

Title	MOLECULAR PROPERTIES OF TWO REDOX PROTEINS IN LIVER MICROSOMIAL MEMBRANES
Author(s)	Tajima, Shoji
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/24595">http://hdl.handle.net/11094/24595</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名・(本籍)	田 嶋 正 二
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 4 2 1 3 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 3 月 25 日
学位授与の要件	理学研究科 生理学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	肝ミクロゾーム膜に存在する二種の酸化還元タンパク質の 分子特性
論文審査委員	(主査) 教 授 佐藤 了 (副査) 教 授 浜口 浩三 教 授 成田 耕造

### 論 文 内 容 の 要 旨

肝ミクロゾーム膜に存在する電子伝達成分タンパク質であるチトクロム $b_5$  ( $b_5$ ) および、フラビンタンパク質であるNADH-チトクロム $b_5$ 還元酵素 ( $fp_1$ ) は典型的な膜タンパク質である。この二つの分子はともに単一ペプチド鎖から成り、親水性の触媒領域の膜結合に関与する疎水性領域から成る両親媒性の分子であると考えられている。これら二つの分子を材料として両親媒性がタンパク質のどのような分子的特性によるものかを検討した。

$b_5$  を塩酸グアニジンにより変性させた所、その変性は二段階的に進行し、一段目はヘムの脱離を伴う親水性領域の変性に、そして二段目は疎水性領域の変性に対応した。以上のことから $b_5$ 分子は分子内に相互に独立な二領域(親水性および疎水性領域)構造を持つことを示した。 $b_5$ 分子をトリプシンで消化した所、非常に特異的に親水性領域と疎水性領域の連結部が切断された。これら断片をそれぞれわけて、蛋白化学的に各々を同定した後に、遠紫外円偏光二色性(CD)スペクトルを測定した所、親水性断片と疎水性断片のCDスペクトルの和がもとの $b_5$ 分子のそれと良く一致した。このことは $b_5$ 分子内の二つの領域がトリプシンによって切断された後も構造を保っていることを示し、二領域が相互に独立な構造を持つという先の結論を裏づけた。 $b_5$ をホスファチジルコリン(PC)リポゾームに埋めた時もトリプシンによる切断およびCDスペクトルについて同様の結果が得られ、膜中であっても $b_5$ 分子は相互に独立な二領域構造をもつことを示した。

$fp_1$ 分子について $b_5$ と同様、塩酸グアニジンによる変性実験を行った所、非イオン性界面活性剤の存在下で $fp_1$ 分子もやはり二段階的に変性する。一段目は失活およびFADの脱離を伴う親水性領域の変性に対応し、二段目は疎水性領域のそれに対応した。このことは $fp_1$ 分もまた相互にほぼ独立な二

領域構造を持つことを示している。

$b_5$  分子を PC リボゾームに埋めた時その親水性領域は小胞の外に突出していることが知られているが、疎水性領域の膜への結合様式は明らかではない。そこで、 $b_5$  疎水性領域は分子の C 末端に存在することがわかっているので、 $b_5$  を PC リボゾームに結合させてこの複合体小胞が高分子を透過させないことを確かめた上で、複合体をカルボキシペプチダーゼ Y (CPase Y) で処理して、C 末端のトポロジをしらべた。その結果小胞からアミノ酸の遊離が認められ、 $b_5$  分子は C 末端を膜小胞の外に突出して結合していることがわかった。また CPase Y 処理で  $b_5$  は膜小胞からはずれ、この遊離した  $b_5$  分子は膜への再結合能およびミセルの形成能を失っている。このことから膜と直接疎水性相互作用をしている部分の構造が一部明らかとなった。

### 論文の審査結果の要旨

チトクロム  $b_5$  (以下  $b_5$  という) および NADH-チトクロム  $b_5$  還元酵素 (以下  $fp_1$  という) はともに肝細胞などのマイクロゾーム膜に結合している典型的な膜タンパク質であり、いずれも均一に精製されている。両タンパク質とも触媒活性をもつ親水性部分と膜結合に参与する疎水性部分から成る両親媒性分子であり、その故に水溶液中ではミセルとして溶存する。

田嶋君はこれら 2 種の膜タンパク質が一般の水溶性タンパク質とどのように異なった構造上の特徴をもつか、またそれが膜と結合したときの状態はどのようなものであるかを調べ、次のような知見をあげた。

1)  $b_5$  およびそれをトリプシンで処理したときに得られるヘムを含む親水性断片の塩酸グアニジンによる変性挙動を詳細に調べることによって、 $b_5$  の親水性部分と疎水性部分は相互にほぼ独立な立体構造をもつこと、換言すればこの分子は触媒活性をになう領域と膜結合に参与する領域とから成る 2 領域構造をとっていることを明らかにした。

2)  $b_5$  が相互に独立な 2 領域構造をとっていることは、さらに  $b_5$  の遠紫外部における円偏光二色性の大きさが、 $b_5$  からトリプシン処理で得られる親水性および疎水性断片のその和にほぼ等しくなることから支持された。

3) 中性界面活性剤 Emulgen109P の存在下での  $fp_1$  の塩酸グアニジンによる変性挙動の研究から、 $b_5$  の場合と同じく、 $fp_1$  のフラビンを含む親水性部分と膜結合に参与する疎水性部分とは相互に独立な立体構造をとっていることを明らかにした。

4)  $b_5$  はレシチン小胞と接触させるとその膜に結合し、 $b_5$  の親水性領域は膜の外面に露出することが知られている。このとき疎水性領域 (分子のカルボキシ末端にある) のトポロジをカルボキシペプチダーゼ Y を用いてしらべた結果、疎水性領域のカルボキシ末端は再び小胞膜の外表面に露出していることを明らかにした。これらの知見は生体膜タンパク質の重要な分子特性を明らかにしたものであり、理学博士の学位に十分値するものと考えられる。