

【 25 】

氏 名	真 鍋 敬 ま なべ たかし
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 290 号
学位授与の日付	昭 和 48 年 5 月 23 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	セルロプラスミンの速度論的研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 波多野博行 教 授 香月裕彦 教 授 大杉治郎

論 文 内 容 の 要 旨

ヒトセルロプラスミンをヒト保存血よりコーンの分画法で分離精製し、クロマトグラフ的にも、超遠心的にも、また電気泳動的にも均一と認められる結晶標品を得ることに成功し、これについてその酵素反応機構を明らかにするために速度論的な研究を行った。

この標品は分子量約 160,000 で 1 分子中に銅原子 8 個を含み、そのうち 4 個は 2 価の銅である。セルロプラスミンはポリアミンやポリフェノール類を酸化する酸化還元酵素で、その基質を酸化する過程は 1 電子移行であり、酸素分子により再酸化される過程は 4 電子移行で過酸化水素などを生じないことが知られているが、その詳しい反応の機構も、銅原子の存在状態や役割についても未だ不明の点が多い。

セルロプラスミンの N, N'-ジメチルパラフェニレンジアミンを酸化する酵素活性はその阻害剤であるナトリウムアザイドによって強く阻害されるが、その反応の素過程を明らかにすればこの酵素の反応機構を解明するのに大いに役立つものと考えられる。

この目的でセルロプラスミンと N, N'-ジメチルパラフェニレンジアミンとの反応、およびセルロプラスミンと酸素との反応の、前定常状態における速度とそれにおよぼすナトリウムアザイドの効果をストップドフロー法を用いて調べた。

まず超遠心法によりセルロプラスミンの S 値を決定した結果 7.0 を得た。次に酸化状態のセルロプラスミンの基質による還元過程におよぼすナトリウムアザイドの影響をストップドフロー法を用いて調べた。610 nm の吸収極大を示し特有の ESR シグナルを与える第 1 の型の 2 個の 2 価の銅の N, N'-ジメチルパラフェニレンジアミンによる還元過程において 610 nm の吸収の減少は約 4 秒で終了し定常状態に入る。この反応の初速度はナトリウムアザイドの存在によって影響をうけないが、定常状態の酵素反応速度は影響をうけ、もとの約 60% に減少する。この結果はセルロプラスミンの反応の全過程のうちアザイドによって阻害される素過程は前述の第 1 の型の 2 価の銅が基質により還元される過程ではないことを示すものである。

酸化状態にあるセルロプラスミンとナトリウムアザイドとの結合は2価の銅を介して行われると思われるので、その強さを調べた。酸化状態にあるセルロプラスミンの溶液にアザイドを加えると可視部 380 nm 付近に吸収極大をもつ吸収帯が現れる。このとき 610 nm の吸収は変化せず第1の型の銅とは異なる2価の銅とナトリウムアザイドとの結合によるものであることが ESR を用いて明らかにされた。

あらかじめアスコルビン酸で還元しておいた還元状態にあるセルロプラスミンの酸素分子による酸化の過程において、従来知られていなかった新しい吸収帯を 420 nm 付近に見出した。この吸収帯は従来知られている 330 nm, 610 nm の吸収帯の現われる2つの様相のうち的一方と対応していることが見出された。この2つの様相はいずれも酸素濃度の影響を受けず、ナトリウムアザイドによって顕著に阻害される。

これらの結果はセルロプラスミンの銅原子の間に電子伝達系が構成されていること、および還元状態のセルロプラスミンが酸素分子によって酸化される過程の中にナトリウムアザイドによって阻害される素過程が含まれていることを示すものである。

論文審査の結果の要旨

セルロプラスミンは哺乳類の血液中に存在する銅を含むタンパク質である。ヒトセルロプラスミンは分子量約 160,000, 1分子中に8個の銅原子を含みそのうち4個が2価の銅で、しかもその2つずつがまた相異なる存在状態にあることが知られている。このタンパク質はポリアミン、ポリフェノールおよび2価の鉄などを酸化する酸化還元酵素の活性を有している。この酵素反応の機構に関して、またその際の銅原子の役割について、すでに若干の研究があり、これが基質を酸化する過程は1電子移行であるのに対し酸素分子により再酸化される過程は4電子移行で過酸化水素を生じないことが知られていた。この矛盾を説明するために Curzon は4個の2価の銅原子が互に近傍に配位していて酸素分子との間に一斉に1電子移行を行なうという説を唱えた。しかし Malkin らはこの8個の銅を3種に分類し、銅原子はそれぞれ相異なる存在状態にあり銅原子間にも電子移動が存在すると考えており、Curzon の説は否定されている。

Malkin の分類した3種の銅とは、(1) 610 nm に吸収極大を与え特有の ESR シグナルを示す2価の銅2個、(2)可視部に吸収を与えず(1)のものとは異なる ESR シグナルを示す2価の銅2個、(3) 330 nm の吸収の変化に寄与し ESR では検出されない銅原子4個であって、(1)と(2)との銅は酵素反応にあづかるもので、(3)の銅は酸素との結合にあづかるものとされてきた。

申請者はセルロプラスミンの酵素反応の機構を詳細に解明するためにその素過程を反応速度論的に解析すると共に、特に前述の3種の銅の存在状態とその役割を明らかにしようとしたものである。そのために申請者はセルロプラスミンの N, N'-ジメチルパラフェニレンジアミンを酸化する酵素活性がナトリウムアザイドによって強力に阻害されることに注目し、この阻害剤によって阻害される酵素反応の素過程を見出そうとした。そのために、迅速反応測定法であるストップドフロー法を用い、セルロプラスミンと N-N'-ジメチルパラフェニレンジアミンとの反応、およびセルロプラスミンと酵素との反応についてその前定常状態における速度と、その速度に及ぼすナトリウムアザイドの効果とについて調べている。

その結果、明らかにされたことは、あらかじめアスコルビン酸で還元しておいたセルロプラスミンの酸素分子による酸化の過程において、従来知られていなかった新しい吸収帯を 420 nm 付近に見出したこと、

この吸収帯は従来知られている 330 nm, 610 nm の吸収帯と明らかに区別でき、再酸化の過程における中間体によるものと考えられるという点であった。しかもこの吸収帯の消滅する様相は、610 nm の吸収帯の現われる様相の2つのうち1つと対応していることが見出されている。この2つの様相は共に酸素濃度の影響を受けず、ナトリウムアザイドによっては顕著に阻害されることも明らかにされている。さらにまた、酸化状態のセルロプラスミンが N, N'-ジメチルパラフェニレンジアミンによって還元する反応の初期速度はナトリウムアザイドによって阻害されないことも明らかにされている。

申請者によってえられたこれらの結果はセルロプラスミンの銅原子の間に電子伝達系が存在していることを示すものであり、また還元状態のセルロプラスミンが酸素分子によって酸化される過程の中にナトリウムアザイドによって阻害される素過程が含まれていることを示すものである。これによって明らかにされた結果は従来不明のままで残されていたセルロプラスミンの機能を明らかにする上で極めて重要な知見を与えたものである。

要するに申請者の研究は生物物理化学において貴重な知見を加えたのみならず方法論的にも迅速反応法を駆使して反応の素過程を明らかにした先駆的業績であり、この分野の進歩に寄与する処が少なくない。

参考論文をも含めて申請者は豊富な学識とすぐれた能力とをもちていることを認めることができる。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。