

氏名(本籍)	中嶋博文(滋賀県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博士第408号		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位授与年月日	平成14年3月25日		
学位論文題目	Accurate Measurement of Near-micromolar Oxygen Concentrations in Aqueous Solutions Based on Enzymatic Extradiol Cleavage of 4-Chlorocatechol: Applications for Improved Low-Oxygen Experimental Systems and Quantitative Assessment of the Back Diffusion of Oxygen from the Atmosphere (4-クロロカテコールの酵素的エクストラジオール開裂に基づく水溶液のマイクロモル濃度前後の酵素濃度の正確な測定: 改良低酸素実験系と大気からの酸素の逆拡散の定量的評価への応用)		
	審査委員	主査 教授	安藤 喬 志
		副査 教授	大久保 岩 男
		副査 教授	佐伯 行 一

論文内容の要旨

【目的】

酸素分子は多くの重要な生化学反応の基質で、酸素を基質とする反応を触媒する酵素(酸化酵素や酸素添加酵素)の生理機能は細胞内酸素濃度の変動に直接影響される。哺乳動物組織の酸素濃度は $10-40\mu\text{M}$ で、低酸素条件にさらされると $0.1-5\mu\text{M}$ (マイクロモル濃度前後のレベル)に低下し、ミトコンドリアの呼吸鎖が低 O_2 濃度によって律速される。一方、嫌気性細菌の多くは低レベルの酸素に耐えられるように適応している。このため、生物は酸素レベルを特異的に検出し、関連する遺伝子の発現を制御していることが明らかになってきている。

しかし、 μM からサブ μM レベルの酸素濃度を正確に測定し制御することは難しく、簡単な方法の開発が求められている。そこで、本研究では、2原子酸素添加酵素であるカテコール2、3-ジオキシゲナーゼを用いた酸素濃度の高感度測定法を開発し、その応用として低酸素反応実験系を定量的に評価した。

【方法】

(1) *Pseudomonas putida* mt-2由来のカテコール2、3-ジオキシゲナーゼ(MPC)は、大腸菌で大量発現し、結晶化したものを用いた。*Cucurbita* sp.由来のアスコルビン酸酸化酵素(AO)は市販品をそのまま用いた。(2) 一群の3位および4位置換カテコールを系統的に調べ、反応生成物の安定性と可視部の分光学的性質を比較した。(3) ゴムセプタム付きアルミシール瓶に 0.5ml のヘッドスペースを残し密閉した 3.0ml の既知濃度カテコール液に、セプタムを通してMPCを加え、一定時間後に過剰量の4-クロロカテコールを加えた。トリクロロ酢酸でMPCを失活後、カテコールおよび4-クロロカテコールからのエクストラジオール開裂生成物、2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドと5-クロロ-2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド(CHMSA)、をBioAssist Qカラムを用いるHPLCで分別定量した。(4) テフロン付きシリコンセプタムで密閉できる分光セルの頭部に、その中にアルゴンガスを通気できる手製のシリコンキャップ付け、大気からセル内への酸素の拡散を防ぎ、サブ μM レベルの酸素濃度の実現と実測を検討した。(5) 酸素電極系全体を包む容器を作り、内部を連続的にアルゴンガス置換することで酸素の反応液への流入を抑え、MPC-カテコールまたはAO-アスコルビン酸で酸素濃度を数 μM レベルまで任意に変え、各酵素の酸素に対する K_m 値を求めた。

【結果】

(1) 4-クロロカテコールからの生成物の5-クロロ-2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド(CHMSA)は、380 nmに吸収極大を示す安定した吸収を示したが、他の生成物は時間オーダーの退色を示した。CHMSAは強酸・強アルカリ下でも安定で、pK値は5.4であった。(2) CHMSAはBioAssist Qカラムで未反応基質や2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド(カテコールからの生成物)と良く分離し、後者の約10倍の回収率で比較的鋭いピークとして溶出した。本方法で、50 μ l程度の試料中の10 nMレベルのCHMSAが定量できた。(3) セプタム付きのバイアルや分光セルで、容器内の水溶液酸素濃度が50 μ M未満では大気からの酸素の流入は速く(数 μ M/min)、セプタム周囲をアルゴン気流下に置くことでこの流入を十分の1以下に防げた。(4) 酸素電極系をアルゴン気流下に置き、MPC-カテコールまたはAO-アスコルビン酸で反応直前に酸素電極の出力を校正することで、数 μ M~数10 μ MレベルまでS-V曲線を得ることができた。MPCおよびAOの酸素に対するKm値はそれぞれ7.2、114 μ Mと求められた。

【考察】

(1) エクストラジオール型2原子酸素添加酵素であるMPCとその基質の4-クロロカテコールを用いて、溶液中の酸素分子を過剰量の4-クロロカテコールと反応させて等モル量の生成物CHMSAに変え、直接定量できることが分かった。CHMSAをHPLCで定量することで、原理的に50 μ l程度の試料で10 nMレベルの酸素濃度が絶対測定できる。これは、酸素電極の約100倍の感度である。(2) 反応液への試薬の簡単な出し入れを可能にしながら低酸素実験を実施するのは様々な工夫を要する。本研究の方法で大気から低酸素反応液への酸素の流入を直接定量でき、嫌気的実験系の改良に役立つ。実際、セプタム付き容器にアルゴンパージできるシリコンキャップを工夫するだけで0.7 μ Mレベルの低酸素を実現できた。(3) 装置全体をアルゴン気流下に置き、MPCやAOを用いてその場で校正することで、酸素電極を感度限界近くの数 μ Mまで利用できることが分かった。

【結語】

本研究の方法で、原理的には10 nMレベルの酸素濃度まで絶対測定できる。実際にサブ μ Mレベルの酸素濃度を測定するためには、試料の迅速で厳密な嫌気操作が必要で、今後嫌気操作の方法を改良・開発する必要がある。MPC-カテコール系を酸素電極と組み合わせて使い、数 μ M~数100 μ Mレベルで任意に酸素濃度を変えて実験できる。タグ付きのMPC発現させ、膜やゲルなどの様々な支持体に固定化することで、酸素濃度を連続測定する方法を計画中である。

論文審査の結果の要旨

酸素分子(O_2)は多くの生体内反応の基質であり、生体は O_2 濃度をモニターし、遺伝子の発現を制御している。 O_2 の生理機能解明には溶存 O_2 を低濃度まで精度よく測定することが不可欠であるが、簡単で精度の高い方法がなかった。

本研究は、カテコール2、3-ジオキシゲナーゼが触媒する4-クロロカテコールと O_2 との定量的な反応に着目し、 μ M以下の O_2 (ミトコンドリア中の O_2 濃度に相当)の絶対測定を初めて試みたものである。その結果、生成物の5-クロロ-2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドのHPLCによる定量分析により、10 nM O_2 という極めて低い濃度まで測定可能であることが明らかとなり、さらに気密反応容器への大気からの O_2 流入を定量的に評価し、それを制御する方法を確立した。

これらの成果は酸素分子の生理機能の解明に寄与し、種々の低酸素(嫌气的)実験系の開発・改良に応用できる。よって本論文は博士(医学)の学位論文に値するものである。