

シトクロム c 自己還元過程の pH、緩衝剤、水素圧依存性

(熊大院自然¹・熊大理²・NASDA³) 市村憲司¹・○伊勢川美穂²・中原祐典¹・

井口洋夫³

1. 緒言：シトクロム c は触媒がなくても還元が進行する自己還元機構を持つことを明らかにしてきているが、pH および緩衝液の種類依存性、NaCl の影響ならびに水素圧依存性などを検討した。

2. 実験：ウマの心臓由来のシトクロム c 0.6 mg を pH4.01 としてフタル酸塩緩衝液、pH6.86 として中性リン酸塩緩衝液、pH9.18 としてほう酸塩緩衝液それぞれ 4ml に溶かし、油回転真空ポンプで脱気した後、1.5 気圧の水素を導入した。pH7-9 トリス系緩衝液についても、同様に調べた。シトクロム c の水溶液を調整した後、真空ポンプで脱気を行い 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30MPa の水素圧をかけた系、NaCl 濃度が 0.001, 0.005, 0.01M となるように、NaCl 水溶液とシトクロム c 水溶液を混合した後、脱気した系、NaCl 濃度が 0.001, 0.005, 0.01, 0.05M となるように、NaCl 水溶液とシトクロム c 水溶液を混合した後、空気中に放置した系の経時変化を調べた。シトクロム c の電子スペクトル変化を波長領域 200-700nm で測定した。

3. 結果及び考察：無機系緩衝液 pH4.01 ではスペクトルの変化がなく自己還元反応は起こらない。pH6.86 と 9.18 の場合のわずかながらスペクトルに変化が見られ、還元反応が起きている。しかし pH6.86 の緩衝溶液での自己還元率は小さく、水溶液とは違った自己還元挙動を示す。

pH	4	7	8	9
無機系	×	0.13	—	0.1
トリス系	—	0.22	1	0.22
蒸留水	—	1	—	—

速度定数は圧力および NaCl 濃度に依存しないが、還元率は影響を受けていることがわかる。これより溶存水素や NaCl は直接的に還元速度支配をしているというよりも、ヘム周辺のタンパク質を還元体のコンフォメーションに変化させると考えた方が妥当である。また、脱気したものでは濃度の増加に伴い還元率が大きくなっているのに対し、空気中ではその反対の挙動をとっていることがわかる。また 0.001M 同士を比較すると空気中還元率が上がっている。

水素圧依存性			脱気後の経時変化			空気中での揭示変化	
水素圧 (MPa)	速度定数 (day ⁻¹)	13 日後の還元率	NaCl 濃度 (M)	速度定数 (day ⁻¹)	13 日後の還元率	NaCl 濃度 (M)	還元率の最大値
0.05	0.12	0.31	0.001	0.21	0.27	0.001	0.64
0.1	0.15	0.35	0.005	0.22	0.35	0.005	0.42
0.15	0.14	0.39	0.01	0.20	0.44	0.01	0.23
0.2	0.14	0.29				0.05	0.23
0.25	0.11	0.30					
0.3	0.12	0.34					

以上の結果、シトクロム c の自己還元機構は、pH 依存性ならびに緩衝液依存性、および NaCl 濃度依存性などから、単なるネルンストの式に従わない。また、本研究で取り扱った pH 領域ではネイティブな可逆コンフォメーションをもつことが知られている。これらのことは、ヘム周辺の還元機構に pH 依存性ならびに緩衝液依存性、および NaCl 濃度依存性などがあることが示唆される。