの安定化がブルディチカ電流に影響することによるとして説明される。またこの事実を利用して錯体の解離定数の測定が出来ることが示された。

論文審査の結果の要旨

いわゆるブルディチカ電流によるポーラログラフたん白波の分析化学的応用は、この方法の感度及び測定対象からみてなお多くの適用領域があると考えられるにもかかわらず、その反応機構解明等基礎的研究が不十分なこともあり、充分に進展しているとはいいいがたい。

本論文は、このブルディチカ電流の反応機構の解明を試み、その成果にたつて本法の新しい応用面の可能性を示した研究結果をまとめたものである。

すなわち、ブルディチカ電流が電極表面に過渡的に形成される零価コバルト-たん白質錯体によるとして理論式を導き、電流値をたん白質の吸着状態における活性能をあらわす k_B 値、たん白質の吸着量及びコバルトイオンのフラックスの三つの因子であらわす基本式をえ、これをSH/SSたん白質及びチトクロームの示すブルディチカ電流について実証している。この研究結果によりたん白波解析の基本方法論が確立されたといえよう。またこの理論によれば、 k_B 値はコバルト錯体自体の活性能と錯体の安定度によって規定される。定量的解析が比較的容易な-1.4 V(対飽和カロメル電極基準)での k_B 値を多数のたん白質について求め、これらをSH基及びヘム基によるものに分類、検討を加え、たん白質構造との相関についても考察を加えている。特に、従来しられていなかったプロトヘム基によるブルディチカ電流を見出したこと、またチトクロームのヘムc基によるブルディチカ電流がSH基によるブルディチカ電流と明確に区別しうることを明らかにしたこと、さらにこのブルディチカ電流がヘム第6配位子をメチオニンからリジンに変えることにより顕著に変化することを見出したことなどは興味深い結果である。この最後の事実をもとにして、*Desulfovibrio vulgaris* チトクローム c_3 のヘム第6配位子がリジン(pH 9.4)であろう

と推定している。

本法が極めて高感度であることの理論的基礎について考察を加え、実際、吊り下げ水銀滴電極を用いて ng/ml オーダーのたん白質の測定が出来ることを示し、また共存たん白質やアミノ酸の妨害についても検討している。また、たん白質のサブユニットからなる高次構造の安定性がブルディチカ電流に影響する例として、ヒトヘモグロビンと 2,3-Diphosphoglycerate との錯体形成について測定し、その解離定数が決定できることを示している。

以上のように、本論文はたん白質の化学並びに分析化学の分野に寄与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。