

Title	METHOD DEVELOPMENTS FOR STUDY OF BIOLOGICAL REDOX REACTIONS UTILISING FLOW SYSTEMS(Abstract_要旨)
Author(s)	Torimura, Masaki
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	1999-03-23
URL	http://hdl.handle.net/2433/181884
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

氏名	と 鳥	む ら	ま さ	き 基
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 1033 号			
学位授与の日付	平 成 11 年 3 月 23 日			
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当			
研究科・専攻	農 学 研 究 科 農 芸 化 学 専 攻			
学位論文題目	METHOD DEVELOPMENTS FOR STUDY OF BIOLOGICAL REDOX RE-ACTIONS UTILISING FLOW SYSTEMS (流れ系を利用した生体酸化還元反応の研究手法の開発) (主査)			
論文調査委員	教 授 池 田 篤 治 教 授 上 野 民 夫 教 授 加 藤 暢 夫			

論 文 内 容 の 要 旨

電気化学に基礎をおく酸化還元制御法は、生体酸化還元反応を簡便かつ高感度に解析するための新しい研究手法開発において、大きな可能性を持っている。この方法は、生体酸化還元反応の詳細な解析を可能にするのみならず、生物あるいは生体成分の新しい利用技術開発への展開をも期待させる。本論文は、基礎的アプローチとして、酸化還元反応の迅速な平衡化を実現するという視点からカラム電解法を採用し、溶液内生体酸化還元反応の直接的および間接的な電気化学的制御・解析技術の構築を目的とした。さらにこの技術を、微生物を対象とする研究にまで拡大し、細胞レベルでの酸化還元制御に基づく有用物質生産あるいは絶対定量分析へ応用することを検討した。また、微生物細胞にキャピラリー電気泳動法を適用し、細胞の表面状態分析および酸化還元活性測定に利用することを目的とした。いずれも流れ系の特徴を有効に利用することに主眼をおいた新しい研究手法の開発を目的としており、その主な成果は以下の通りである。

1. カラム電極を用いて試料の電解を行い、下流に設置した分光セルで電解試料の酸化還元状態をモニターする、という流れ系カラム電解分光法を構築した。本法をキノン系化合物に適用して、従来法に比べて酸化還元制御能の飛躍的な向上を確認するとともに、分光電気化学理論に立脚した多段階電子移動系の酸化還元平衡解析の手法を確立した。また、分子内に1つの補酵素と4つのヘムcを持つ酸化還元酵素であるアルコール脱水素酵素に本法を適用し、その直接電解によって、酵素が持つ5つの酸化還元電位の評価に成功した。一方で、より汎用性の高い、間接電解による方法の開発を目的として、酸化還元緩衝液を用いたフロー型間接カラム電解分光法を検討した。緩衝液成分は、タンパク質と電極間の迅速電子移動平衡を実現するための媒体、すなわちメディエータとして機能する。タンパク質とメディエータとの反応の速度論的考察によって、このような迅速平衡化を実現するための条件設定が出来ることを明らかにした。具体例として、この方法を、西洋ワザビエルキンダーゼの酸化還元反応の研究に適用し、本酵素の酸化還元特性評価に成功した。本法は、従来法に比べて、より迅速簡便な汎用性の高い手法であることが示された。

2. カラム電解法による細胞レベルでの酸化還元制御を実現し、効率よい物質変換システムを構築した。*Pseudomonas fluorescens* TN-5はニコチン酸 (NA) を6-ヒドロキシニコチン酸 (6-HNA) に水酸化する反応を触媒する。バッチ条件下で、この反応をメディエータを介して電極反応と共役させると、酸素を電子受容体とする本菌株本来の触媒反応よりも反応速度が顕著に増大することを見いだした。TN-5株の菌体を固定化したカラム電極に、NAとメディエータを含む緩衝液を送液することにより、NAは6-HNAに100%変換され、その速度は好気条件下で見られるTN-5株本来の変換速度の約10倍になることがわかった。本菌体固定化カラム電極は、NAのフローインジェクション分析にも応用出来ることを示した。本菌株の、メディエータとの反応が、酸素との反応速度よりも十分に大きくなるように条件設定を行うことにより、迅速なNAの絶対定量が可能となった。

3. 微生物細胞表面は一般に生理的pHで負電荷を有するため、微生物細胞を電氣的に泳動させることができ、その電気泳

動移動度は細胞の電荷、あるいは表面の柔らかさを反映する。種々の微生物をキャピラリー電気泳動にかけると、微生物の種類・状態・集合状態等により、その泳動挙動が異なることが観察された。泳動度に与える溶液イオン強度の影響を理論式に基づいて解析し、細胞表面の静電特性と堅さ柔らかさに関する情報が入手できることを示した。また、泳動相に色素と糖のような基質を混入しておく、微生物の代謝活性が色素の退色によって検出できることを見いだした。このようにして、キャピラリー電気泳動法が細胞の分離と生理学的キャラクタリゼーションを同時に達成できる有力な方法となることを示した。本法が簡便な細胞生死判定に利用できることも確認した。

論文審査の結果の要旨

生物におけるエネルギー変換、物質変換、代謝調節など多くの重要な生命現象には酸化還元反応が深く関わっている。したがって、生命現象の理解、制御、有効利用には、分子生物学、構造生物学の立場からのみならず、酸化還元反応の物理化学、分析化学の立場からの研究も大変重要である。本論文は、生体酸化還元反応をより定量的に理解し、利用するための新しい研究手法を開発することを目的としている。電気化学的、分光学的手法に流れ系の特徴を導入するという全く新しい方法を提示し、この方法が、分子レベルから細胞レベルにわたり、広く生体酸化還元反応に適用出来ることを示したもので、評価すべき点は以下の通りである。

1. 電解効率の高いカラム電解法に着目し、流れ系カラム電解分光法の構築、および本法が高い迅速酸化還元平衡化能を持つことの検証を行い、分光電気化学の理論に立脚した厳密なデータ解析法を確立した。本法を用いて、従来法では難しいとされていた酸化還元タンパク質の直接電解に成功し、酸化還元特性を評価した。さらに、フローインジェクションの手法と酸化還元緩衝液の導入によって、より汎用性のある間接電解法が可能であることを理論的に明らかにし、パーオキシダーゼを用いてその有用性を実証した。

2. カラム電解法を微生物の酸化還元反応制御にまで拡大し、細胞触媒反応の電気化学制御に基づく高効率物質変換系を構築した。カラム電解法による細胞レベルでの酸化還元制御を実現し、効率のよい物質変換システムを構築した。*Pseudomonas fluorescens* TN-5はニコチン酸 (NA) を6-ヒドロキシニコチン酸 (6-HNA) に水酸化する反応を触媒する。本菌株菌体を固定化したカラム電極に、NAとメディエータを含む緩衝液を送液することにより、NAは6-HNAに100%変換され、その速度は好気条件下で見られるTN-5株本来の変換速度の約10倍になることを示した。また、本菌体固定化カラム電極は、NAのフローインジェクション絶対定量分析にも応用出来ることを示した。

3. キャピラリーゾーン電気泳動法が微生物の細胞表面の電荷と柔らかさに関する評価に利用できること、細胞の酸化還元活性を測定できることを明らかにした。微生物細胞の分別定量ができるだけでなく、生死判別法にも利用できることを示した。

以上のように本論文は、流れ系の特徴を利用する生体酸化還元反応研究の新しい手法を開発したものであり、生物電気化学、生物分析化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成11年1月14日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。