

硫酸還元菌の亜硫酸還元酵素系

に関する研究

北海道大学大学院薬学研究所

小林 邦彦

(1973. 2. 8)

硫酸還元菌の亜硫酸還元酵素系に関する

研 究

小 林 邦 彦

(1973.2.8)

目 次

緒 言	4
実験方法	7
実験結果	
第1章 亜硫酸還元酵素系の分割と、中間生成物トリチオニ酸、 チオ硫酸の同定	16
1-1 ヒドロキシルアパタイトによる亜硫酸還元酵素系の分割	
1-2 亜硫酸還元の中同生成物の同定と定量	
1-3 亜硫酸還元経路と酵素系の推定	
第2章 亜硫酸還元酵素の精製とその性質	21
2-1 亜硫酸還元酵素の精製	
2-2 亜硫酸還元酵素と desulfovirdin との同一性	
2-3 P ミノ酸組成, 分子量と subunit 構造	
2-4 亜硫酸還元酵素の発色団について	
第3章 亜硫酸還元酵素の反応様式について	29
3-1 反応の pH 依存性	
3-2 基質特異性	
3-3 反応の時間経過と反応生成物の分析	
3-4 基質濃度による反応型の変化	
第4章 トリチオニ酸還元酵素とチオ硫酸還元酵素の分離、 精製と、その性質	39
4-1 トリチオニ酸還元酵素の分離とその性質	
4-2 チオ硫酸還元酵素の精製とその性質	

第5章	亜硫酸還元反応への電子伝達系	41
5-1	flavodoxin の精製とその性質	
5-2	酸化還元反応への flavodoxin の関与	
5-3	亜硫酸還元酵素系と電子伝達系	
考	察	48
謝	辞	53
文	献	54

緒 言

生物界において、イオウ原子 (S) は蛋白質、補酵素など多くの生体成分に含まれ、生体の機能維持に重要な役割を演じている。

これらの有機化合物中にイオウ原子をとりこむために、多くの植物、微生物では同化的な硫酸還元がおこなわれている (総説: 旭 1964, Roy & Trudinger, 1970)。又、生体成分中のイオウ原子は、無機硫酸 SO_4^{2-} あるいは硫化水素 H_2S として体外に排泄される。

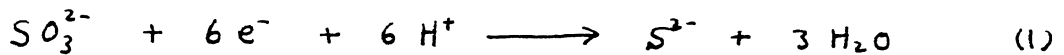
こうしたイオウ原子の有機物への同化と異化に加えて、硫酸還元菌により SO_4^{2-} の H_2S への還元、イオウ細菌による H_2S の SO_4^{2-} への酸化が営まれる。これは、地球化学的なイオウの循環を形成している (たとえば小山, 1966, Postgate 1968 参照)。

硫酸還元菌は偏性嫌気性菌で、酸素の不足した海底、下水泥、水田土壌などに生育する。 SO_4^{2-} を還元して H_2S を発生するため、硫酸還元菌の生育は農産物、水棲生物の生育阻害、死滅をもたらす。また、水中、土中の埋設金属の腐食 (総説: 下平, 1970) や大気汚染の原因となるなど、産業や環境衛生に多大の影響を与えている。 H_2S による大気汚染は、特に都市では重大問題化している。

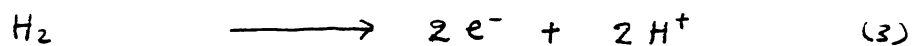
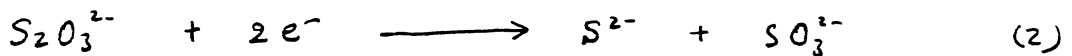
下水道や都市汚水からの H_2S 発生には硫酸還元菌が大きな比重を占めている (石本ら, 1972, 山田ら, 1971)。

人間生活に大きな影響をもつ点に加えて、硫酸還元菌は、偏性嫌気性菌であるにもかかわらず、 α -D-グルコースをもつことが発見されて以来 (Jahimoto et al. 1954 b, c, 1955 b, Postgate, 1954, 1955)。生化学的には、原始的呼吸——硫酸呼吸 (Jahimoto & Egami, 1959) を行なう生物として注目されてきた (総説: 石本, 1960, Postgate 1965)。

硫酸還元菌 *Desulfovibrio* は、 SO_4^{2-} と H_2S に互に還元する才1段階の ATP により活性化 ~~した~~ adenosine 5'-phosphosulfate (APS) を形成し (Ishimoto: 1959, Ishimoto & Fujimoto 1959, Peck 1959, 1962), 次の APS は還元さ^れ (注) SO_3^{2-} を生成する (Ishimoto & Fujimoto 1961b, Peck et al. 1965). SO_3^{2-} は更に還元され、最終的に H_2S となる (式1)。



硫酸還元菌の菌けん濁液、あるいは無細胞抽出液で SO_3^{2-} の還元と、それにとまらう H_2S の生成が見られ (Ishimoto et al., 1954a, 1955a, Millet 1955) から久しい。しかし、亜硫酸還元酵素の研究は、チオ硫酸還元酵素 (Ishimoto et al., 1955a, b, 1957a, 1958) (反応式2) やヒドロゲナーゼ (Ishimoto et al. 1957a, Sadana & Jagannathan 1956 等) (反応式3) などの



比べてほとんど進んでおらず、植物や酵母、細菌に見られる同化的硫酸還元系に含まれる亜硫酸還元酵素 [H_2S : NADP oxidoreductase, EC, 1.8.1.2] (式1) と類似の酵素が、硫酸還元菌においても SO_3^{2-} から H_2S への還元 ~~に~~ に働いていると考えられた。Ishimoto & Yagi (1961a) は、この酵素の精製を試み、比活性が粗抽出液の約7倍に上昇した標品を得、これがチオ硫酸還元酵素、ヒドロゲナーゼとは別の分画に属することから、亜硫酸還元^酵素がこれとは別の酵素であることを示した。部分精製した酵素による^{反応の}化学量論比については述べない。

また、 SO_3^{2-} 還元系への電子伝達体については、Ishimoto et al (1958, 1961a) が *D. vulgaris* の粗抽出液において、 H_2 による SO_3^{2-} の還元は cytochrome c_3 が中間電子伝達体となることを示し、また、Le Gall & Dragoni (1966), Le Gall & Hatohikian (1967) は、*D. gigas* において ferredoxin と他分

子のフラビニ-蛋白質 flavodoxin が、やはり SO_3^{2-} の還元のための電子伝達体として働いていることを示した。しかし、これら3つの電子伝達体は、単独でヒドロゲナーゼと還元酵素の間をつないでいるか、あるいは連鎖をなして電子伝達を行なうのか 明らかではなかった。

著者ら (小林ら ^{Kobayashi et al}, 1968 a, b, 1969) は、*D. vulgaris* の抽出液をヒドロキシルアパタイトのクロマトグラフィーで分画し、その緑色画合が、 SO_3^{2-} を還元するが H_2S の生成はわずかにあることも発見し、これがきっかけとなって、 SO_3^{2-} の還元には複数の還元酵素が必要なこと、中間にトリチオチン酸 $S_3O_6^{2-}$ 、チチン酸 $S_2O_3^{2-}$ を經由することを見出した。更に、この酵素系に含まれる各還元酵素——亜硫酸還元酵素、トリチオチン酸還元酵素、チチン酸還元酵素——を分画、精製し、その性質を調べた (小林ら, 1969 b, 1970 b, 1971, 1972, -

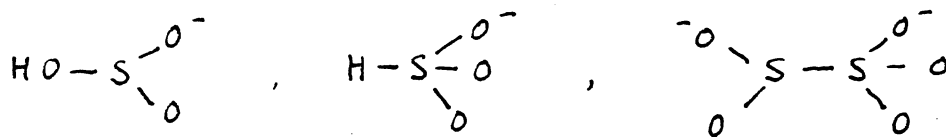
Kobayashi & Ishimoto 1972, Kobayashi et al 1972, 小林, 1967, 小林, 石本 1967)。

また、*D. vulgaris* より flavodoxin を抽出、精製し、これが cytochrome c_3 と共同で SO_3^{2-} 還元系への電子伝達に関与していることを明らかにした (小林ら, 1969 a, 1970 a, 入江ら 1971, 1972, Jrie et al 1973)。

本論文では これらの研究成果を報告する。

注)

亜硫酸イオンは、水溶液中で pH によって SO_3^{2-} , HSO_3^- の形をとり、又、酸性亜硫酸イオン HSO_3^- も、その濃度により下記のように存在する (Golding,



1960) が、本論文では、これらも含めて SO_3^{2-} であらわした。硫化水素 (硫化物) は H_2S または S^{2-} であらわした。

実験方法

硫酸還元菌の培養 水田より分離された硫酸還元菌 (Ishimoto et al., 1954a)

Desulfovibrio vulgaris 宮崎株 (今般は Postgate & Campbell, 1966, による。株の命名は Yagi & Murayama, 1971) と Ishimoto et al. (1954a) の方法で嫌氣的に培養した。培地は 1 l 中に、 γ -アミノ 5 g, 肉エキス 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g, $(NH_4)_2SO_4$ 5 g, KH_2PO_4 0.1 g, 50% 乳酸 10 ml を含み、 $NaOH$ で pH を 7.0 にあわせた。大量培養は 5 l 丸底フラスコに培地約 5.4 l を入れ滅菌後、前培養 200 ml を加え、更にフラスコの "首" まで培地をみだし、1 日、 $37^\circ C$ で静置培養した。通常、1 日に 60 l (丸底フラスコ 10 本分) 培養し、遠心集菌後、0.85% $NaCl$ で 2 回、0.05 M リン酸緩衝液あるいは Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で 1 回洗い、この緩衝液で 1:1 (湿重量/体積) にけん濁し、凍結保存した。

粗抽出液、粗酵素液、ヒドロゲナーゼ、および cytochrome c_3 の調製
菌けん濁液を 15 分間音波破砕 (久保田音波発器 ^生 KM 5-250, 10 kc) し、 $4,000 \times g$, 15 分の遠心により、粗抽出液を得た。

粗抽出液を $20,000 \times g$, 20 分遠心し、その上清 (S₂₀ 画分) を更に超遠心分離 ($105,000 \times g$, 1 時間、あるいは $80,000 \times g$, 2 時間) し、その上清 (S₁₀₀ 画分) を、0.05 M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.0, で緩衝化した Amberlite CG-50 (NH_4^+ 型) 柱と DEAE-セルロース (Cl^- 型) 柱 (いずれも 2×5 cm ないし 4×8 cm) とを通過させ、それぞれ cytochrome c_3 (Ishimoto et al., 1957b) と flavodoxin (小林ら, 1969) を ^{吸着} させた。両柱の通過液を粗酵素液 (電子伝達体除去抽出液) とした (Akagi, 1967)。

粗抽出液の $20,000 \times g$, 20 分遠心の沈むんを、0.05 M Tris-HCl 緩衝液,

pH 7.0, 2-3回^{遠心}洗浄し. 同じ緩衝液にけん濁したもの (P₂₀画分) と. 沈
殿画分のヒドロゲナーゼ標品とした (Johimoto & Koyama, 1957a). 通
常. この標品の 0.1 ml は 2 mg の蛋白と 0.7 単位のヒドロゲナーゼ活性を
含み. 還元酵素活性はほとんど持たない. 実験によれば. 可溶性したヒ
ドロゲナーゼ標品も用いた. S₂₀画分の超遠心沈殿から Yagi (1970) の方
法でパンクレアチンでヒドロゲナーゼを可溶化し. Sephadex G-200 によるゲ
ル濾過. DEAE-セルロースクロマトグラフィーで部分精製したものを可溶
化ヒドロゲナーゼ標品とした (比活性 10~20 単位/mg 蛋白).

cytochrome c₃ は Johimoto et al. (1957b) の方法で Amberlite CG-50
により精製し. 凍結乾燥したものを用了.

ヒドロキシルパタイトによる亜硫酸還元酵素系の分割 (小林ら, 1968a, b,
Kobayashi et al., 1969) S₂₀画分を. 0.05 M リン酸緩衝液, pH 7.0, で緩
衝化したヒドロキシルパタイト柱 (3 x 3 cm) につけ. 吸着しない素通り
画分を 画分 A とした. ヒドロキシルパタイト柱を 0.05 M 緩衝液で
洗った後. 0.2 M 緩衝液で溶出する緑色画分を 画分 B とした.

亜硫酸還元酵素の精製 (小林ら, 1969b, 1970b, 1971, Kobayashi & Jshi-
moto 1972, Kobayashi et al., 1972) 粗抽出液 100~200 ml を超遠心分離
(105,000 x g 1 時間あるいは 80,000 x g, 2 時間) し. 上清を. 前述のよ
うに Amberlite CG-50 柱と DEAE-セルロース柱とを通過させる. Amberlite
柱通過は. 場合により省略することがある. 両柱の通過液 (電子伝達体除去
抽出液) あるいは DEAE-セルロース柱のみを通過させた画分 (flavodoxin
除去抽出液) に硫酸を加えてゆき. 50% 飽和から 80% 飽和までの沈殿を
0.05 M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.0, に溶かし. 同じ緩衝液に対して透析

する(硫酸画分)。これを、同じ緩衝液で平衡化した DEAE-セルロース柱 (3 x 80 cm) に吸着させ、0.05 M KCl - 0.04 M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.0, で洗った後、0.04 M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.0, の中で KCl 濃度 0.05 より 0.3 M までの直線濃度勾配 (全液量 500 ml) で溶出する。緑色画分 (塩基濃度はほぼ 0.2 M 附近) を集め、80% 飽和硫酸で沈澱し濃縮し、Tris-HCl 緩衝液に透析する (DEAE-セルロース画分)。これを、0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.2, で洗った後、ヒドロキシルアパタイト柱 (1.5 x 12 cm, 吸着剤乾燥重量約 10 g) に吸着させる。0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.2, で洗った後、緑色蛋白を 0.16 M と 0.3 M の同緩衝液で溶出させる。0.16 M 緩衝液溶出画分を限外濾過により濃縮し、緩衝液濃度も下げる (ヒドロキシルアパタイト画分)。これを、断面積 $1.5 \times 5 \text{ cm}^2$ のテンポン床に 1 cm 中に充填し、0.04 M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.0, 中で 1.5 mA/cm^2 の電流で 20 時間電気泳動する。泳動後、テンポンを 1 cm 中に切りとり、各々を前記緩衝液で抽出する (3 回に分け、全量 7 ml)。disc 電気泳動で均一な蛋白帯を示す画分をおわせ、最終標品 (ゾーン電気泳動画分) とした。実験によ、これはヒドロキシルアパタイト画分も酵素標品として用いた。

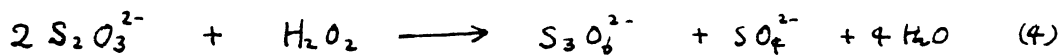
牛乳硫酸還元酵素の精製 (小林, 1967, 小林, 石本 1967) 約 200 ml の粗

抽出液 (S₂₀ 画分) を超遠心し、その上清 (S₁₀₀ 画分) を硫酸画し、1/3 飽和から 2/3 飽和までの沈澱を集める。これを 0.02 M リン酸緩衝液, pH 7.0, にとかし、Sephadex G-25 柱 (4 x 30 cm) により、ゲル濾過、脱塩する (展開溶媒: 0.02 M リン酸緩衝液, pH 7.0 - 0.1 M NaCl)。混性部分 (P₃₃ 画分) を DEAE-セルロース柱 (3 x 70 cm) に吸着させる。0.2 M リン酸緩衝液, pH 7.0 - 0.1 M NaCl で洗った後、この緩衝液中で食塩濃度が 0.1 M から 0.3 M までの直線濃度勾配系で溶出し、混性部分を集める (DE-

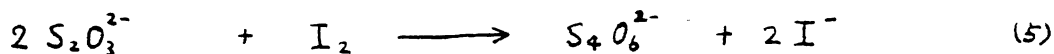
AE画分)。これを、0.02 M リン酸緩衝液、pH 7.0、で平衡化したヒドロキシルパタイト柱 (3 x 2 cm) に吸着させ、同じ緩衝液で洗った後、0.05 M 緩衝液で溶出する。活性画分 (1st HA画分) を、リン酸濃度に関して 0.02 M にまで希釈し、再び、ヒドロキシルパタイト柱に吸着させ、同様に洗って 0.05 M 緩衝液で溶出する。この活性部分 (2nd HA画分) を最終標品とした。

flavodoxin の精製 (小林ら, 1969a, Irie et al. 1973) 粗抽出液の超遠心上清 (S₁₀₀画分) を、0.05 M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.0 で平衡化した DEAE-セルロース柱 (2 x 5 cm) に吸着させる。柱を同じ緩衝液で洗った後、黄褐色物質を 0.5 M KCl-0.15 M Tris 緩衝液で溶出する。溶出液に硫酸を加えて 70% 飽和とし、沈殿を遠心で除く。上清に HClO₄ あるいは HCl を加えて pH を 4 にする。沈殿を遠心で集め、0.05 M Tris 緩衝液、pH 7.0、にとかし、透析後、DEAE-セルロース柱 (2 x 30 cm) に吸着させ、前記緩衝液で洗った後、この緩衝液中で、KCl の 0.5 M までの濃度勾配系で溶出する。黄色画分 (A_{456nm} で測定) をあつめ、DEAE-セルロースクロマトグラフィを再度行ない、精製標品とした。

トリチオニ酸塩、テトラチオニ酸塩の合成 Na₂S₃O₆ · 3H₂O は Willstätter (1903) の方法 (千谷 1959) により、Na₂S₂O₃ を H₂O₂ で酸化して合成した (式 4)。濾紙クロマトグラフィによれば、製品により、わずかに S₄O₆²⁻ を含むことがある。



Na₂S₄O₆ · 2H₂O は Na₂S₂O₃ を I₂ で酸化して合成した (千谷, 1959)。



[³⁵S]-NaHSO₃ 溶液の調製 [³⁵S]-H₂SO₄ と N₂ 流通下で金属銅と加熱還元し、生成した SO₂ を 0.1 N NaOH に吸収させ調製した。pH はほぼ 6.0 で、ヨード滴定により SO₃²⁻ 濃度を定めた。

その他の試薬 NaHSO₃, Na₂S₂O₃ は市販の試薬特級を用いた。

NaHSO₃ 溶液 (通常 0.05 M ないし 0.1 M) は、煮沸し冷却した水で、使用前に調製した。ヒドロキシルパタイトは日本ケミカルより購入された。メチルオレンジ (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylum dichloride) は British Drug Houses Co. 製のものを用了。

亜硫酸還元酵素活性の測定

亜硫酸還元酵素活性は、ヒドロゲナーゼ^{*}-

メチルウイオロゲン系と共役させ、 SO_3^{2-} 還元による消費される H_2 吸収を
換圧法により求める方法で測定した (Ishimoto & Yagi, 1961)。標準反応
液は リン酸(Na)緩衝液 pH 6.0 80 μ moles, メチルウイオロゲン 1 μ mole,
 $NaHSO_3$ 5 μ moles, D. vulgaris ヒドロゲナーゼ (P20 画分, 2 mg 蛋白, 0.7
単位) と酵素を含む(全量 1.0 ml)。気相は H_2 2%^{反応} 温度は 30°C とする。War-
burg フラスコの側室から基質を主室に添加して反応を開始し、 H_2 吸収速度が
1 μ mole/min とする酵素量を 1 単位とした。

チチ酸還元酵素活性の測定

上記と同様の H_2 吸収測定により (Ishimoto

et al. 1955)。pH 7.5, 基質: $N_2S_2O_8$ 5 μ moles 以外は亜硫酸還元酵素測定
の反応液と同じである。クロマトグラフ - の各分画の酵素活性^{の検出}

は、 $N_2S_2O_8$ で還元したメチルウイオロゲンと電子伝子体とし、反応
で生成する H_2 を定量する方法 (小林, 1967) を簡便法として用いた。

酵素 1 単位は H_2 吸収速度が 1 μ mole/min とする酵素量である。

desulfovividin の測定

10 mm キベットの 610, 630, 650 m μ の吸光度を

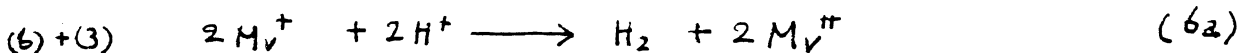
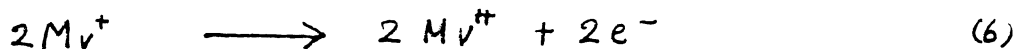
それぞれ A_{610} , A_{630} , A_{650} としたとき $A_{630} - (A_{610} + A_{650})/2$ の値を de-

sulfovividin の^{濃度}単位として用いた。クロマトグラフ - の desulfo-
vidin の溶出位置は 630 m μ の吸光度で求めた。

ヒドロゲナーゼ活性の測定

$N_2S_2O_8$ で還元したメチルウイオロゲン

の H_2 発生速度 (Tamiga et al, 1955) により求めた。酵素 1 単位は Yagi et al
(1968) の条件で、1 分あたり 1 μ mole の H_2 を発生する酵素量とした。

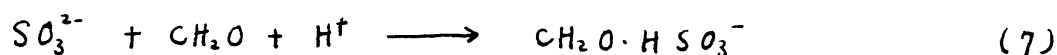


* H_2 : ferricytochrome c_3 oxidoreduc case

イオウ化合物の定量法

1) ヨード滴定による SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$ の定量 (Kurtmacker, 1938, p.128).

同一の試料について2つの測定を行なう。HCHO (35%, 0.5ml) を添加し、 SO_3^{2-} をブロック (2 (式7) 行なう) 値を $S_2O_3^{2-}$ による (式5) とし、HCHO 非存在下と存在下の値の差を SO_3^{2-} による (式8) とした。



2) 硫化物法による $S_3O_6^{2-}$ の定量.

Kurtmacker (1938, p.155) の方法を一部

改良し、 μmole の桁で定量できるよりにした (右表)。

試料溶液 ($S_3O_6^{2-}$ 1~10 μmoles を含む) 1ml に 0.1M Na_2S 0.2ml を

加之。0.2N $NaOH$ を1滴滴下後、煮沸水

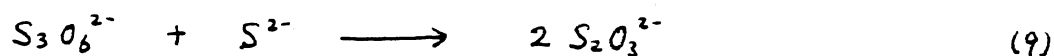
浴上で10分間加熱 (反応式9)。冷却後、

強く攪拌しながら 1% $CdCO_3$ けん濁液 1ml

を加之。過剰の S^{2-} を沈んでさせ (式10)。遠心除去する。上清につき、ヨ

ード滴定 (前述) で $S_2O_3^{2-}$ を定量し、空試験の値を差引き、式9より $S_3O_6^{2-}$

量を求めた



3) チオシアニド法 (シアノリシス法) による $S_2O_3^{2-}$, $S_3O_6^{2-}$, $S_nO_6^{2-}$ の定量 (

Kobayashi et al., 1972) $S_2O_3^{2-}$, $S_3O_6^{2-}$, $S_nO_6^{2-}$ はそれぞれ KCN と反

応して SCN^- を生成する (式11~14)。この反応で生じる SCN^- は酸性で Fe^{3+}

により呈色させ、比色することにより $S_2O_3^{2-}$, $S_3O_6^{2-}$, $S_nO_6^{2-}$ を定量する方法か

(その他 Sörbo, 1957, Urban 1961, Nietzel & Desera 1955)

あしが、この反応性が少し

チオシアン法による $S_2O_3^{2-}$, $S_3O_6^{2-}$ の定量

かつ異なることを利用して、

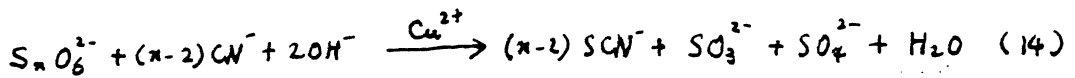
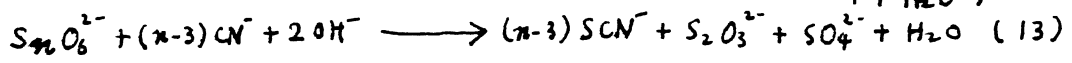
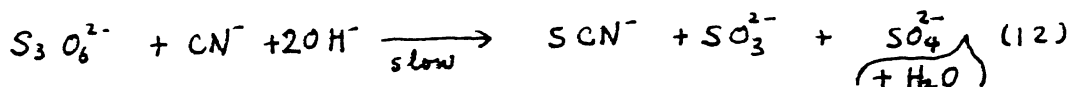
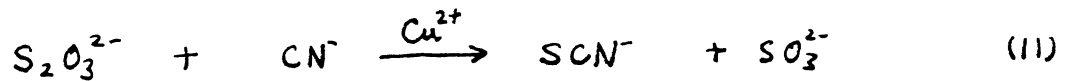
これらの方法を、共存する

それそれのイオンを定量す

るより改良し、又、微量

化した用いた。

標準試料添加量 (μmoles)		測定値 μmoles		
$Na_2S_2O_3$	$Na_2S_3O_6$	$S_2O_3^{2-}$	$S_3O_6^{2-}$	$S_4O_6^{2-}$
2.5	—	2.53	0.00	0.00
—	2.5	0.16	2.44	0.00
2.5	2.5	2.60	2.27	0.08



SO_3^{2-} 還元反応をおこなった後の酵素反応液 1.0 ml より、1.0 ml 蒸留水を合して 4本の試験管に 0.2 ml ずつを分注する。それ以外の試験管に、0.5 ml 0.1 M KCN, 0.3 ml 0.1 M $CuCl_2$ と 10% $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ - 20% HNO_3 溶液 0.5 ml を加え、A) CN^- , Cu^{2+} , Fe^{3+} , B) CN^- , Fe^{3+} , Cu^{2+} , C) CN^- 添加、室温 40 時間放置後 Cu^{2+} , Fe^{3+} , D) Fe^{3+} , Cu^{2+} , CN^- 。変性蛋白を遠心除去し、酵素アッセイを紅照として 460 nm の $Fe(SCN)_3$ の吸光度を測定する。試験管 A, B, C の値と A460 から試験管 D の値を差引いた (試料アッセイ) ものを a, b, c としたとき、 $S_2O_3^{2-}$, $S_3O_6^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$ の量 (試料 1.0 ml あたり, μmoles) を次式で求めた。

$$S_2O_3^{2-} = (a - 2b) \times f \times 1.0 / 0.2$$

$$S_3O_6^{2-} = (c - a) \times f \times 1.0 / 0.2$$

$$S_4O_6^{2-} = b \times f \times 1.0 / 0.2$$

ここで、係数 f は標準溶液 $NaSCN$ を用いて得た値 $0.985 \mu\text{moles}/A_{460 \cdot cm}$ を用いた。この方法で、 $S_2O_3^{2-}$, $S_3O_6^{2-}$ の標準試料は単独のよきと表 (表) の測定値と添加量

が、 $S_2O_3^{2-}$ が共存すると $S_3O_6^{2-}$ 量がわすかぬおそれがある。

4) p-ロザニリン法による SO_3^{2-} の定量。試料 0.1 ml を 0.9 ml の 0.1 M

Na_2HgCl_4 に加え、 SO_3^{2-} を固定し^{*}。この溶液の 1 部をとり、West & Gaeker (1956) の方法で比色定量した。^{*} $[HgCl_4]^{2-} + 2 SO_3^{2-} + 4 H^+ \rightarrow [Hg(SO_3)_2]^{2-} + 4 HCl$

5) H_2S の定量。Warburg のように副室のアルカリに吸収させた H_2S を、

St. Laurent (1929) の方法でメチレンブルーで比色定量した。普通の場合には、

Warburg のように副室の反応液 (pH 6.0 ~ 6.2) から H_2S を追い出し、副室のアルカリに吸収させるために、主室に酸を添加することはしない。

$[^{35}S]$ - H_2S の放射能測定は、上記のように比色定量したメチレンブルーを、小山の方法 (1955) により活性炭に吸着させて行った。

その他の分析法 disc 電気泳動は Davrio (1964) の方法で、7.5% ポ

リアクリルアミド^{ゲル}を用い、pH 9.4 で行った。SDS-ポリアクリルアミド

ゲル電気泳動法は Weber & Osborn (1969) の方法によった。

蛋白質の定量は血清プロテインを標準として、Lowry et al. (1951) の方法を用いた。クロマトグラフによる溶出曲線は 280 m μ あるいは 300 m μ の吸光度を求めた。

塩素イオンは Mohr 法で^{定量し}た。塩酸リニ酸濃度は中村 (1950) の Allen の変法で比色定量した。

実験結果

第1章 亜硫酸還元酵素系の分割と、中間生成物トリチオン酸、

チオ硫酸の同定 (小林ら 1968 a. b. Kobayashi et al. 1969)

粗抽出液を、ヒドロキシルアパタイトにより分画したところ、亜硫酸還元酵素系が2つの画分にわかれた。分画した酵素を用いて、 SO_3^{2-} 還元の中同生成物を同定した。

1-1 ヒドロキシルアパタイトによる亜硫酸還元酵素系の分割

D. vulgaris 抽出液より「実験方法」に示すように、ヒドロキシルアパタイト柱により、その素通り画分(画分A)と、吸着した0.2Mリン酸緩衝液で洗出した画分(画分B)を得た。両画分の SO_3^{2-} 還元活性を、ヒドロゲナーゼと中間電子伝達体メチルウイオロゲンとを共役させ、 H_2 吸収法で調べた。反応の時間的経過を図1-1に示す。画分Aはほとんど活性がないうのに対し、画分Bは活性をもつ。しかし、画分Bによる還元反応は、加之に SO_3^{2-} とほぼ等モルの H_2 吸収が減速し、以後、ゆるやかな H_2 吸収が続く。第1段階の終りで、反応液中に SO_3^{2-} はヨード滴定で検出されないうが、 H_2S の生成量(

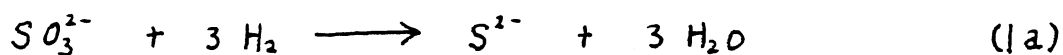


表1.1)では減少した

SO_3^{2-} 量を説明できない。

画分Bに画分A

を添加した場合、あ

るいは粗抽出液では、

加之に SO_3^{2-} のほぼ3

倍の H_2 吸収がおこり

表1.1 粗抽出液とヒドロキシルアパタイト画分Bによる SO_3^{2-} 還元の化学当量。標準の H_2 吸収測定法により SO_3^{2-} 還元を行ない、 H_2 吸収停止あるいは減速後、 H_2S を定量した。

酵素画分	添加 SO_3^{2-} (μ moles)	H_2 吸収	H_2S 生成
粗抽出液	5	13.3	4.1
画分B	4	3.1	1.0
画分B	8	6.4	2.0

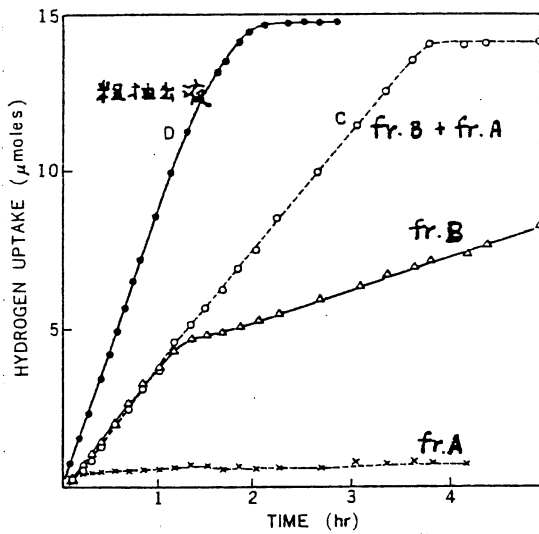


図 1.1 ヒドロキシルアパタイト画分¹による SO_3^{2-} 還元~~反応~~性。 H_2 -ヒドロゲナーゼ系と類似した H_2 吸収法で測定した。基質: NaHSO_3 5 μmoles 。

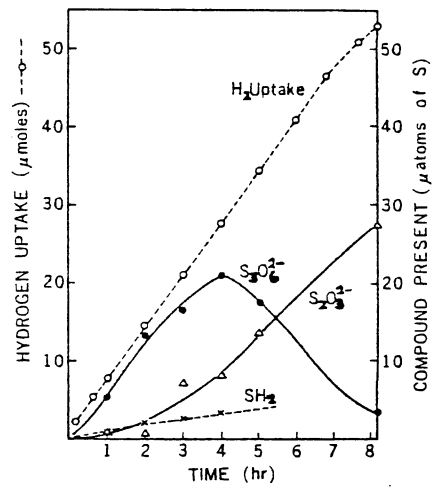


図 1.3. ヒドロキシルアパタイト画分 B による SO_3^{2-} 還元で生じる $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, H_2S の生成の時間経過。基質: NaHSO_3 40 μmoles 。各時間、検圧計から容器をはずし、 $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ を砒化物法、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ をヨード滴定、 H_2S を Se-Corant 法で定量した。

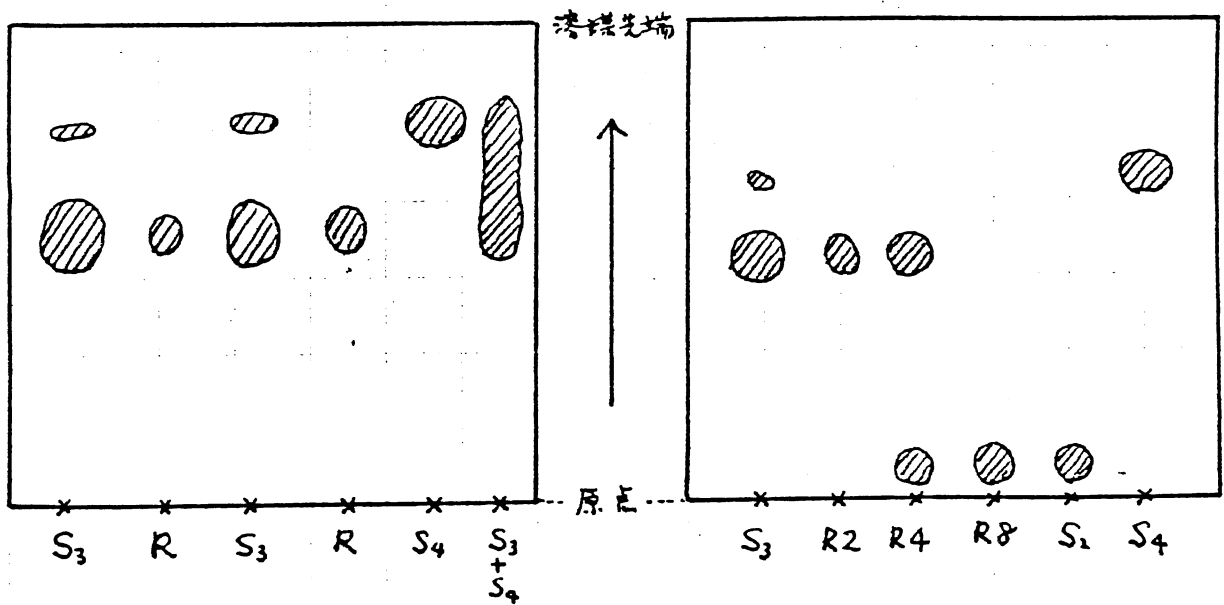


図 1.2 ヒドロキシルアパタイト画分 B による SO_3^{2-} 還元生成物の同定。

左) コーケル 10B の薄層クロマトグラフィ。展開溶媒: アセトニイプロパノール-水 (87:10:3, v/v), 右) 東洋濾紙 No. 51A を用いた薄層クロマトグラフィ。展開溶媒: アセトニ-水 (3:1, v/v) 検出: 0.5M AgNO_3 -80% エタノール溶液。

S_3 : $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$, S_4 : $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, S_2 : $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, R: 画分 B による SO_3^{2-} 還元反応液。

R2, R4, R8: 図 1.3 の反応液。それぞれ反応時間 2, 4, 8 時間のもの。

(図1.1)式(2)によ
く合う反応がおこる。

画分BによるH₂吸収
速度が減じた後、あ
らためて基質を添加する
と、最初と同じ速度で
H₂吸収がおこることよ
り、画分Bによる還元
反応の減速は、酵素の
失活によるものではない
ことも示された。

以上より、粗抽出液
に含まれる、式(1)の反
応に必要な酵素が2つ

に分けられ、画分Bに含まれる酵素によりSO₃²⁻は中間体により還元され、こ
れが画分Aに含まれる酵素によりH₂Sまで還元されると考えられる。

1-2 亜硫酸還元の中間生成物の同定と定量

画分BによるSO₃²⁻還元生成物同定のため、添加SO₃²⁻とほぼ等モルのH₂吸
収の吸収速度が減じた時点の反応をやめ、この反応液につき定性反応を行な
った(表1.2)。SO₃²⁻還元反応液はAgNO₃添加で褐色沈殿、H₂Cl₂添
加で白色沈殿を生じ、KCNと煮沸後、酸性でFe³⁺添加によりFe(SCN)₃の赤
色を呈する。これらのことは、反応液中にS₂O₃²⁻あるいはポリチオ酸S_nO₆²⁻
が生じていることを示すものがある(Kurtanacker, 1938)。

生成物(S₂O₃²⁻あるいはS_nO₆²⁻)を同定するため、薄層および濾紙クロ

表1.2 ヒドロキシルパタイト画分BによるSO₃²⁻還元生成物の呈色反応。試料(標準試料は5mM溶液)1滴に試薬1滴を加えた。

試料	0.1N AgNO ₃	飽和H ₂ Cl ₂	KCN*
Na ₂ SO ₄	変化なし	変化なし	黄色
Na ₂ SO ₃	白色沈殿	変化なし	緑色
Na ₂ S ₂ O ₄	黄褐色沈殿	淡褐色沈殿	黄緑色
Na ₂ S ₂ O ₃	黒褐色沈殿	青白色沈殿	血赤色
Na ₂ S ₃ O ₆	褐色沈殿	青白色沈殿	血赤色
Na ₂ S ₄ O ₆	黒褐色沈殿	青白色沈殿	血赤色
Na ₂ S	黒色沈殿	黒色沈殿	青色沈殿
SO ₃ ²⁻ 還元反応液	褐色沈殿	青白色沈殿	血赤色
" (酵素なし)	黄色	わずかに白沈	緑色

* 0.1M KCN, 2N NaOH 滴下。5分間煮沸後、2NHCl
10% FeCl₃ を滴下した。

マトグラフを行なった(図1.2)。画分Bによる SO_3^{2-} 還元で蓄積する $AgNO_3$ で褐色のスポットとその他の物質は、薄層、硫酸のマトグラフにて $S_3O_6^{2-}$ とRf値が一致し、 $S_4O_6^{2-}$ 、 $S_2O_3^{2-}$ とは異なつた。反応時間が長い場合には $S_2O_3^{2-}$ も検出された(図1.2右)。したがって、 SO_3^{2-} 還元の中間生成物(画分Bによる生成物)は $S_3O_6^{2-}$ (と $S_2O_3^{2-}$)であることがわかった。

次に、各反応生成物を、時間を追って定量した。 $S_3O_6^{2-}$ および $S_2O_3^{2-}$ はKurtzack(1938)の硫化物法およびユ-ト滴定で求めた。 H_2S は、ワ-ルプルス法による副室中のアルカリに吸収させられたものをSt.Lorant(1929)の方法で定量した。

図1.3に示すように、40 μ moles (標準反応液の基質濃度の8倍)の SO_3^{2-} 添加により、 H_2 吸収と $S_3O_6^{2-}$ の生成がみられ、4時間目には加之な SO_3^{2-} のS原子の約半分が $S_3O_6^{2-}$ となつてゐる。その後、 $S_3O_6^{2-}$ 量は入り、 $S_2O_3^{2-}$ が増大した。このことから、 $S_3O_6^{2-}$ の生成は、この酵素標局への副次的なものでないことが示された。 $S_2O_3^{2-}$ の生成は、 $S_3O_6^{2-}$ の減少にともなふこと。図1-1の実験でも、 H_2 吸収減速後、やはり十分な H_2 吸収が続くことから、いづれも生じた $S_3O_6^{2-}$ が混在する酵素によつて、 $S_2O_3^{2-}$ に還元されるものがある。

1-3 亜硫酸還元経路と酵素系の推定

ヒドロキシルアパタイ
ト画分Bは、 SO_3^{2-} を還元して $S_3O_6^{2-}$ 、 $S_2O_3^{2-}$ を蓄積することが見られたので、
両画分の SO_3^{2-} 、 $S_3O_6^{2-}$ 、 $S_2O_3^{2-}$ 還元活性を、 H_2 -ヒドロ

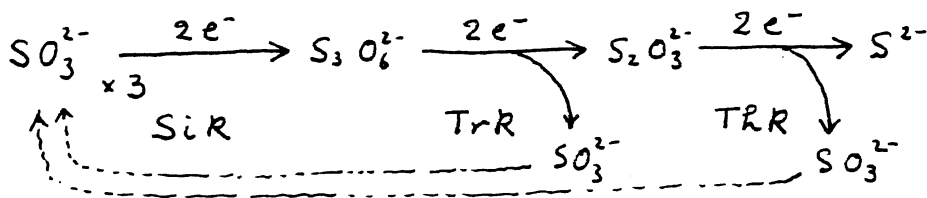
表1.3. 画分AおよびBの SO_3^{2-} 、 $S_3O_6^{2-}$ 、 $S_2O_3^{2-}$ 還元活性。 H_2 吸収法による。pH 6.6.

基質	画 分			(a)+(b)
	A (a)	B (b)	A + B	
	(μ moles / $\frac{min}{hr}$)			
SO_3^{2-}	0.6	3.2	8.5	3.8
$S_3O_6^{2-}$	3.1	2.1	8.5	5.2
$S_2O_3^{2-}$	3.2	3.3	8.3	6.5

ゲナーゼ系と共役させ、 H_2 吸収法で測定した(表 1.3)。 SO_3^{2-} 還元活性は画分 A に少なく画分 B に多いが、 $S_3O_6^{2-}$ 還元活性と $S_2O_3^{2-}$ 還元活性は画分 A にも画分 B にも含まれていた。画分 B では $S_3O_6^{2-}$ 還元活性がやや少ないので、特に ~~##~~ も、 α 酸性側で反応をおこなわせると(第 3 章, 図 3.1 参照), $S_3O_6^{2-}$ の還元が律速になり、 $S_3O_6^{2-}$ が蓄積するであろう。

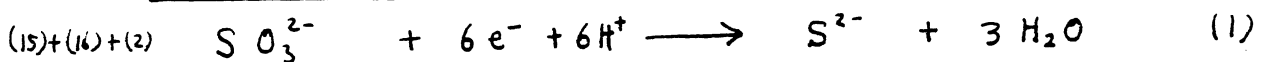
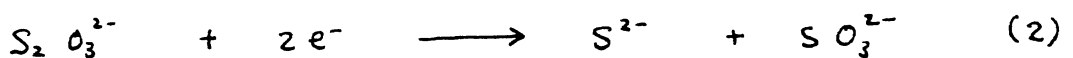
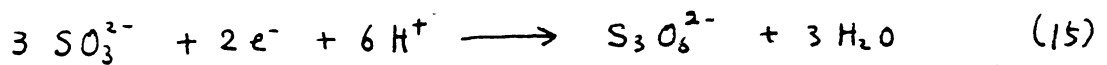
また、表 1.3 で示されるように、両画分を混ぜると、見かけの活性は、それぞれの画分の ^(活性の) 和 (a) + (b) より大きくなる。これは SO_3^{2-} 還元活性にだけ注目して。これは、還元生成物が、他の還元酵素の存在で更に還元され、 H_2 吸収が増大するためであろう。

以上の実験結果より、硫酸還元菌の SO_3^{2-} 還元酵素系に 3 つの還元酵素——亜硫酸還元酵素、トリチオン酸還元酵素、チオ硫酸還元酵素(それぞれを、以下 SiR , TrR , ThR と略すことがある)——を仮定し、次のような経路で SO_3^{2-} の還元がおこると考えられた。



仮説 1

SiR , TrR , ThR は、それぞれ次の反応を触媒する。



才 2 章 亜硫酸還元酵素の精製とその性質 (小林S, 1969b, 1970b, 1971, Kobayashi & Sakimoto 1972, Kobayashi et al 1972, 小林S他 1972)

前章の仮定に於て、 SO_3^{2-} 還元反応を行う酵素 SIR を精製し、あわせて desulfovireidin との異同など諸性質を調べた。

2-1. 亜硫酸還元酵素の精製

“実験方法”に示すように粗抽出液から、超遠心分離、硫酸画分、DEAE-セルロースとヒドロキシルパタイトのグラマトグラーフィー、デフォレンジン電気泳動により、亜硫酸還元酵素を精製した。

ヒドロキシルパタイト画分は超遠心的には均一である(図2.1)。しかし、disc電気泳動では、主帯の他に、わずかに泳動度の小さい、やはり緑色をした帯がわずかに含まれることがある。ヒドロキシルパタイト、グラマトグラーフィーの0.3Mリソ酸緩衝液流出画分は、副帯の含量が0.16M流出画分より多い。最終標品(デフォレンジン電気泳動画分)は、disc電気泳動で、わずかに尾をひくが単一の帯を示し、これは、蛋白を染色したとき見られる緑色の帯と一致した(図2.2)。精製のまとめを、表2.1に示す。活性は見かけ上、数倍にしか精製されず、収率も1%程度である。粗酵素画分では、

表2.1. 亜硫酸還元酵素精製のまとめ

画 分	全蛋白量 (mg)	活性 (単位)(A)	比活性 (単位/mg)	収率 (%)	desulfo- viridin (単位)(B)	$\frac{(A)}{(B)}$
粗抽出液	11200	466	0.04	100	133	3.5
flavodoxin除去抽出液	7300	445	0.06	95	112	4.0
硫酸画分	1230	53.2	0.04	11.4	60	0.89
DEAE-セルロース画分	228	10.3	0.05	2.2	29	0.36
ヒドロキシルパタイト画分	73	7.4	0.10	1.6	24	0.31
デフォレンジン電気泳動画分	17	3.1	0.18	0.7		

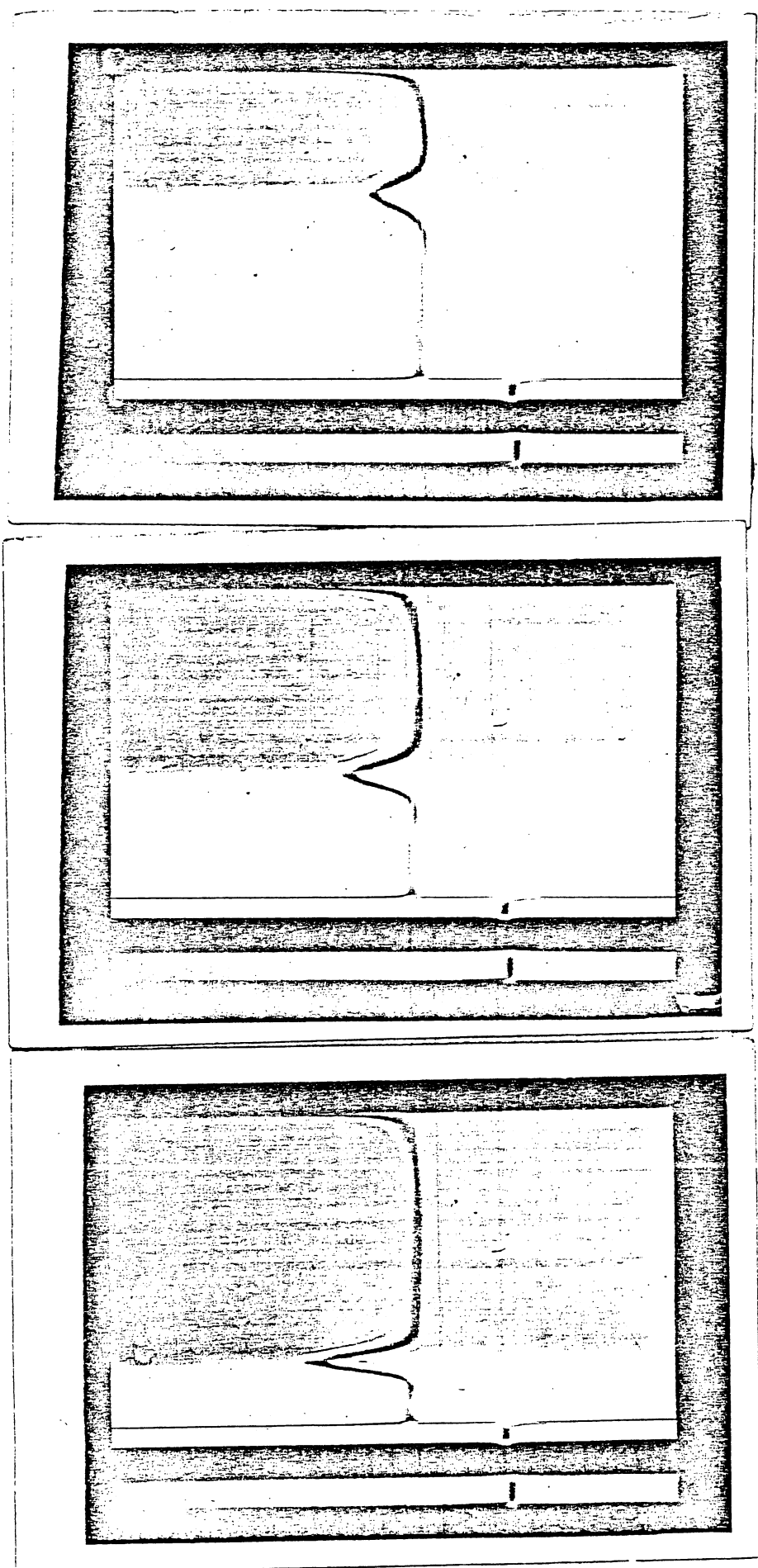
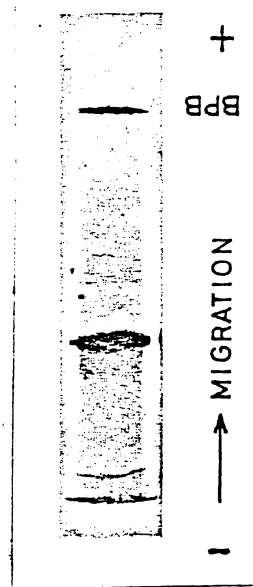


图 2.1 (上). 精製亞木版還之解毒素 (ヒト口中ニルPハ-5イ
 画分) の超遠心分析. 日立 UCA-1A (D-9-RA60H) に
 よる. 牙直径 54300 rpm. 12 邊 (2 から 18, 36, 54 分目).
 蛋白濃度: 2.6 mg/ml 0.04 M リン酸緩衝液 pH 6.0.

图 2.2 (右) 精製解毒素の dialyze 電泳泳動像. Y- γ -電泳泳動
 画分 (10 μ g 蛋白) に 7.5% ボリP140P210 中泳動後 pH 6.0.



他の還元酵素の共存により SiR の生成物の還元がおこり、 H_2 吸収するが、
みかけ上 SO_3^{2-} 還元反応 (H_2 吸収速度) が大きくあらわされる (表 13)。注
性の収率の低いことと、比活性の上昇の低いことは、生成物の活性が大きく
あらわされていふためであろう。

後に述べるように、亜硫酸還元酵素は desulfovividin と同一のものである
ことがわかった。desulfovividin は約 50 倍^に精製された。

2-2. 亜硫酸還元酵素と desulfovividin の同一性

亜硫酸還元酵素精製の過程で、SiR 活性をもつ分画はすべて緑色をしるが
り、緑色分画はすべて活性をもつといふ。DEAE-セルロース 2 次イオン交換
イオン交換 (図 2.3) と Sephadex G-200 ゲル濾過 (図 2.4) により
SiR 活性と $630 m\mu$ の吸収度とが同一のピークとなって誘出された。精製が
進むと、活性 (A) と desulfovividin (B) の量比がほぼ一定になり (表 2.1)。

精製 SiR は $630 m\mu$ に吸収極大をもつ desulfovividin に特徴的な吸収曲線
をもつ (図 2.5) (後述)。又、 $0.1 N NaOH$ 中では $366 m\mu$ の紫外線照射で
赤色蛍光を発する (後述) が、これも desulfovividin に特徴的な性質である
(Postgate, 1959)。精製 SiR の disc 電気泳動では、その緑色帯と蛋白 (ア
ミド黒染色) の帯は一致した。

以上から、亜硫酸還元酵素が desulfovividin と同一のものであることが
示された。

2-3. アミノ酸組成, 分子量, subunit 構造

精製酵素標品につき、アミノ酸組成を求めた (表 2.2)。アミノ酸組成よ
り Mc Meekin et al. (1949) の方法²⁾ 蛋白部分の偏比重を求めると 0.733 であ
った。精製酵素の沉降速度と蛋白濃度 $2.6 mg/ml$ と $1.3 mg/ml$ で求めた

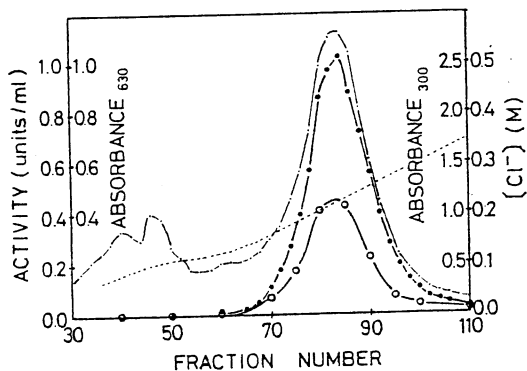


図 2.3 亜硫酸還元酵素の DEAE-セルロースクロマトグラフィー。硫酸塩分を吸着させ、NaCl の 0.05 - 0.3 M の濃度勾配で流出した。DEAE-セルロース柱 (3 x 50 cm), 10 ml/分画。
 -○-: SiR 活性, -●- A_{630 nm}, - - - A_{300 nm}, Cl⁻ 濃度。

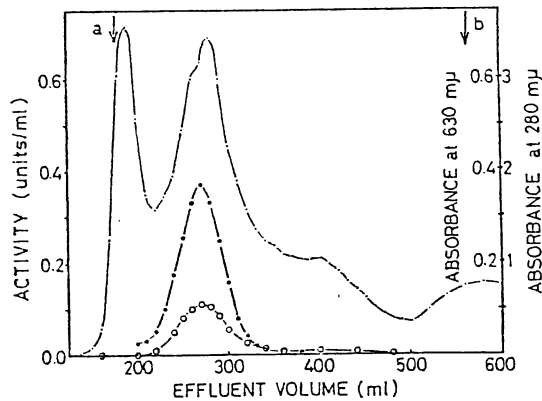


図 2.4 亜硫酸還元酵素の Sephadex G-200 ゲル濾過。ゲル柱: 3 x 81 cm。粗酵素液を硫酸塩分 30% 飽和か 570% 飽和の沈下土を以て透析したものを展開した。0.05 M Tris 緩衝液。-○- SiR 活性, -●- A_{630 nm}, - - - A_{280 nm}

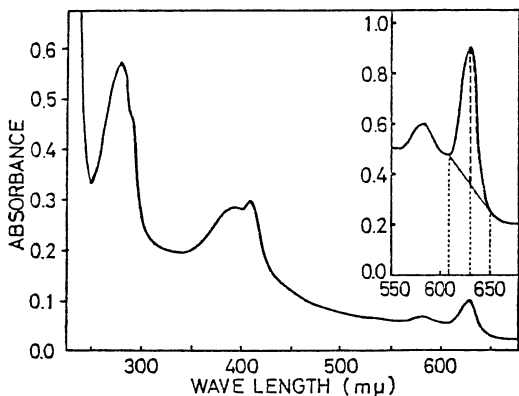


図 2.5 亜硫酸還元酵素の吸収スペクトル。3.4 mg 蛋白/ml を 1 mm キヤットで測定した。挿入図は 10 mm キヤットで測定した。

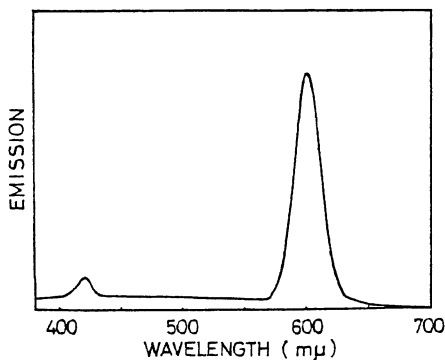


図 2.9 亜硫酸還元酵素の 0.1 N NaOH 中の蛍光。365 mμ で励起した。
 スペクトル

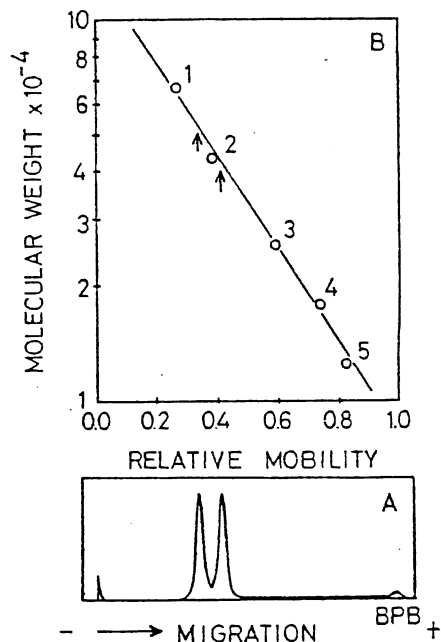


図 2.7 亜硫酸還元酵素 subunit の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動による分子量測定。Weber & Osborn (1969) の方法で酵素を 1% SDS-1%メルカプトエタール処理後電気泳動した。A) コマシー青染色後濃度計で記録した。B) 分子量標準蛋白による標準曲線。矢印が酵素 subunit。標準蛋白は 1) 血清アルブミン, 2) 卵アルブミン, 3) キモトリフィンゲル, 4) ミチロシン, 5) チトクロム c

表 2.2 亞硫酸還元酵素のPミノ酸組成. 精製酵素(凍結乾燥標品)を Moore & Stein (1963) の方法で 6N HCl, 110°C, 18~96時間加水分解後, 日立自動Pミノ酸分析機 KLA-3B (2) より分析した。面筋素は, 6N HCl に短時間では溶解しないので 18時間加水分解後, 分注してそれ以後の水解を行なった。ノルロインを internal standard とした。

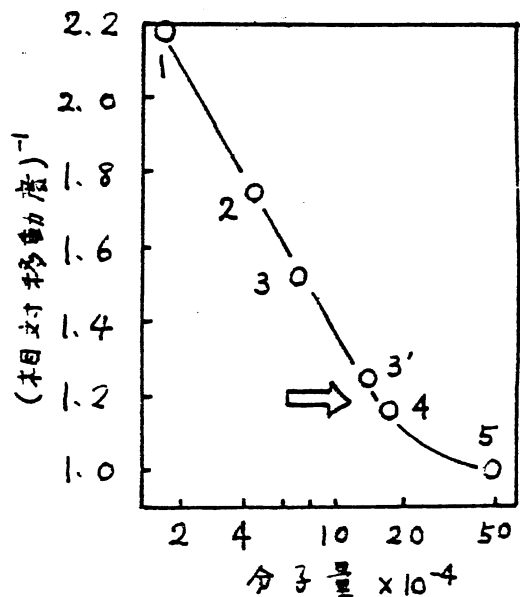
RESIDUE	HYDROLYSIS TIME (hr)					COMPOSITION	
	18	24	48	72	96	AVERAGE	(moles/10 ⁵ g protein)
(u moles / mg protein)							
Asp	0.666	0.674	0.679	0.628	0.686	0.667	66.7
Thr	0.303	0.301	0.289	0.262	0.273	0.310 ^{a)}	31.0
Ser	0.368	0.374	0.344	0.293	0.291	0.400 ^{a)}	40.0
Glu	0.725	0.761	0.767	0.701	0.764	0.744	74.4
Pro	0.395	0.415	0.413	0.382	0.296	0.380	38.0
Gly	0.600	0.572	0.556	0.546	0.575	0.570	57.0
Ala	0.520	0.466	0.464	0.491	0.469	0.482	48.2
Cys/2	0.165	0.174	0.14	0.122	0.137	0.172 ^{b)}	17.2
Val	0.408	0.422	0.425	0.469	0.445	0.469 ^{c)}	46.9
Met	0.143	0.153	0.161	0.158	0.149	0.153	15.3
Ile	0.350	0.368	0.393	0.394	0.394	0.394 ^{c)}	39.4
Leu	0.465	0.474	0.472	0.465	0.472	0.470	47.0
Tyr	0.236	0.219	0.238	0.235	0.231	0.232	23.2
Phe	0.312	0.318	0.316	0.308	0.311	0.313	31.3
Lys	0.464	0.427	0.458	0.418	0.427	0.439	43.9
His	0.184	0.194	0.192	0.177	0.207	0.191	19.1
Arg	0.362	0.318	0.332	0.333	0.310	0.331	33.1
Trp						0.16-0.35 ^{d)}	16-35
TOTAL							687-706

a) 水解時間を0時間外挿して求めた
 b) 過キeton酸化. 18時間水解後, システイン残基として求めた (Moore, 1963)
 c) 最大値を用いた
 d) Bencze, & Schmid, (1957, Anal. Chem. 29, 1193) により UV吸収から求めた。
 W.L) K)

偏比重 \bar{V} は 0.733 ml/g , 溶媒と水の粘度の比は 1.018 , 密度は 1.0037 g/ml とし得られたそれぞれの $S_{20,w}$ 10.58 , 10.59 ($\times 10^{-13} \text{ cm}^2/\text{sec} \cdot \text{dyn/g}$) から、沈降定数 $S_{20,w}^0 = 10.6 \text{ S}$ を得た。更に、同じ超遠心分析の沈降^面界_A像より、式 $(A/H)^2 = 4\pi D t$ の関係から拡散定数 D を求めると、蛋白濃度 2.6 mg/ml と 1.3 mg/ml でそれぞれ 3.7×10^{-7} , $4.7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ であった。 $D_{20,w}^0$ は $5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$, \bar{V} は 0.733 ml/g と仮定すると、式 $M = RTS / (1 - \bar{V} \rho) D$ より 分子量は約 20 万となる。一方、Sephadex G-200 の薄層ゲル透過 (Morris, 1964) により、標準蛋白質との比較から求めた分子量は約 14 万である (図 2.6)。二つの方法で求められた分子量はく「ちが」^{ちが}「い」^い「子」^子「が」^が「二」^二「い」^い「子」^子「が」^が、これは、拡散定数の求め方の精度の問題、あるいは補欠分子種の性質^{など}から、^{分子量の}分子量の計算で仮定した値が正しく^{なり}ない^た、Sephadex の吸着その他の影響がある^たため^もと見られる。

Weber & Osborn (1969) の方法で、酵素を 1% SDS-1% キルカポトエタール処理し、ポリアクリルアミドゲル内の電気泳動を行なうと、2本のポリペプチド帯が検出され (図 2.7 A, p. 24)。それぞれの分子量は約 4.3 万、5.4 万である (同図 B)。2本の帯の濃さはほぼ 1:1 なので、S & R は、分子量がそれぞれ約 4.3 万と 5.4 万の 2 種類のポリペプチドの同数個 (酵素の分子量が約 10 万であればそれぞれ 1 コずつ、約 20 万であれば 2 コずつ) より成っていると思われる。

図 2.6 Sephadex G-200 薄層ゲル透過による分子量の測定。溶媒は 0.1 M KCl - 0.04 M Tris 緩衝液。アポフェリチンに対する相対移動度の逆数を分子量の対数に対してプロットした (Morris, 1964)。矢印は亜硫酸還元酵素。標準蛋白は 1. マウコウグリンミオグロビン, 2. 卵アルブミン, 3. 牛血清アルブミン, 3'. 血清アルブミンニ量体, 4. γ -グロブリン, 5. アポフェリチン



2-4 亜硫酸還元酵素
その発色団について

精製酵素の吸収スペクトルは図2.5のようであり、630, 585, 410, 390, 280 m μ に吸収極大をもつ。630, 410, 280 m μ の吸収度之比はほぼ1:3:6で、最も精製されたもの9 A630/A280は0.18にまでなる。可視部の吸収スペクトルはPostgate (1956), Jahimoto et al. (1954b, 1957a)と、まったく
同じである。 報告している緑色色素蛋白 desulfovinidinのそれ
スペクトルはNa₂S₂O₄の添加による顕著な変化は見られない。

0.1N NaOH中では吸光度が減少し、極大波長もずれる。(極大: 585, 555, 390, 377 m μ)
(図2.8)。このとき366 m μ の紫外線照射で赤色の蛍光を発し、蛍光の発色
スペクトルは図2.9のよう^(p.24)に、600 m μ に極大をもつ。励起スペクトルは390,
370, 360 m μ 付近に極大、又は肩をもつが、経時変化がはげしい。0.1N HCl
1% SDS- (1% x10カプトエタノール, 4M グアニジン-HCl, 9M 尿素) 中では、紫
外線照射で蛍光が見られる。色調は少しずつ異なる。

スペクトルは、酸、アルカリを中和してもほとんど変わらない。HCl処理
で蛋白は変性し、残った赤色の蛍光物質は上清にあり、HCl処理ありはSDS
処理後ゲル濾過すると、蛍光物質は低分子量画分に産生されることがある。
これらの処理で発色団は蛋白からはずれていふと思われる。

0.05M EDTA では スペクトル変化や蛍光は見られなかった。

0.1N NaOH中の蛍光は、光に不安定で、暗室中放置で2~3時間、暗室中
放置では2日くらいで消失する。1N HCl中では明室でも暗室中でも、蛍
光は5日後でもあやむかいで、安定である。SDS, グアニジン処理液中の蛍
光はNaOH中より不安定で、HCl中より不安定である。

4M グアニジン-0.8M x10カプトエタノール処理、5時間、^(および) 0.2N HCl
処理 5分後中和したものを透析後、SKR法による処理の
ものが30%、15%であった。先述の、発色団の除去によるものが、蛋白の変
性によるかは明らかでない。

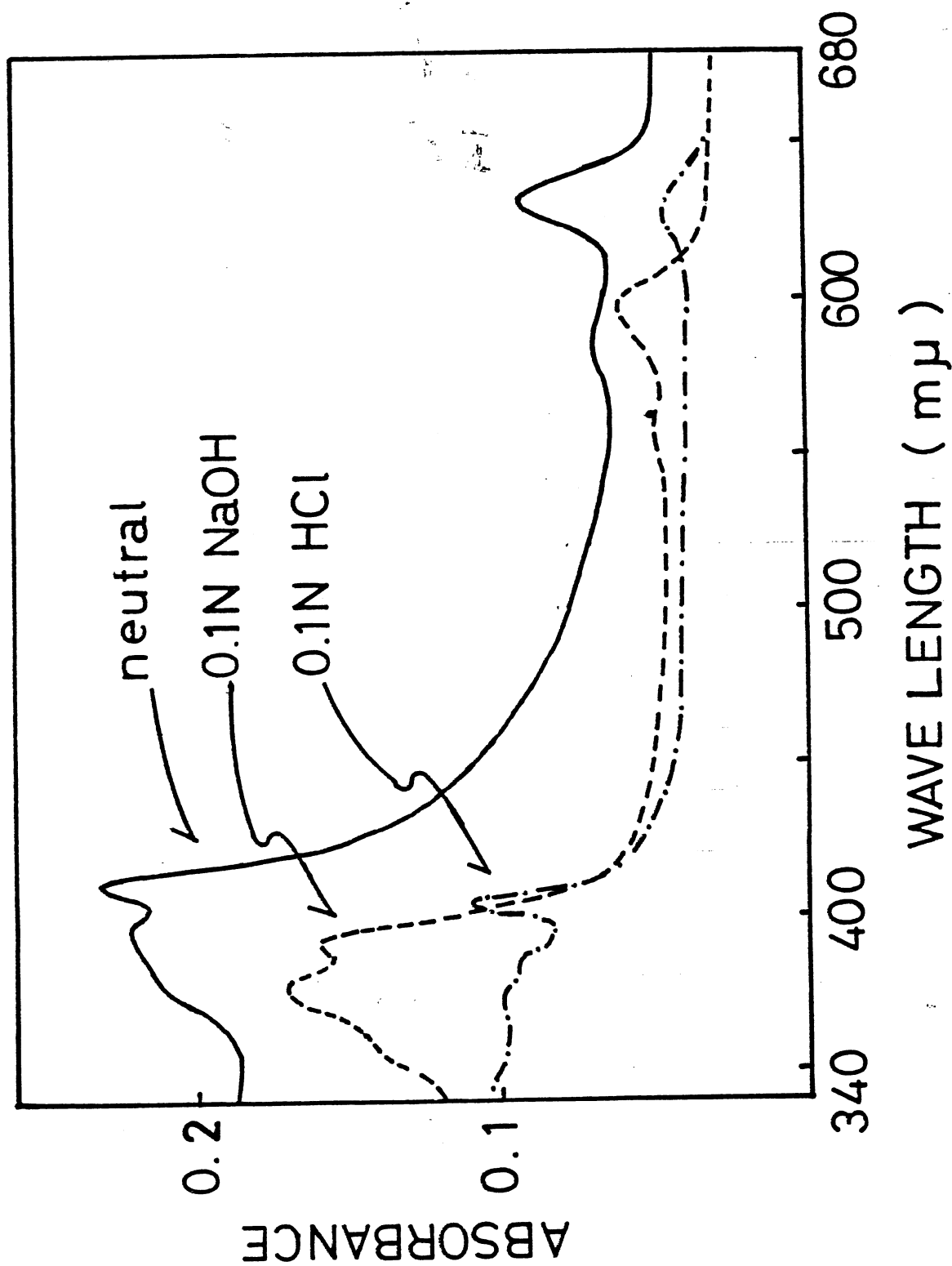


図 2.8 アルカリ、酸による亜硫酸還元酵素のスペクトル変化。

第3章 亜硫酸還元酵素の反応様式について (小林 1969b, 1970b, 1971, Kobayashi & Ishimoto 1972, Kobayashi et al 1972, 小林 1972)

精製酵素を用いて SO_3^{2-} の還元反応を行ない、生成物を定量したところ、精製酵素によっても複数の生成物が検出されたので、種々の条件下での反応生成物を分析し、反応様式の検討を行なった。

3-1 還元反応の pH 依存性

SO_3^{2-} 還元活性の pH 依存性を H_2 吸収法で調べた (図 3.1)。 SO_3^{2-} 還元の至適 pH は 5.5 ないし 6.0 である。以下の実験では pH 6.0 で反応を行なった。

粗酵素液による $S_2O_3^{2-}$, $S_3O_6^{2-}$ の還元のパH依存性も図 3.1 に示す。これらの至適 pH はアルカリ側にある。

3-2 亜硫酸還元酵素の基質特異性

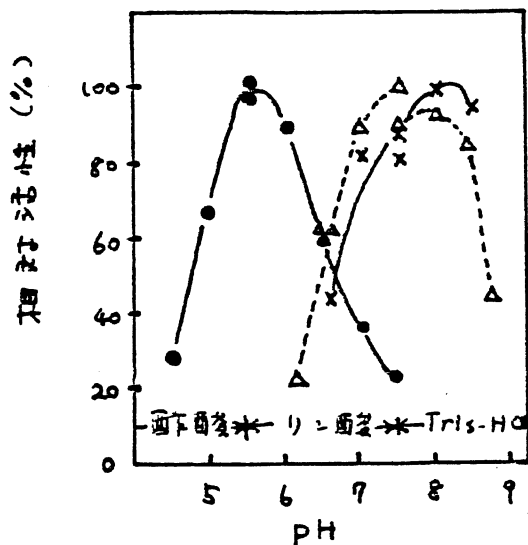


図 3.1. 還元反応の pH 依存性。
 H_2 吸収測定法による。
 基質は —●— $NaHSO_3$, ---△---
 $Na_2S_2O_3$, —×— $Na_2S_3O_6$ 。
 緩衝液は図中の3種類を用いた。

表 3.1. 精製亜硫酸還元酵素の基質特異性と、 SO_3^{2-} 還元反応への $S_3O_6^{2-}$, $S_2O_3^{2-}$ の影響。
 H_2 吸収法による。
 酵素は EFD キーシム P10 タイプ画合使用。
 基質: $NaHSO_3$ 5 mM, $Na_2S_2O_3$ 2.5 mM, $Na_2S_3O_6$ 1.67 mM

基 質	水素吸収速度 ($\mu\text{moles/min}$)
$NaHSO_3$	0.034
$Na_2S_3O_6$	0.000
$Na_2S_2O_3$	0.000
$NaHSO_3 + Na_2S_3O_6$	0.034
$NaHSO_3 + Na_2S_2O_3$	0.034
$NaHS_3O_6 + Na_2S_2O_3$	0.000

精製した亜硫酸還元酵素は、 H_2 吸収測定法の基質 SO_3^{2-} のかわりに $S_3O_6^{2-}$ あるいは $S_2O_3^{2-}$ を添加しても H_2 吸収をみせない。(表3.1)。したがって本酵素は SO_3^{2-} に特異的である。酵素標品によつては、 SO_3^{2-} 還元活性に比べ $1/20$ 程度の $S_3O_6^{2-}$ 還元活性をもつていられる。ヒヤオン酵素還元酵素が混在しているためである。また SO_3^{2-} 還元の際、 $S_3O_6^{2-}$ あるいは $S_2O_3^{2-}$ を共存させても SO_3^{2-} 還元の H_2 吸収速度には影響をみせない。(表3.1)。

3-3. 反応の時間経過と、反応生成物の分析

標準の反応条件で、 SO_3^{2-} 還元にもなる H_2 吸収の時間経過は図3.2のようである。 $NaHSO_3$ 5 μ mole の添加で、3 μ mole 程度の H_2 吸収がおこり、 H_2 吸収はそれで停止した。他の還元活性の混在がない限り、図1.1のBのようにならなかつた H_2 吸収が続くことはない。

第1章の仮定のように、 SO_3^{2-} の還元が式152に従って $S_3O_6^{2-}$ のみを生成する場合、添加 SO_3^{2-} あたりの H_2 吸収量は $1/3$ mole/mole になる。又、式172, 122により、 SO_3^{2-} から $S_2O_3^{2-}$ あるいは H_2S のみを生成する場合に H_2 吸収量/添加 SO_3^{2-} の mole 比は 1, 3 となる。図3.2の反応には、この値が 0.6 であり $1/3$ と 1 の間である。

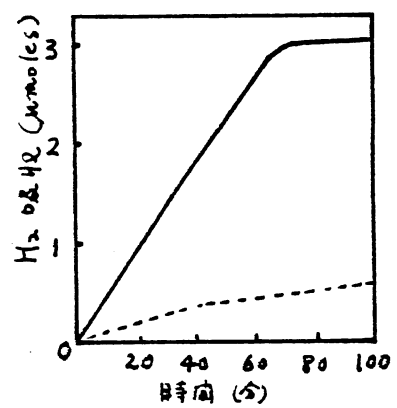


図3.2 精製酵素による SO_3^{2-} 還元の時間経過。 H_2 吸収を、標準反応液 (メチルオレンジ 1 mM, 0.7 単位 EDTA -セ, pH 6.0) の反応で追跡した。 $NaHSO_3$ は 5 μ mole 添加。
 ——— 完全系
 - - - - - 還元酵素無添加

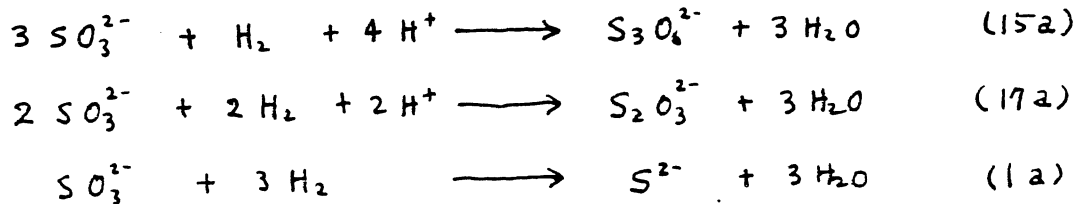
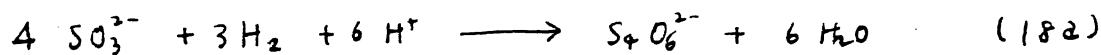


表3.2. 精製亜硫酸還元酵素による SO_3^{2-} 還元の化学当量。図3.2の実験と同一の実験である。反応100分後に各生成物の定量を行なった。 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ はチオシアン法による。

反応系	SO_3^{2-} 添加 μmoles	H_2 吸収 μmoles	H_2S 生成 μmoles	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 生成 μmoles (atoms of S)	$\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ 生成 μmoles	$\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ 生成 μmoles	回収 S μmoles
完全系	5	3.0	0.53 (0.53)	0.30 (0.60)	0.80 (2.40)	0.03 (0.12)	(3.65)
還元酵素 無添加	5	0.6	0.18 (0.18)	0.05 (0.10)	0.13 (0.39)	0.02 (0.08)	(0.75)

H_2 吸収停止後、反応を止め、生成物の分析を行なった。 H_2S は副室のアルカリを吸収させたものを St. Laurent (1929) の方法で、反応液中の $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ はチオシアン法で定量した。生成物分析の一例を表3.2に示す。この例では、相対的 SO_3^{2-} の半分程度が $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ として検出された。 H_2S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ も無視できる量存在する。後述するより、各生成物の相対比は反応条件により変化する。 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ が主生成物の場合もある。 $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ は、どのような条件でも検出される量は定量法の誤差範囲であり、この酵素反応の生成物ではないだろうと思われる。S原子の生成物中の回収は約7割で十分高いとはいえないが、還元反応開始前の気相を H_2 と交換し終了までの間に SO_3^{2-} が自働酸化をうけ、 SO_4^{2-} になったためと思われる。反応液に、チオシアン法の副室から H_3PO_4 を添加して H_2S の回収を種地的に行なっても H_2S の値は大きな変化がなかったのと H_2 の貯留もないだろう。

検出された $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, H_2S (および $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) の、それぞれ SO_3^{2-} の還元で生じた H_2 の必要量は式 15a, 17a, 1a (および 18a) が



より求められる ($[\text{S}_3\text{O}_6^{2-}] + 2[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}] + 3[\text{S}^{2-}] + 3[\text{S}_4\text{O}_6^{2-}]$)。表3.2の

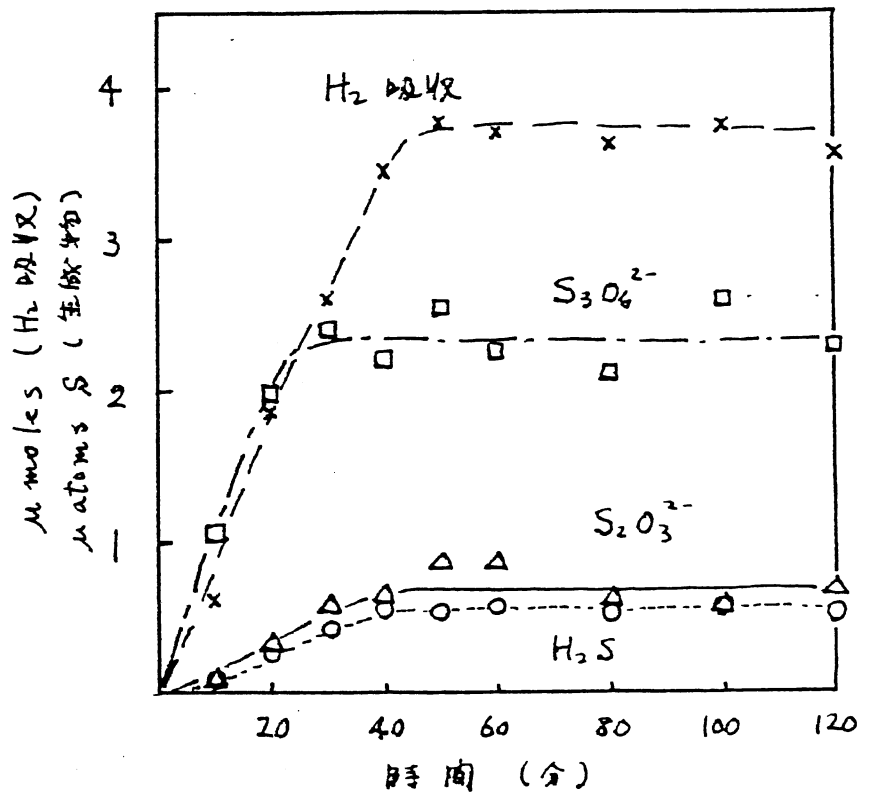
完全系の場合、生成物の定量値から上の計算で求めた H_2 吸収必要量は 3.08

μmoles 2. 実測値 $3.0 \mu\text{moles}$ とよくあう。したがって、この酵素による SO_3^{2-} 還元反応では、式 15, 17, 1 (および 18) の反応が混合しておこっていると思われる。(図 3.2, 表 3.2 の実験ではヒドロキシル標品が SO_3^{2-} 還元活性を十分に含んでおり、還元酵素無添加でも H_2 吸収がおこる)。

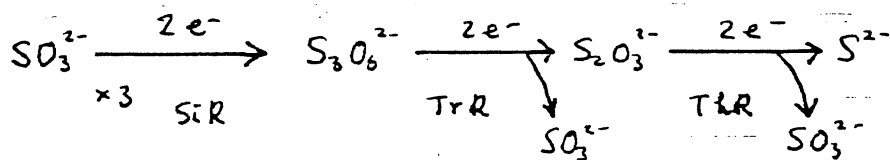
もし、本酵素が仮説 1 のように酵素系の最初の酵素(式 15)であれば生成物は $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ のみであり、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ や H_2S の生成はトリチン酸還元酵素とチチン酸還元酵素の混在によらなければならない。しかし、精製酵素には $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ の還元活性は含まれていない(表 3.1)。むしろ含まれている場合でも、その活性(H_2 吸収量)では $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ と H_2S の生成を説明できない。

更に、生成物の蓄積の時間経過を追う(図 3.3)。相対比は一定ではないが、反応の最初から $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, H_2S とも生じていること、いっしょに生成してそれらは減少しないし、 H_2 吸収停止後増減しないことが示された。

図 3.3. 精製亜硫酸還元酵素による SO_3^{2-} 還元反応の生成物蓄積の時間経過。標準の H_2 吸収は $2 \mu\text{atoms S}$ を測定し、各時間ごとに 1 コップ フラスコを換圧計よりおとし、生成物を (H_2S : Se Korant 法, 他イオン: チチン酸法) 定量した。ヒドロキシル P パタイト画合使用。X チルガイオロゲン 1 mM NaHSO_3 $5 \mu\text{moles}$ 添加生成物は S 原子 μatoms 2 である。



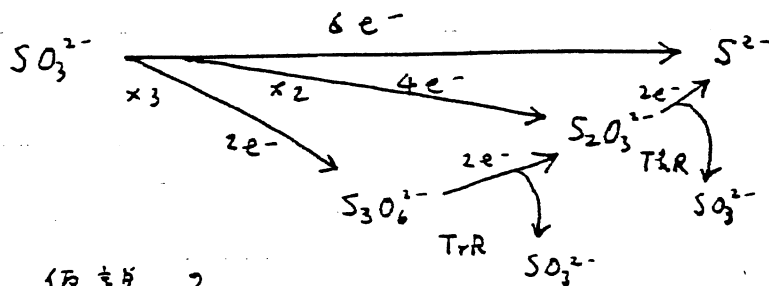
また、もし H_2S が仮説 1 にしたがって、 $S_3O_6^{2-}$, $S_2O_3^{2-}$ を経由して生成し



仮説 1

したがって、 ^{35}S で標識した SO_3^{2-} の還元で生じた H_2S の比較射能は、反応系に標識しない $S_3O_6^{2-}$ あるいは $S_2O_3^{2-}$ が共存させた場合、その原子比だけ希釈されるはずである。表 3.3 に示すように、 H_2S の比較射能は、標識しない $S_3O_6^{2-}$ の共存の場合に比べて 2 倍低下している。標識しない $S_2O_3^{2-}$ も、 $[S]-SO_3^{2-}$ の 2 倍あるいは 4 倍 (S 原子比) 共存させても、比較射能が 1/2 あるいは 1/4 まで希釈されることはない。 $S_2O_3^{2-}$ と SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$ と S^{2-} の間には S 原子の交換反応がみられる。若干の比較射能の低下は、これによって説明されることがある。又、たとえ H_2S の生成がいくらかは $S_2O_3^{2-}$ を経由するとしても、すべてではないと仮定する。

以上から、仮説 1 の反応 (式 15) にかかわり次のような反応が、この酵素による触媒されるであろう。



仮説 2

この仮説では、亜硫酸還元酵素は反応式 1, 17, 15 を並行して行なう。 H_2S , $S_2O_3^{2-}$, $S_3O_6^{2-}$ がこの酵素の生成物である。

表 3.3. $[^{35}\text{S}]-\text{SO}_3^-$ より生成する $[^{35}\text{S}]-\text{H}_2\text{S}$ の放射比活性への $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$ の影響。

COMPOUNDS ADDED ($\mu\text{ATOMS OF S}$)	TIME (MIN)	H_2S FORMED	
		μMOLES	CPM
$^*\text{SO}_3^-$ 5	50	0.250	317
	120	.422	606
$^*\text{SO}_3^-$ 10	120	.674	825
$^*\text{SO}_3^-$ 5 + $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$ 10	50	.188	196
	120	.413	409
$^*\text{SO}_3^-$ 5 + $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$ 20	120	.479	381
$^*\text{SO}_3^-$ 5 + $\text{S}_3\text{O}_6^{3-}$ 10	50	.329	376
	120	.558	647
$^*\text{SO}_3^-$ 5 + $\text{S}_3\text{O}_6^{3-}$ 20	120	.584	687

3-4 基質濃度による反応型の変化

前節の実験結果から、この亜硫酸還元酵素は式 15, 17, 1 の 3 つの反応を逆行し 2 行なうと推定されたが、各反応がおこる相対比は一定ではなく、基質濃度によつて、各反応の割合

割合が変化することが明らかとなった。

SO_3^{2-} 濃度を一定にして、 X チルグイオロゲン濃度を変化させると、基質 SO_3^{2-} 量が同じであるにもかかわらず H_2S 吸収量の変化した。(図 3.4)

X チルグイオロゲン濃度が高いときは H_2S 吸収量は多く、また H_2S の生成も X チルグイオロゲン濃度が高いときは多かった。

(図 3.4)。 X チルグイオロゲンを一定にして、 SO_3^{2-} 濃度を変化させた場合は、勿論、反応の絶対量は変化する。

各生成物の相対量も変り、これを、

生成物中の S 原子の百分(%) として表すと図 3.5 のようになる。 SO_3^{2-} 濃度が高いと $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ の百分率が増え、 H_2S 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ は相対的に減少している。

X チルグイオロゲン濃度によつて H_2S や $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ の百分率が高いことを示している(図 3.5 b, c)。生成物の時間経過を直った時(図 3.3)、初期には $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ 量が相対的に多いが、これも SO_3^{2-} 濃度の経時的変化の説明される。

更に、図 3.6 に示すように、 SO_3^{2-} 濃度と X チルグイオロゲン濃度の比が同じであれば、絶対濃度はちが、これも同じような反応がおこることがわかった。

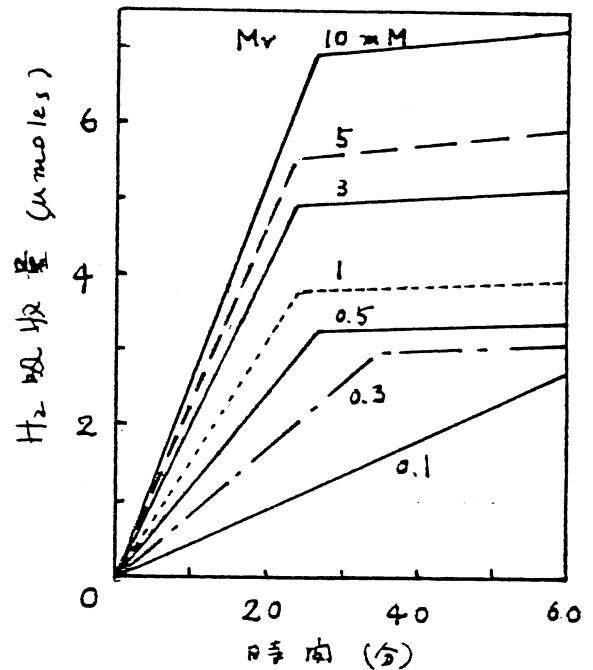


図 3.4. X チルグイオロゲン濃度による反応型の変化。ヒドロキシルパバタイト画合と可溶性ヒドロゲナーゼ使用。 NaHSO_3 $5 \mu\text{moles}$ 。 X チルグイオロゲン濃度は図の折上線の上から 10, 5, 3, 1, 0.5, 0.3, 0.1 mM

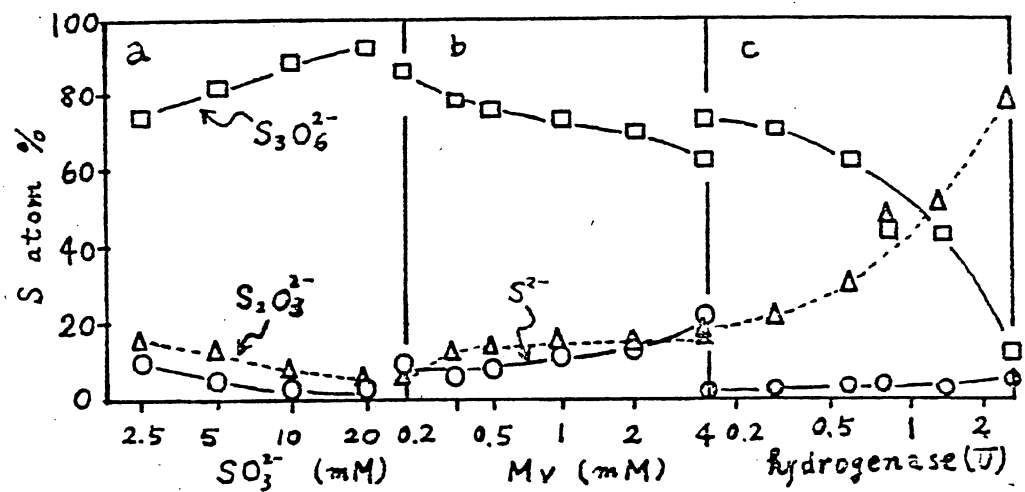


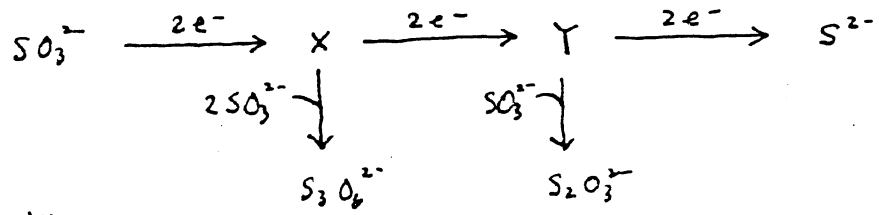
図3.5 SO₃²⁻, Xチルガイオロゲン, ヒドロゲナーゼ濃度の, 生成物相対量への影響. SO₃²⁻還元反応を行ない, 一定時間後の生成物を定量化し, 生成物中のS原子合計に対する各生成物(S原子)を%とあらわした。

- a) Xチルガイオロゲン 1 mM, ヒドロゲナーゼ 0.5単位で一定, SO₃²⁻の初濃度を変化させた。
- b) SO₃²⁻ 10 μmoles/ml, ヒドロゲナーゼ 0.5単位 (一定) で Xチルガイオロゲン濃度を変化させた。
- c) SO₃²⁻ 10 μmoles/ml, Xチルガイオロゲン 1 mM (一定), ヒドロゲナーゼ (可溶性) の量を変化させた。

た。つまり, Xチルガイオロゲンを一定 (1 mM) にし SO₃²⁻ 初濃度を変化させたときの H₂ 吸収量, H₂S 生成量を, 加えて SO₃²⁻ あたりの mole 比で出し, これを SO₃²⁻ と Xチルガイオロゲンの濃度比 (横軸) に対しプロットした直線と, SO₃²⁻ 初濃度 5 mM の反応を種々の Xチルガイオロゲン濃度で行なったとき得られる H₂ 吸収量 / SO₃²⁻ 添加量 あるいは H₂S 生成量 / SO₃²⁻ 添加量のプロットはよくかきなる。

SO₃²⁻ の還元型 Xチルガイオロゲンの相対比は, 2, 式 15, 17, (1) の反応のふりかえりから決定されると考えられる。

以上より, 亜硫酸還元酵素の反応様式は仮説3のようになるのでは無い



仮説3

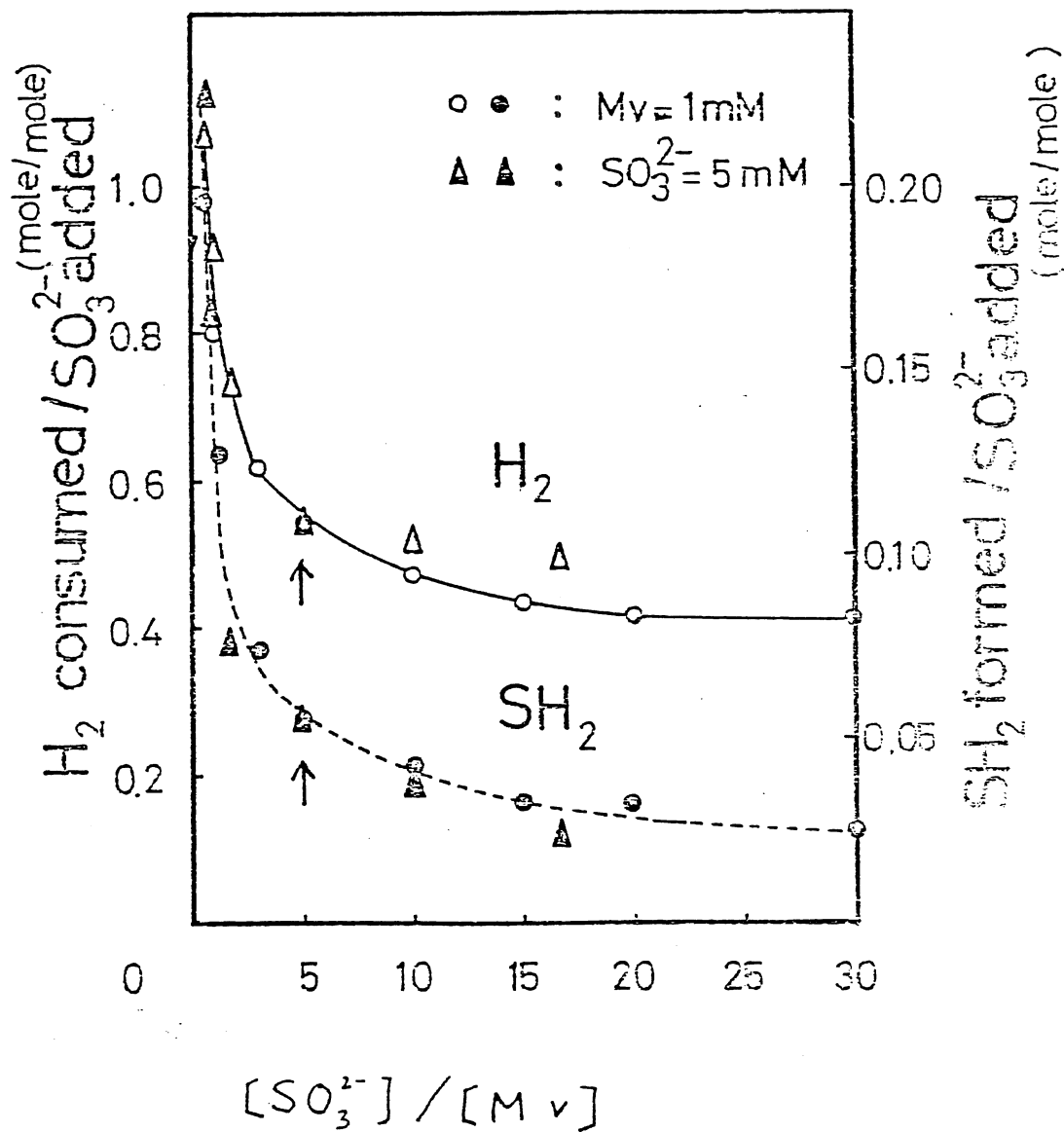


図 3.6 反応型 A の SO_3^{2-} とメチルウイオロゲン (濃度の影響)。ヒドロゲン-セ-メチルウイオロゲン系と共投させ H_2 による SO_3^{2-} 還元を行なう。 H_2 吸収停止後 (165~200 分) H_2S を定量した。加えた SO_3^{2-} 量と H_2 吸収量 (mole/mole) (\circ, Δ) および H_2S 生成量 (mole/mole) (\bullet, \blacktriangle) を、添加 SO_3^{2-} 初濃度とメチルウイオロゲン濃度の比 (mM/mM) に対するプロットした。 \circ, \bullet --- メチルウイオロゲン濃度一定 (1 mM)、 Δ, \blacktriangle --- SO_3^{2-} 初濃度一定 (5 mM)。矢印は標準反応条件。

と考へた。つまり、 SO_3^{2-} は酸素により還元された中間体 X なる。 X は 反応系 の還元力が強ければ更に還元された Y 、更に S^{2-} へと還元される。 SO_3^{2-} の濃度が高くなると SO_3^{2-} と結合して $S_3O_6^{2-}$ となり蓄積する。 Y も又電子供与系 X による SO_3^{2-} の濃度の相対的な大きさにより H_2S へと還元される。 Y は SO_3^{2-} と結合して $S_2O_3^{2-}$ となる。 といふことが出来る。

この仮説は 今までの実験結果とよくあつて説明できる。

才4章 トリチオ=酸還元酵素とチオ硫酸還元酵素の分離・精製とその性質 (小林S 1969b, 小林, 1967, 小林正五, 1967)

式16 および式2の反応を触媒する酵素 TrR, TrR の分離・精製を行い、その性質を検討した。

4-1 トリチオ=酸還元酵素の分離とその性質

粗抽出液による $S_3O_6^{2-}$ 還元の至適 pH は、ヒドロゲナーゼと共役させた H_2 吸収法で 8 付近であり (図 3.1)。

粗抽出液の 20,000 × g, 20 分^{遠心の}沈殿を緩衝液で抽出した画分は、ほぼ式16の反応をすることがわかった (表 4.1)。つまり、ヒドロゲナーゼ、メチルゲイオロゲン存在下で 10 μmole の $S_3O_6^{2-}$ 添加でほぼ等量の H_2 吸収がみこり、 H_2S は生成せず、 I_2 滴定により SO_3^{2-} と $S_2O_3^{2-}$ の^{ほぼ}等量ずつ検出された。 SO_3^{2-} 量のやや少ないのは空気酸化による SO_3^{2-} の減少か、S-R の混在によるものだろう。このよりに TrR の存在が示されたが、その精製は、酵素が不安定なため成功しなかった。

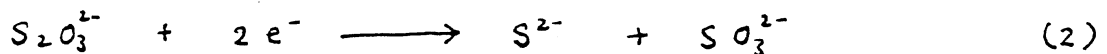
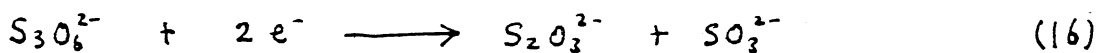


表 4.1. 沈殿を再抽出画分による $S_3O_6^{2-}$ の還元。 H_2 , ヒドロゲナーゼ, メチルゲイオロゲン存在下, pH 8.0 で、 H_2 による $S_3O_6^{2-}$ の還元を行なった。 H_2 吸収停止後、 SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, H_2S を定量した。(定量法は“実験方法”を参照せよ)。

実験番号	$S_3O_6^{2-}$ 添加	H_2 吸収 (μmoles)	$S_2O_3^{2-}$ 生成	SO_3^{2-} 生成	H_2S 生成
1	10.0	10.3	13.4	6.1	0.1
2	10.0	10.35	8.4	8.7	0.1
3	10.0	10.35	10.3	7.7	0.1

4-2 牛乳糖酸還元酵素の精製とその性質

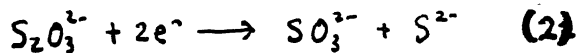
“実験方法”に示すように、粗抽出液の超遠心沈清より、硫酸銨画、DEAE-セルロースフロマトグラフィー、2度のヒドロキシルアパタイトフロマトグラフィーにより TRR を精製し、粗抽出液に比し260倍に増加した260倍の精製 TRR 標品を得た(表4.2)。

表4.2 牛乳糖酸還元酵素精製のまとめ

画分	容量 (ml)	蛋白 (mg)	活性 (units)	(収率 %)	比活性 (units/mg蛋白)	精製倍率
S ₂₀	117	11,600	42,200	100	3.6	1.0
S ₁₀₀	92	7,070	26,700	63	3.8	1.0
P _{2/3}	100	4,440	21,800	52	4.9	1.4
DEAE	140	546	11,800	28	21.6	5.9
1st HA	35	22.8	8,410	20	370	102
2nd HA	13.5	6.8	6,480	15	960	264

精製標品は可視域に顕著な吸収帯をもたず、^{非色素} 白蛋白である。

ヒドロゲナーゼ、メチルグロチン存在下で添加した $S_2O_3^{2-}$ と等モルの H_2 吸収がおこる(図4.1)。天然の電子伝達体と124ナノメートルの C_3 が働く(図4.1)。 SO_3^{2-} は全く還元しない。



反応の最適 pH は 7.5 付近である(図3.1)。

したがって、亜硫酸還元酵素とは別に式2の反応を有する酵素、牛乳糖酸還元酵素が存在することを示した。

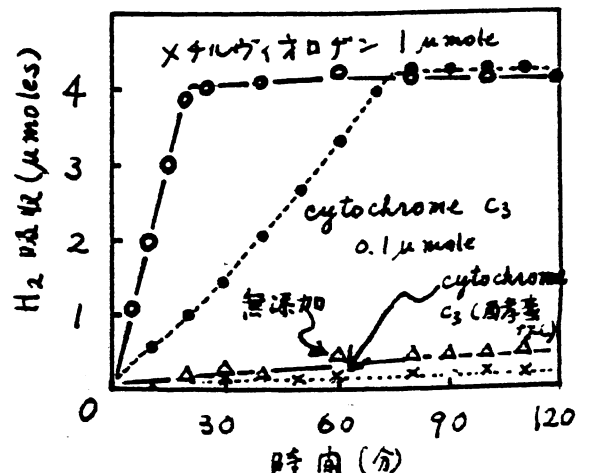


図4.1 精製酵素による $S_2O_3^{2-}$ の還元への電子伝達体の影響, $Na_2S_2O_3$ 4 μmoles

第5章 亜硫酸還元酵素系への電子伝達系 (小林 1969a, 1970a, Irie et al. 1973)

亜硫酸還元酵素系への電子伝達体として cytochrome c_3 の他にもう一つの伝達体 flavodoxin が存在することを見出し、これを精製、性質を調べた。

5-1. flavodoxin の精製とその性質

“実験方法”に示す方法で *D. vulgaris* の flavodoxin を精製した。この flavodoxin は、図 5.1 のスペクトルをもつ。吸収極大は 456, 376, 273 nm あり。

最も精製された検品の 273 nm と 456 nm の吸収度の比 (A_{273}/A_{456}) はほぼ 4 である。可視部の吸収は、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ の添加で消失し、空

白の自酸化にされ、セミキノン型を至極酸化型にもどす。

flavodoxin のフラビンヌクレオチドは、煮沸して蛋白質からはずし、二種の展開溶媒で洗脱したマトグラフィーで

行ない (Huemaekens & Felton, 1957), FMN と同定した (表 5.1)。

表 5.1 フラビンヌクレオチドの洗脱マトグラフィー。約 0.1 μmol のフラビンを含むフラボトキニン溶液を蒸留水 (50 ml) に遊離したフラビンをフェノール、水で抽出した。展開溶媒 A) π -ブタノール-酢酸-水 (4:1:5 v/v), B) 0.4 M Na_2HPO_4

フラビンヌクレオチド	R _f 値	
	溶媒 A	溶媒 B
フラボトキニンより抽出したフラビン	0.14	0.54
FMN	0.15	0.59
FAD	0.04	0.41

5-2. 酸化還元反応への flavodoxin の関与

種々の酸化還元反応への flavodoxin の関与を、cytochrome c_3 と比較して調べた。

5-2-1) 粗抽出液における H_2 による SO_3^{2-} の還元

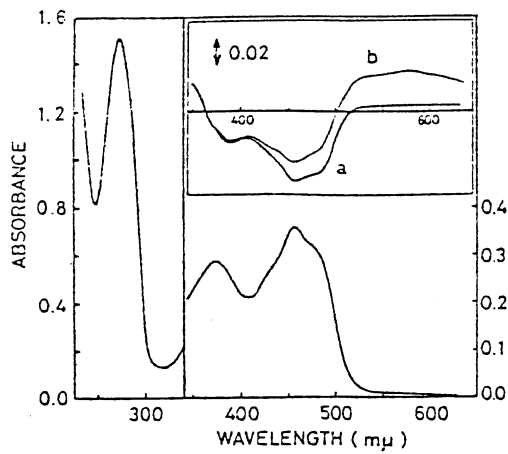


図 5.1 flavodoxin の吸収スペクトル。
0.7 mg 蛋白/ml. 挿入図は還元-酸化型
差スペクトル。a) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -還元型-酸化型。
b) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元後、空気に曝す事による酸化型(丸の
七とナニ型)-酸化型。(Jrie et al. 1973)

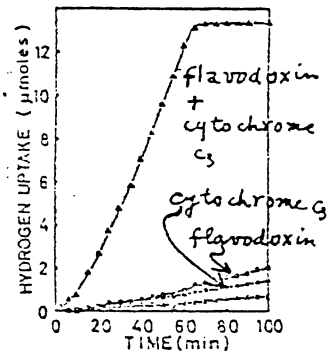
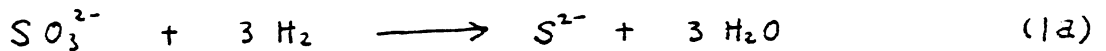


図 5.2 粗酵素液における H_2
による SO_3^{2-} 還元への flavodoxin と
cytochrome c_3 の関与。電子伝
達体除去抽出液を可溶性化して
ヒドロゲナーゼを用いた。基質:
 NaHSO_3 5 μmoles . pH 6.2.
(Jrie et al. 1973)

flavodoxin と cytochrome c_3 を除いた粗酵素液(電子伝達体除去抽出
液)とヒドロゲナーゼの存在下で、 H_2 による SO_3^{2-} 還元を行なった。電子伝
達体を添加(ない)と、反応は著しくおこさない。flavodoxin と cytochrome
 c_3 は単独でそれぞれに反応を促進するが、この両者の共存で、反応は著しく促
進される(図 5.2)。この時、 H_2 吸収は SO_3^{2-} あたりほぼ 3 モルおこり、



式(12)の反応がおこると思われる。したがって、 H_2 による SO_3^{2-} の H_2S までの
還元には flavodoxin と cytochrome

c_3 の両者が必要で、この 2 つ
か、ヒドロゲナーゼと亜硫酸還元
酵素系の間の電子伝達をしと
いふと思われる。なお、この
際 flavodoxin の役割を、遊離
のフラビン ($6.7 \times 10^{-5} \text{M}$ リボフラ

表 5.2. 精製した亜硫酸還元酵素の電子
伝達体特異性。ゾーニ電圧降下毎 0.7
mg 蛋白と可溶性化してヒドロゲナーゼを用いた。

電子伝達体	H_2 吸収速度 ($\mu\text{moles}/\text{min}$)
4 μg の c_3 1 mg	0.012
" + フラボドキシン 1 mg	0.013
キナルギオロフェル 1 μmoles	0.095
無添加	0.000

酸化ヒドロゲナーゼとヒドロゲナーゼの間では flavodoxin と cytochrome C_3 が働いており、なんぶん、この2つは連続して電子伝達をしていると思われる。

5-2-4) ヒドロゲナーゼ反応

ヒドロゲナーゼ存在下で、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ により還元した電子伝達^体からの H_2 発生を換圧法で調べた。cytochrome

C_3 あるいはメチルグイオロゲンからは H_2 発生がみられたが、

flavodoxin からは H_2 発生がなく、

cytochrome C_3 への促進効果もなかった (表 5.4)。したがって、

flavodoxin は ヒドロゲナーゼと直接には電子を受け取れないと思

われる。Thunberg 型キヌバツ

ト中、ヒドロゲナーゼと flavodoxin

を H_2 の下で放置 (なかスバクト

ル変化は見られなかった。これに

少量の cytochrome C_3 を添加する

と、flavodoxin のスバクトル変化がおこった (図 5.3)。図 5.3 には、酸化

型 (同じ組成の溶液で、気相が空気のもの) に対する差スバクトルを示して

いる。cytochrome C_3 共存下の差スバクトル (上段 実線) から、cytochrome

C_3 のみの差スバクトル (図 5.3, 中段) を差引くと、図 5.3 上段 点線のような

差スバクトルが得られた。これは、^{flavodoxin} セミキノ型^の差スバクトル (図 5.3, 下

段 実線) とよく一致しており、このとき flavodoxin は cytochrome を介し

て H_2 -ヒドロゲナーゼ系で還元され セミキノ型^の差スバクトル^{を示す} 2 いると思われ

表 5.4 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で還元した電子伝達体からの、ヒドロゲナーゼによる H_2 の発生。可溶性ヒドロゲナーゼ (0.07 mg 蛋白) リン酸緩衝液 pH 6.6, と電子伝達体を含む反応液に結晶 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (約 3 mg) を添加。Warburg 換圧計 (気相: N_2) で H_2 の発生速度を求めた

電子伝達体	H_2 発生速度 ($\mu\text{moles}/\text{min}$)
cytochrome C_3 0.1 mg	0.13
flavodoxin 0.29 mg 蛋白	0.00
cytochrome C_3 0.1 mg flavodoxin 0.29 mg 蛋白	0.07
メチルグイオロゲン	1.05
無添加	0.00

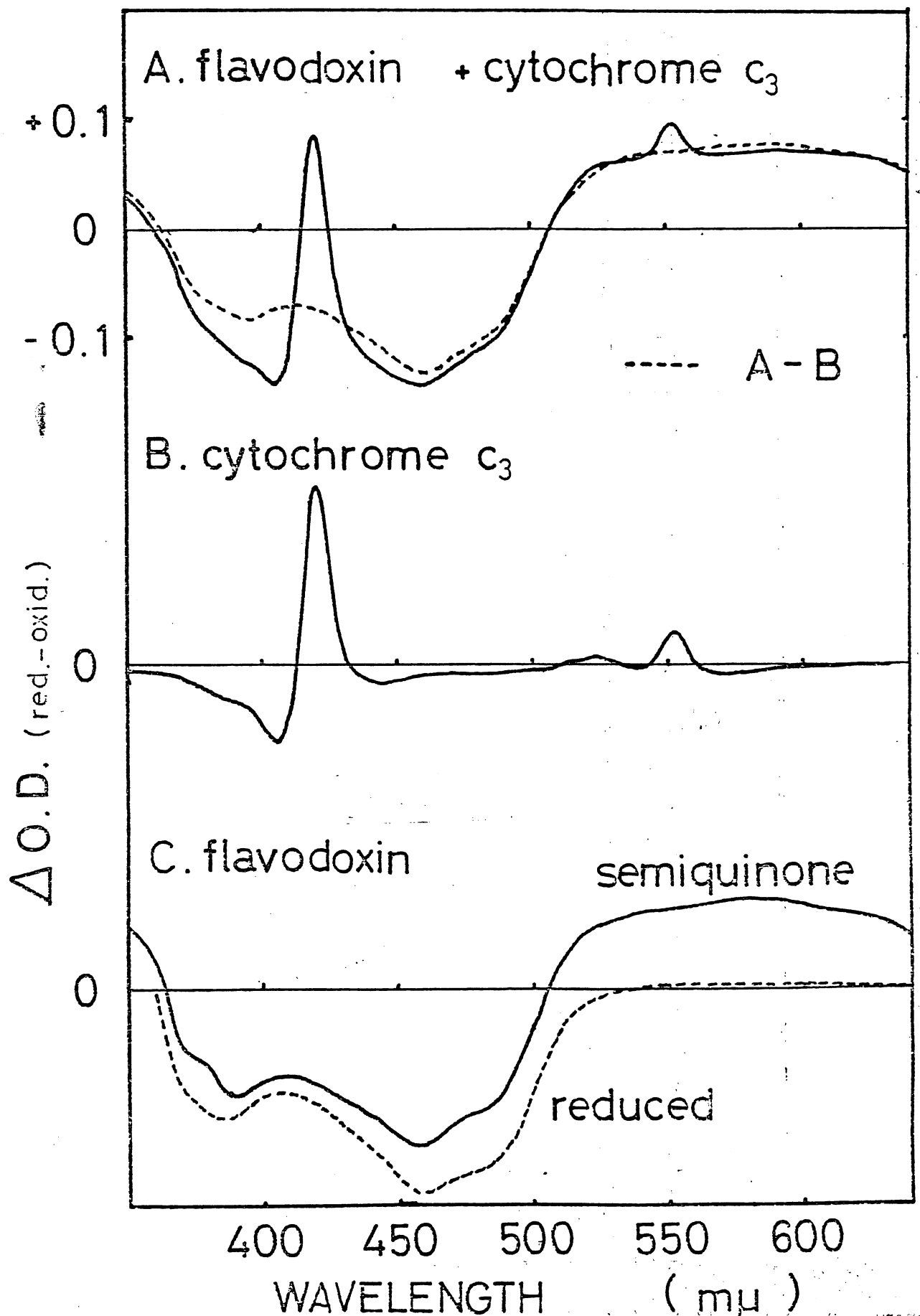
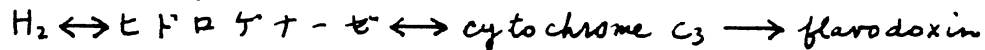


図 5.3 flavodoxin の酵素学的還元。還元型-酸化型差スペクトル。

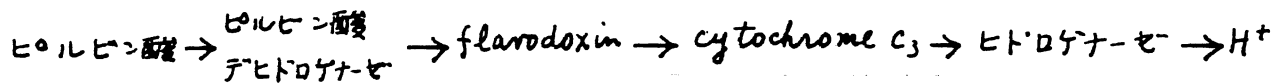
る。

5-3 亜硫酸還元酵素系と電子伝達系

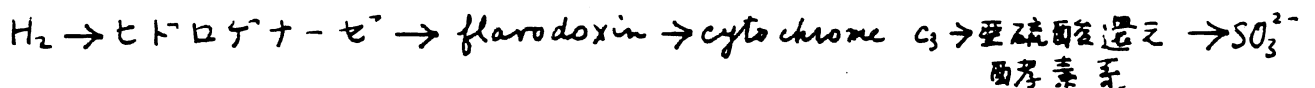
前節4)の実験より flavodoxin は cytochrome C_3 , ヒドロゲナーゼと、次のようにつながっている。



ピルビン酸の加水分解反応による H_2 の発生に flavodoxin, cytochrome C_3 の両者の関与が示され(表5.3)。しかも flavodoxin は hydrogenase の基質とならない(表5.4)から、ピルビン酸デヒドロゲナーゼとヒドロゲナーゼは、下記のように電子伝達がおこなわれていると思われる。



SO_3^{2-} の H_2S までの還元には flavodoxin と cytochrome C_3 の両者が必要で、前述の電子伝達系の存在を考えると、 SO_3^{2-} 還元の際の電子伝達は



という経路がおこなわれている。

ところで、亜硫酸還元酵素系を構成する3つの還元酵素のうち、精製

SiR は cytochrome C_3 のみで H_2 -ヒドロゲナーゼ系と共役した。また、

図5.3で示したように、flavodoxin は H_2 -ヒドロゲナーゼ-cytochrome C_3 で還元され、スペクトルが変化するが、こゝして還元された flavodoxin は N_2 中、

粗酵素液の存在下でも SO_3^{2-} 添加でスペクトル変化をおこさず、ゆえに

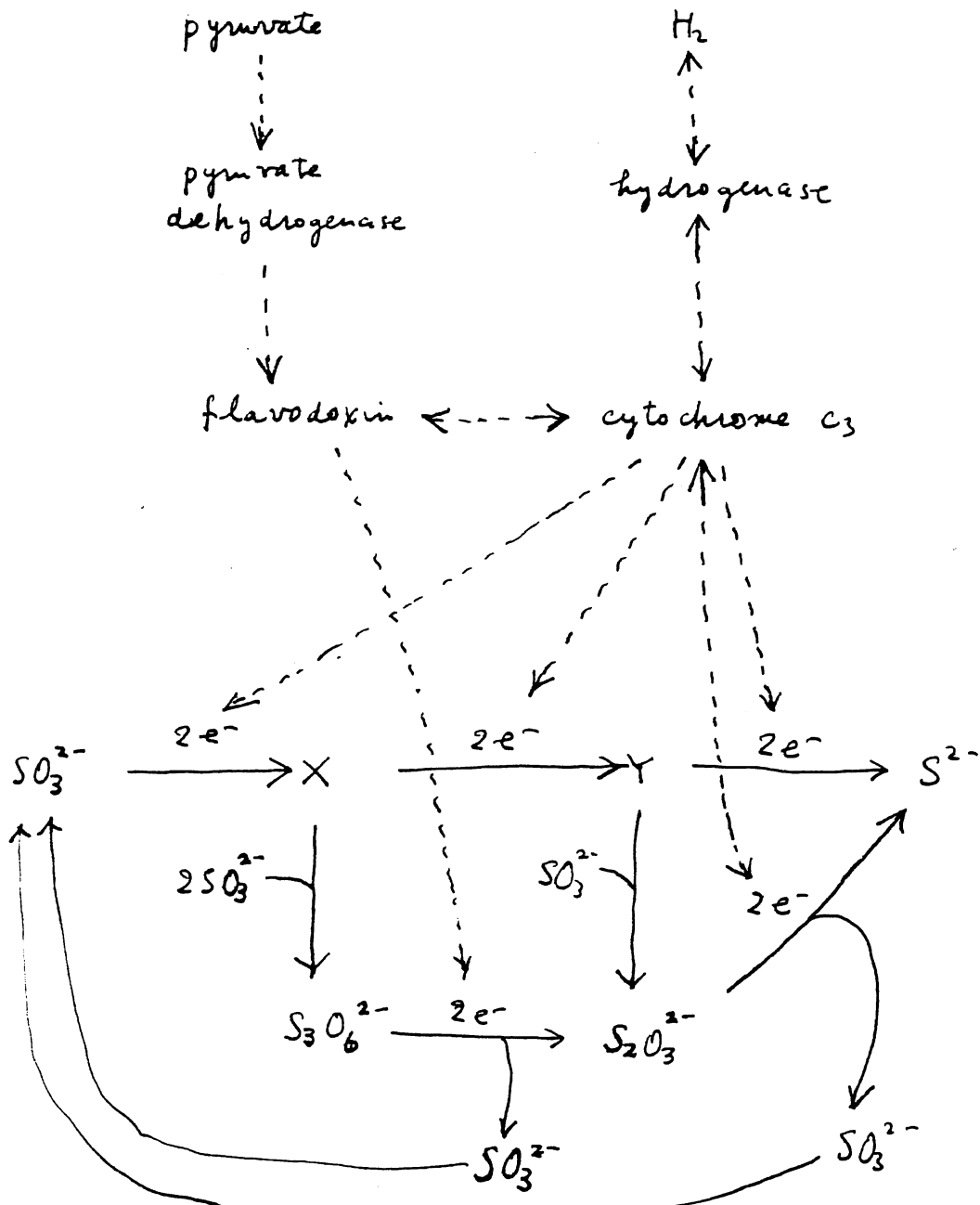
りではあるが cytochrome C_3 が還元されるのみであった。したがって、

SiR は flavodoxin を経由しないで、 H_2 -ヒドロゲナーゼ-cytochrome C_3 より電子をうつすと思われる。

亜硫酸還元酵素系も、cytochrome C_3 から電子をうつすことのできる。

(図 4.1). このとき flavodoxin の添加効果はなかった。

したがって、粗酵素で与えられた flavodoxin の SO_3^{2-} 還元への関与は、3つの酵素のうちトリチオチオ酸還元酵素への電子伝達にのみ関与するであろう。(仮説 4)。



仮説 4

考 察

本研究によつて、硫酸還元菌における SO_4^{2-} 還元 の最終段階である SO_3^{2-} の H_2S までの還元は、他の生物の同化的亜硫酸還元酵素 [EC.1.8.1.2] のように1つの酵素によつて行なわれるのではなく、複数の還元酵素群の作用で行われよう。 $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ および $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ がその中間生成物であることが、ほゞあつて明らかにされた。(第1章)。 Suth & Akagi (1969) は、*Desulfonitribrio* の2つの蛋白画分の作用で SO_3^{2-} が還元されて $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ を生ずることを見出し、 Findley & Akagi (1969, 1970) は、粗抽出液による SO_3^{2-} の還元で $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ の生成が認められること、 $[\text{S}]-\text{SO}_3^{2-}$ から両方の S がラベルされた $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ が生じることなどから、硫酸還元菌の SO_3^{2-} の還元で $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ を中間生成することを証明した。又、 Lee & Peck (1971) は本研究とは独立に、*Desulfonitribrio gigas* の亜硫酸還元酵素を精製し、この酵素が SO_3^{2-} から $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ を生成することを示した。したがつて、硫酸還元菌における亜硫酸還元系が、同化的 SO_4^{2-} 還元系のとちひに比して複雑な機構を有することは明らかである。

今才硫酸還元酵素は硫酸還元菌の生化学的研究の初期から分画精製や性質の検討がなされてきた (Jehimoto et al. 1955a, 1957a, 小林 1967) が、その生理的意義は不明であつた。本研究により今才硫酸還元酵素の生理的意義は、少くともその1つは、亜硫酸還元酵素系を構成してゐることにあることが示された。

緑色色素蛋白 *desulfonitridin* は、やはり初期の研究で見えられた (Jehimoto et al. 1954b, 1957a, Postgate 1956), *Desulfonitribrio* 属に特徴的な色素蛋白として分類にも使われる (Postgate, 1959) が、その生理機能は不明であつた。Diec 電気泳動的、超遠心的に均一な精製亜硫酸還元酵素は、可視部の吸収スペクトルから、アソカリン赤色素光を吸収する性質も、

desulfouridin と一致し、クロマトグラフや他の分析法でも、常に活性と desulfouridin は同じ分画に存在した。これらのことから 亜硫酸還元酵素は desulfouridin とのものであると結論した。Lee & Peck (1971) も *D. gigas* の酵素について 同様の結果から、この結論を出している。亜硫酸還元酵素の初期の研究 (Jehimoto & Yagi 1961) でも活性と発色が分離できないことを認めているが、desulfouridin の酵素とのものであることに異ななかったのは何故だろうか。H₂-セプロゲンゼ素と交換させ、H₂吸収と H₂S 発生をみる場合、この 亜硫酸還元酵素は 単独では H₂吸収も H₂S 生成も少なく、他の 2 つの 還元酵素が存在しないと、式 1 の反応を行わせないために、これを 亜硫酸還元酵素の 反応とみなせなかったのかもしれない。

desulfouridin の色素部分の本体については、Postgate (1956) は 10⁴ M リン関連物質と推定しているが今のところ確定はしていない。またこの発色部分が SO₃²⁻還元には必要かどうかも明らかでない。Lee & Peck (1971) は desulfouridin に NaHSO₃ と NaBH₄ を添加すると、スペクトルが 310 mμ 付近が増大することから desulfouridin の色素部分が SO₃²⁻の還元に関与していることを推定したが、同一条件で NaHSO₃ は NaBH₄ を還元し、Na₂S₂O₄ を生成し、310-320 mμ に強い吸収をもつようになるので、Lee & Peck の観察は、desulfouridin とは無関係な反応をみているのではないかと思われる。Miller & Saleh (1964) は、Cytochrome C はもつが、desulfouridin はもたない *Desulfonibrio* の株を見つけた。この株も生理的には他の株との差がみられないと報告されている。SO₃²⁻の還元も行なわれていると思われるので、desulfouridin の発色団をもたない 亜硫酸還元酵素があるのかもしれない。

現在までに精製されている限りの同化的亜硫酸還元酵素がすべて 590 mμ 付近に吸収極大をもつ色素層日であり (Roy & Trudinger, 1970)、亜硫酸還元酵素に共通のなんらかの発色団があるのかもしれない。

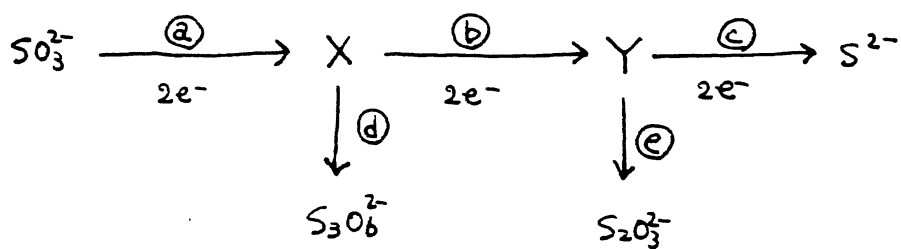
desulfoniridin は 約 50 倍に精製された均一となったから、抽出液中に
 総蛋白の 1~2% 含まれていると思われれる。このように多量に含まれる蛋白
 の発色因が、生理的に無意味とは考えにくく、何らかの役割を果たしている
 のがあるう。

精製亜硫酸還元酵素は、最終産物として $S_3O_6^{2-}$, $S_2O_3^{2-}$, H_2S を生成する(第
 3章)。

酵素反応の生成物が複数あるのは異常なことだが、酵母のセルビン酸脱
 水素酵素 [2-oxo acid carboxy-lyase; E.C. 4.1.1.1] では、主生成物、ア
 セトアルデヒドのほか、中間体がセルビン酸、あるいはアセトアルデヒドと
 縮合してアセト酸があるいはアセトインを副生成することが知られている。

(Juni, 1961)。この場合も生成物の量は基質濃度によって変化あり。
 SO_3^{2-} あるいはカルボニル化合物のような基質あるいは生成物の反応性が高い
 ことが、複数の生成物をもたらす主要因があるう。

この酵素の反応様式が SO_3^{2-} 濃度と電子供与体の強さの比によって変化する
 ことから次のような反応機構を提出した。

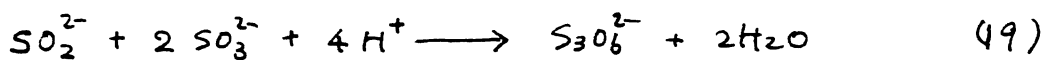


仮説 3.

中間体 X, Y は同定してはいないが、それ以外スルホキシル酸 SO_2^{2-} , 単体イ
 オン S と考えられるが最も簡単である。あるいはまたこれらの、酵素と結合した
 形のものがあってもいい。スルホキシル酸 SO_2^{2-} は、 $S_2O_3^{2-}$ の加水分解に

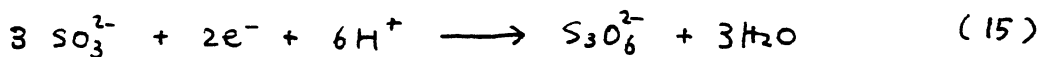
より程度的に生成し、 SO_3^{2-} と縮合して $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ を生成するといわれている* (式19)

単体 S は SO_3^{2-} と結合して $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ を生成する。(式20)

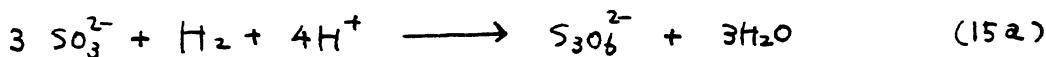


亜硫酸還元酵素が 酵素反応として、仮説3の反応のうちどれだけの反応を触媒しているのかわからない。もし X, Y が SO_2 と S であれば、d, e の反応は前述のように非酵素的に十分ありうることである。又、マチウがトコガン あるいは cytochrome C₃ は酸化還元電位が低いのでその還元型は S を非酵素的に還元する (Ishimoto et al., 1957, 1958)。したがって、a がありは a と b の反応のみが 酵素反応として行われよう。他は非酵素的に行われよう可能性がある。

ところで Lee & Peck (1971) は、*D. gigas* の亜硫酸還元酵素の反応生成物として $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ の存在を認め、定量した結果から仮説1 (Kobayashi et al., 1969) のように SiR が式15の反応を行っていると報告している。



しかし、彼らの実験の本素吸収量は定量された $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ から計算しても加えた SO_3^{2-} を基準にとっても式15より必要とされる量より多い。



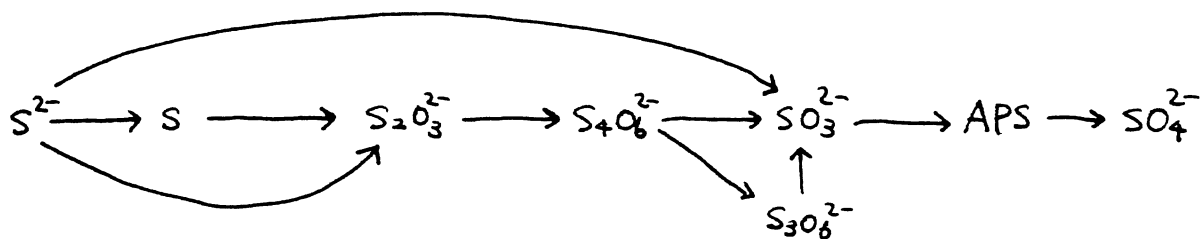
H_2S と $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 生成量が少なかったため検出されなかったのだらう。

Desulfonitro の生育時に S_2O が生成することから報告された (Inerson, 1967)。これが亜硫酸還元酵素による反応とどのような関係にあるかは不明である。

$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ や $\text{S}_n\text{O}_6^{2-}$ は、イナウ細菌 *Thiobacillus* による S や $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 酸化の際に中間生成物として知られている (総説: Roy & Trudinger 1970, Postgate, 1967) が、 SO_3^{2-} 生成に至る酵素系の詳細はまだ十分研究され

* M. Goehring & H. Stamm, 1942, Z. Anorg. Allgem. Chem., 250, 56.

2112



Okuzumi (1966) は、*Thiobacillus* のトナカオン酸還元酵素系について報告している。硫酸還元菌の亜硫酸還元酵素系には、1つの細菌による1つの代謝と一部共通している逆方向の酵素系が存在することから、比較生化学的に興味あることである。

SO_3^{2-} の H_2S までの還元には、電子伝達系として cytochrome C_3 と flavodoxin の両者が必要である。精製した亜硫酸還元酵素とトナカオン酸還元酵素が cytochrome C_3 と H_2 -hydrogenase 系と共通するの、亜硫酸還元酵素の3つの還元酵素のうち、トナカオン酸還元酵素のみが flavodoxin を経由して電子が伝達されることとされる(仮説4)。還元酵素へのこのような電子伝達経路の存在が何を意味するのかわかり、現在のところは不明である。また生体中の SO_3^{2-} 濃度と、電子伝達系の強さとの程度があるとしたら、どちらか SO_3^{2-} と $S_2O_3^{2-}$ を経由する還元があるのか、あるいは不明であるが、なんらかの調節が働いているはず。

Peck (1966) は、*D. gigas* 抽出液を使った H_2 による SO_3^{2-} の還元と電子伝達に共通した1-酸化が、おこると報告している。著者の上記亜硫酸還元反応は、可溶性成分(粗酵素液と、顆粒画分から可溶化して「CDPゲート」(Yagi, 1970) と電子伝達体)のみで行なわれる。少なくとも亜硫酸還元酵素系には、完全に1-酸化を除いても反応は進行した。通常の酵化的1-酸化の存在を考えると、むしろ酵化的1-酸化

かぶこ子にこれつては 否定的であらう。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始御指導にたつた北^道大薬学部
石本直教授に感謝する。

実験の一部は以下諸氏と共同で行った。

大西(立花)脊子, 高原(佐藤)元子, 高原謙治, 小林(尾島)身哉,
高橋宇治, 入江健二, 窪田憲世, 佐藤宗志。

共同実験者ならぬに、北大薬学部微生物化学講座構成員に、御協力、御援
助に感謝する。

超遠心分析とアミノ酸分析は、北大薬学部 大西、大沢両氏にしていた
いた

文 献

- Akagi, J.M., 1967, J. Biol. Chem., 242, 2478.
- Andrews, P., 1964, Biochem. J., 91, 222.
- 旭正, 1964, 植物生理, 4, 48.
- 千谷利三, 1959, 「新版色摺化学」, 中卷, 産業図書.
- Davis, B.J., 1964, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404.
- Findley, J.E. and Akagi, J.M., 1969, Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 266.
- Findley, J.E. and Akagi, J.M., 1970, J. Bacteriol., 103, 741.
- Golding, R.M., 1960, J. Chem. Soc. (London), p3711.
- Hatchikian, E.C., Le Gall, J., Bruschi, M. and Dubourdieu, M., 1972, Biochim. Biophys. Acta., 258, 701.
- Huennekens, F.M. and Felton, S.P., 1957, Methods in Enzymology, ed. by Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Academic Press, III, p950.
- Ishimoto, M., Koyama, J., Omura, J. and Nagai, Y., 1954 a, J. Biochem., 41, 537.
- Ishimoto, M., Koyama, J. and Nagai, Y., 1954 b, Bull. Chem. Soc. Japan, 27, 565.
- Ishimoto, M., Koyama, J. and Nagai, Y., 1954 c, J. Biochem., 41, 763.
- Ishimoto, M., Koyama, J. and Nagai, Y., 1955 a, J. Biochem., 42, 41.
- Ishimoto, M. and Koyama, J., 1955 b, Bull. Chem. Soc. Japan, 28, 231.
- Ishimoto, M. and Koyama, J., 1957 a, J. Biochem. 44, 233.
- Ishimoto, M., Koyama, J., Yagi, T. and Shiraki, M., 1957 b, J. Biochem., 44, 413.
- Ishimoto, M., Yagi, T. and Shiraki, M., 1957 c, J. Biochem., 44, 707.
- Ishimoto, M., Kondo, Y., Kameyama, T., Yagi, T. and Shiraki, M., 1958, Proc. Intern. Symp. Enz. Chem., Tokyo and Kyoto, 1957, p229.

- Ishimoto, M. and Egami, F., 1959 a, Proc. of Intern. Symp. on
Origin of Life on Earth, Moscow, 1958, Pergamon Press.
- Ishimoto, M., 1959 b, J. Biochem., 46, 105.
- Ishimoto, M. and Fujimoto, D., 1959 c, Proc. Japan Acad., 35, 243.
- 石本真. 1960, 生化学, 32, 1
- Ishimoto, M. and Yagi, T., 1961 a, J. Biochem., 49, 103
- Ishimoto, M. and Fujimoto, D., 1961 b, J. Biochem., 50, 299.
- 石本真. 小林和彦. 1971. 「生化学の名著切片」(鈴木S編). 講談社. p.219.
- 石本真. 千葉幸子. 近藤博之. 小林和彦, 1972, 日本薬学会第92年会122発表.
- 入江健二. 小林和彦. 小林身哉. 石本真, 生化学, 43, 649.
- 入江健二. 小林和彦. 石本真. 1972. 生化学. 44, 760.
- Irie, K., Kobayashi, K., Kobayashi, M. and Ishimoto, M., 1973,
J. Biochem., 73(2), 353.
- Iverson, W.P., 1967, Science, 156, 1112.
- Juni, E., 1961, J. Biol. Chem., 236, 2302.
- 小林和彦, 1967. 東京大学大学院修士論文.
- 小林和彦. 石本真, 1967. 生化学. 39, 680.
- 小林和彦. 立花幸子. 石本真, 1968 a, 生化学, 40, ~~579~~ 279
- 小林和彦. 立花幸子. 石本真. 1968 b, 生化学, 40, ~~576~~ 576
- Kobayashi, K., Tachibana, S. and Ishimoto, M., 1969, J. Biochem.,
65, 155.
- 小林和彦. 君島身哉. 石本真, 1969 a, 生化学, 41, 686
- 小林和彦. 佐藤元子. 高原謙治. 石本真. 1969 b, 生化学, 41, 541
- 小林和彦. 君島身哉. 石本真. 1970 a, 日本化学会 22 年会 122 発表
- 小林和彦. 高橋幸治. 石本真. 1970 b, 生化学, 42, 565
- 小林和彦. 窪田憲也. 石本真. 1971, 生化学, 43, 648
- Kobayashi, K., and Ishimoto, M., 1972, 10th International
Fermentation Symposium (Kyoto, 1972). Abstracts p.243.

- Kobayashi, K., Takahashi, E. and Ishimoto, M., 1972, J. Biochem. 72, 879.
- 小林 邦彦 石本 真, 1972, 生化学, 44, 760
- 小山 忠四郎, 1966, 「土と微生物」(土壤微生物研究全編), 岩波, p. 209.
- 小山 次郎, 1955, 化学の領域, 増刊 17, 100
- Kurtenacker, A., 1938, Analytische Chemie der Sauerstoffsäuren des Schwefels, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, p216.
- Lee, J.P. and Peck, H.D.Jr., 1971, Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 583.
- Le Gall, J. and Dragoni, N., 1966, Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 145.
- Le Gall, J. and Hatchikian, E.C., 1967, Compt. Rend. (Serie D), 264, 2580.
- Lipmann, F. and Tuttle, L.E., 1945, J. Biol. Chem., 159, 21.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951, J. Biol. Chem., 193, 265.
- McMeekin, T.L., Groves, M.L. and Hipp, N.J., 1949, J. Am. Chem. Soc., 71, 3298.
- Millet, J., 1955, Comptes Rendus des seances de l'Academie des sciences, 240, 253.
- Miller, J.D.A. and Saleh, A.M., 1964, J. gen. Microbiol., 37, 419.
- Moore, S. and Stein, W.H., 1963, Methods in Enzymology, ed. by Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., VI, 819.
- Moore, S., 1963, J. Biol. Chem., 238, 235.
- Morris, C.J.O.R., 1964, J. Chromatog., 16, 167.
- 中村 道徳, 1950, 農化, 24, 1
- Nietzel, O.A. and Desesa, M.A., 1955, Anal. Chem., 27, 1839.
- Okuzumi, M., 1966, Agr. Biol. Chem., 30, 713.

- Peck, H.D.Jr., 1959, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 45, 701.
- Peck, H.D.Jr., 1962, J. Biol. Chem., 237, 198.
- Peck, H.D.Jr., Deacon, T.E. and Davidson, J.T., 1965, Biochim. Biophys. Acta., 96, 429.
- Peck, H.D.Jr., 1966, Biochem. Biophys. Res. Commun., 22, 112.
- Postgate, J.R., 1954, Biochem. J., 56, xi.
- Postgate, J.R., 1955, Biochim. Biophys. Acta., 18, 427.
- Postgate, J.R., 1956, J. Gen. Microbiol., 14, 545.
- Postgate, J.R., 1959, Nature, 183, 481.
- Postgate, J.R., 1965, Bacteriol. Rev., 29, 425.
- Postgate, J.R. and Campbell, L.L., 1966, Bacteriol. Rev., 30, 732.
- Postgate, J.R., 1968, in Inorganic sulphur chemistry, edited by Nickless, G., Elsevier, p259.
- Roy, A.B. and Trudinger, P.A., 1970, The Biochemistry of Inorganic Compounds of Sulphur, Cambridge University Press.
- Sadana, J.C. and Jagannathan, V., 1956, Biochim. Biophys. Acta. 19, 440.
- 下平三郎, 1970, 日本金属学会会報, 9, 135.
- Sorbo, B., 1957, Biochim. Biophys. Acta., 23, 412.
- St. Lorant, I., 1929, Z. Physiol. Chem., 185, 245.
- Suh, B. and Akagi, J.M., 1966, J. Bacteriol., 91, 2281.
- Suh, B. and Akagi, J.M., 1969, J. Bacteriol., 99, 210.
- Tamiya, N., Kondo, Y., Kameyama, T. and Akabori, S., 1955, J. Biochem., 42, 613.
- Tamiya, N., Yamaguchi, Y., Honya, M. and Yagi, T., 1966, Biochem. Biophys. Res. Commun., 22, 43.
- Urban, P.J., 1961, Z. Anal. Chem., 179, 422.
- Weber, K. and Osborn, M., 1969, J. Biol. Chem., 244, 4406.

- West, P.W. and Gaeke, G.C., 1956, Anal. Chem., 28, 1816.
- Willstatter, R., 1903, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 36, 1831.
- Yagi, T., Honya, M. and Tamiya, N., 1968, Biochim. Biophys. Acta.
153, 699.
- Yagi, T., 1970, J. Biochem., 68, 649.
- Yagi, Y. and Maruyama, K., 1971, Biochim. Biophys. Acta., 243, 214.