

Title	STUDIES ON CHEMICALLY MODIFIED CYTOCHROME c. part I. The Trinitrophenylated Cytochrome c.
Author(s)	Wada, Keishiro
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/1208
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	和 田 敬 四 郎
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 1782 号
学位授与の日付	昭 和 44 年 6 月 25 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	化学修飾を施されたチトクロム c に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 奥貫 一男 (副査) 教授 佐藤 了 教授 成田 耕造

論 文 内 容 の 要 旨

細胞呼吸における末端電子伝達系(チトクロム酸化酵素)はチトクロム(Cyt と略す) a および Cyt c の共同作用によることがこれまでの研究で明らかにされてきた。Cyt c は分子量約 13,000のヘム c をもった塩基性のたんぱく質である。リジン残基を種々の試薬で修飾すると、活性は変化する。アセチル(Acetyl)化するとき、導入された Acetyl 基の数に比例して活性は徐々に低下する。一方リジン残基を TNP 化すると、活性は1個の TNP 基の導入で急激に低下し、50%となる。この活性の低下の差を明らかにするために、修飾されたリジン残基の位置を決めたところ、Acetyl 化に対しては、まず、22番目、次いで13番目のリジン残基が、TNP 化に対しては、まず、13番目、次いで22番目のリジン残基がそれぞれ修飾されることが明らかになった。このことから、Cyt c の活性の急激な低下は13番目のリジン残基が Acetyl 化ではなく、TNP 化されることに関連しているものと思われる。

一方、Cyt c 中のリジン残基およびチロジン残基をすべて Acetyl 化した標品では酸化型において著しいスペクトル変化が認められた。この変化は pH に依存しており、pH の低下と共に高スピン型スペクトルになった(このことは Theorell と Åkesson によってすでに報告されている)。還元型ではほとんどスペクトルは変化しないが、自動酸化能や CO 結合性を示した。また、高スピン型スペクトルは温度にも依存し、極低温では低スピン型スペクトルに変換する。これは Cyt c の高スピンおよび低スピンの状態が熱平衡状態にあることを意味している。これは、これまで Cyt c については知られていなかった新事実である。

これらの結果から、Cyt c の安定性、ヘムのまわりの環境、ヘム鉄の状態変化などが化学修飾と関連づけて考察される。

論文の審査結果の要旨

ウシ心筋チトクロム (Cyt) *c* には18個のリジン残基があり、それらの大多数は分子の外面に ϵ -NH₂ 基を露出して、容易に化学的に修飾される一方、Cyt *c* 分子の親水性の一因をなしている。

和田君は無水酢酸、無水コハク酸を用いた場合と同じように、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) を用いて Cyt *c* をトリニトロフェニル化した (以下 TNP-Cyt *c*)。適当な反応条件下では Cyt *c* 1分子当たり TNP 1ないし数個が結合した Cyt *c* の混合物が得られる。それにカチオン樹脂クロマトグラフィーを施して 1TNP-, 2TNP-, 3TNP-Cyt *c* などをそれぞれ分別単離、各 TNP-Cyt *c* 区分の諸性質をアセチル化 Cyt *c* および末処理 Cyt *c* のそれと比較検討して興味ある新知見が得られた。たとえば、上記各 TNP-Cyt *c* 区分を酵素分解して TNP 化されたリジン残基は Cyt *c* の N 末端から何番目に位するものであるかをアミノ酸分析器を駆使して決定した。TNP 化の場合には、まず13番目、ついで22番目に位するリジン残基が修飾され、Cyt *a* と共力して発現する Cyt オキシダーゼ活性を著しく減少させることを確め、アセチル化 Cyt *c* の場合と著しく異なることを明示した。これは、おそらく、TNP のような、大きな分子がヘム近傍のリジン残基に結合したことによる立体障害であろうと思われる。

アセチル基のように比較的小さい分子で Cyt *c* の全リジン残基を修飾しても吸収曲線にほとんど変化がないにもかかわらず、さらに4個のチロジン残基がアセチル化されると酸化型の吸収曲線を顕著に変化させるばかりでなく、自酸化性や一酸化炭素または青酸などの反応性が著しくあらわれ、ヘム近傍の高次構造に顕著な変化が起ることを示した。したがって、チロジン、トリプトファン、メチオニン残基などがヘム近傍に位して特徴ある環境を形成し、中性付近では低スピン型として、電子伝達機能を果していると推定した。

要するに、和田君の論文は Cyt *c* のリジン残基とヘム近傍の高次構造に新知見を加えたもので、参考論文の成績とあわせ考え、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認定する。