

Title	BINDING OF CYTOCHROME b5 TO BIOLOGICAL AND ARTIFICIAL MEMBRANES
Author(s)	Enomoto, Keiichi
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/2505
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	榎 本 恵 一
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 3 5 4 3 号
学位授与の日付	昭 和 51 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	チトクロム b_5 の生体膜および人工膜への結合
論文審査委員	(主査) 教 授 佐藤 了 (副査) 教 授 殿村 雄治 教 授 堀尾 武一

論 文 内 容 の 要 旨

チトクロム b_5 は肝ミクロゾーム膜に固く結合して存在する膜タンパク質で、分子量約1.7万の一本のポリペプチドとプロトヘムから構成されている分子である。ところがこれにトリプシンを作用させると分子量約1.1万のヘムを含み酵素活性をそのまま保持した親水性分子と分子量約0.5万の疎水性ペプチドに開裂する。本論文ではこれら二種のチトクロム b_5 分子を用いたチトクロム b_5 の膜タンパク質としての諸性質および種々の膜との相互作用についての研究結果を述べる。

1.チトクロム b_5 の肝ミクロゾーム膜への再結合。膜タンパク質は可溶性タンパク質と異なり、本来、膜と特別な相互作用を持つとの考えから上記二種のチトクロム b_5 をそれぞれミクロゾーム膜と混合保温したところチトクロム b_5 の完全分子はミクロゾームに容易に再結合するが断片分子は全く結合しないことが明らかとなった。この結合は静電結合や Ca^{2+} , Mg^{2+} を介した結合ではなく、膜の疎水性領域と完全分子に存在する疎水性ペプチドの相互作用によるものと考えられる。疎水性ペプチドを欠失する断片分子ではその結果膜への結合は起らない。また再結合したチトクロム b_5 は膜上で他の酵素と反応し、生理的な機能の発現もみられた。

2.チトクロム b_5 のヒト赤血球膜への非対称的結合。赤血球膜は肝ミクロゾーム膜と異なり、その成分として多量の糖、コレステロールを含み、またその膜の表裏は種々の成分の分布や性質について差異が認められている。そこで赤血球から調製したゴーストを用いチトクロム b_5 (完全分子) の結合性を調べたところ、ゴースト膜の内側(細胞質側)へは結合するが、外側への結合は見られなかった。膜の外側に局在するシアル酸や糖タンパク質を除去しても結合は起らず、膜の脂質にチトクロム b_5 の結合を阻害する原因があると考えられる。そこで赤血球膜に多量に含まれる脂質であるコレステロー

ルの効果をみるためレシチンから調製した人工膜へのチトクロム b_5 の結合を調べたところ、人工膜にコレステロールが含まれると結合が著しく阻害されることが判明した。以上の結果から赤血球膜では従来報告されている他の脂質成分のみならずコレステロールが膜の脂質二重層の外側に局在することが予想される。

3. チトクロム b_5 を含むレシチンリポソームの形成と融合。肝マイクロゾームをはじめ多くの生体膜は多様な膜タンパク質と脂質から構成されているため、この複雑さが膜の解析を困難にする場合が多い。そこで卵黄レシチンからリポソームと呼ぶ一枚の膜からなる膜小胞を調製し、それにチトクロム b_5 を結合させ、膜タンパク質を含むもっとも単純な人工膜を得た。この膜小胞はチトクロム b_5 を結合することによって他の膜小胞とすみやかに膜融合をおこすことを発見したが、その原因についてはまだ明らかでない。また一たん膜小胞に結合したチトクロム b_5 は外部から新たにチトクロム b_5 を加えることにより、添加されたチトクロム b_5 と交換反応をおこして膜から遊離する。これはチトクロム b_5 の膜への結合が可逆的な過程を含むことを示している。

論文の審査結果の要旨

チトクロム b_5 (以下 b_5 という) は小胞体 (マイクロゾーム) 膜に存在する典型的な膜の内在タンパク質であり、ヘムを含む親水領域と膜との結合に与る疎水領域とから成る両親媒性分子である。この両親媒性の故に精製した b_5 は水溶液中ではミセルとして存在する。

榎本君はウサギ肝マイクロゾームから均一に精製した b_5 の生体膜および卵黄レシチンリポゾーム膜への結合を詳細に研究し、次のような興味ある知見を得た。

1) b_5 を肝マイクロゾーム小胞と *in vitro* で混合すると、 b_5 は温度および時間依存的に小胞に結合する。この結合は飽和過程であり、飽和時にはもとのマイクロゾームの約7倍の b_5 含量を示す。このようにして結合した b_5 は高イオン強度やキレート剤によって膜から遊離せず、膜の非極性内部と b_5 分子の疎水領域との間の疎水的相互作用によって結合しているものと考えられる。なお結合した b_5 はマイクロゾームにもともと存在する NADH- b_5 還元酵素と正常に反応することができる。

2) b_5 はヒト赤血球の *unsealed* ゴーストには結合できるが、*resealed* ゴーストには結合しない。またヒト赤血球から調製した *inside-out* 小胞にはよく結合する。これらのことから、 b_5 は赤血球膜の外面には結合できず、内面にのみ結合しようと結論される。これは膜の外面に糖タンパク質の糖鎖が偏在しているためではなく、むしろゴースト膜の脂質2分子層の外層にコレステロールが偏在していることによることを示す証拠が得られた。

3) 卵黄レシチンの1枚膜リポゾーム (直径約250Å) と b_5 との結合をしらべた結果、この結合はランダムに起こるのではなく、まず b_5 によって殆んど飽和されたリポゾーム (b_5 とレシチンのモル比はほぼ1:10) が生じ、これが b_5 を含まないリポゾームあるいは b_5 で飽和されたリポゾームと順次融合して、段階的に密度の小さな (直径の大きな) 複合体がつくられてゆくことが明らかとなった。

以上のように、榎本君の論文はb₅という典型的な膜の内在タンパク質を用い、その脂質2分子層を含む各種の膜との結合の特質を明らかにしたものであり、生体膜の研究に大きな寄与をするものである。よって同君の論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認められる。