

Title	肝臓チトクロームb5の精製および結晶化と二, 三の性質について
Author(s)	梶原, 利政
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29125
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 14 】

氏名・(本籍)	梶原利政 かじ はら とし まさ
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1149 号
学位授与の日付	昭和 42 年 3 月 28 日
学位授与の要件	医学研究科生理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	肝臓チトクローム b_5 の精製および結晶化と二、三の性質 について
論文審査委員	(主査) 教授 萩原 文二 (副査) 教授 山野 俊雄 教授 次田 皓

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

Cytochrome b_5 は哺乳類の肝臓に極めて高濃度に含有されているヘム蛋白質で、腎臓、脾臓その他の分泌臓器にもある程度存在する。その生理作用はいまだ明らかでないが、これが形質内膜 (Endoplasmic reticulum) に存在し、NADH で容易に還元されることから、この膜内に存在する電子伝達系の一員とされ、この部位の重要な機能の一つである物質の能動輸送か、あるいはこの膜面で行なわれる水酸化反応と関係があると想像されている。

ネズミ、ウサギなどの肝臓における Cytochrome b_5 は Mitochondria 中の Cytochrome a, b, c, c_1 , などよりも含有量が多く、これらの呼吸系 Cytochrome と異なり肝炎などの肝疾患や Hepatoma のときに減少するのみでなく、ある種の薬剤や Hormone の投与によっても迅速かつ著るしく変動する成分である。したがってこの Cytochrome の含有量と動物の健康状態とは密接な関係があり、これが医療的な効果を持つ可能性も予想されている。また肝臓の Endoplasmic reticulum の生理機能を明らかにするためにも純化した Cytochrome b_5 の利用価値は高い。

Cytochrome b_5 の精製法としては P. Strittmatter (1956年) の方法が著名であるがこれは部分的な精製にすぎない。結晶化については I, Raw らの報告 (1959年) があるが、きわめて簡単な速報が出ただけですでに 7 年以上を経るが詳報がなく、その結晶標品についての性質がまったく不明である。また現在でもこの分野の研究者は Strittmatter の部分精製法を用いており、上記の方法で結晶化の追試に成功した例は見られない。これらのことから総合して上記の結晶化は誤りであるかまたは再現性がないものと思われる。したがって再現性のある Cytochrome b_5 の結晶化法を確立することがこの研究の目的である。

〔方法ならびに成績〕

材料はウサギ肝臓を使用した。1Kgの肝臓から常法にしたがって 0.25 M 蔗糖溶液中で Microsome を分離し、リン酸カリ緩衝液 (以下 K-P.B) 0.1 M pH 7.4 に分散し、蛋白量 2% の懸濁液をつくる。これに 0.005 mg/mg 蛋白の割合で結晶 Trypsin を加え一夜 0°C に放置すれば Cytochrome b_5 が可溶化される。この液に硫酸を加えて50%飽和として滷過し、この滷液にふたたび硫酸を加えて75%飽和として滷過する。この滷液を 20 mM K-P. B. pH 6.5 に対して透析する。これを同じ Buffer で平衡化した CM-Cellulose および Hydroxyl-apatite column を通せば Cytochrome b_5 は前者を素通りして後者に吸着される。これを洗滌溶離して 20mM K-P. B. pH 7.4 に調節し、同じ Buffer で平衡化した DEAE-Cellulose column にふたたび吸着させ、洗滌溶離させる。この Cytochrome b_5 溶液を 130 mM K-P.B. pH 7.4 に調節し、同じ Buffer で平衡化した DEAE-Sephadex column (4×30 cm) で完全クロマトを行なう。この時 Cytochrome b_5 は必ず充分分離した二つの Band に分れる。その Rf は 0.16 及び 0.09 であり、量比は約 7 : 1 である。大きい方の分画をとり 40 mM, K-P. B. pH 7.4 に調節し、同じ Buffer

Summary of Purification

Purification Step	Total Cyt. b_5 (mg)	Purity ($E_{556\text{red}}/E_{280}$)
Liver 1 Kg	—	—
Microsome 9.2 g	99.0	—
(NH ₄) ₂ SO ₄ 50%	63.1	0.021
" 75%	60.8	0.060
CM-cellulose	51.7	0.106
Hydroxyl-apatite	48.6	0.284
DEAE-cellulose	42.3	1.045
DEAE-Sephadex chromatography	29.2	1.30
Crystallization	27	1.36
Recrystallization	25	1.36

で平衡化した DEAE-Sephadex column で濃縮する。これを 500mM K-P. B. pH 7.4 で溶離すれば濃厚な Cytochrome b_5 溶液 (約 1%, 3ml) が得られる。これに固型硫酸を加えて 95% 飽和とし、Cytochrome b_5 を沈澱させ、少量の 0.1 M, K-P. B. pH 7.4 を用いて沈澱部分をわずかに混濁を残す程度に溶解し、0°C に放置すれば約 1 週間で結晶が析出する。これを 95% 飽和の硫酸溶液で洗滌し、結晶化をくり返せば約 3 日で再結晶させることができる。肝臓 1 Kg から約 25 mg の再結晶標品が得られる。上記精製過程の各 Step に於ける収量や純度を上の表に示す。

この再結晶した Cytochrome b_5 の溶液は NADH-cytochrome b_5 reductase の存在により NADH で還元される。なおこの再結晶した試料は超遠心分析および電気泳動的に均一であった。Fe 含有量より得られた最小分子量は 11600 である。

〔総括〕

ウサギの肝臓から Cytochrome b_5 を高収量に結晶化せしめる再現性のある方法を確立した。その要点は、Microsome の分離、結晶 Trypsin 処理による Cytochrome b_5 の抽出、CM-cellulose column による不純物の除去、Hydroxyl-apatite および DEAE-cellulose column への Cytochrome b_5 の吸着と洗滌溶出による精製、DEAE-Sephadex column による完全クロマト、DEAE-Sephadex column による濃縮、

硫酸塩析，硫酸溶液中よりの結晶化である。収量は Microsome 中の Cytochrome b_5 量の約25%で，肝臓 1 Kg 当り約 25 mg である。

結晶標品は超遠心分析及び電気泳動的に均一である。

論文の審査結果の要旨

チトクローム b_5 は哺乳類の肝臓に多量に含まれている電子伝達性のヘム蛋白質で生理的に興味ある物質である。したがってその精製法は古くより研究されて来たのではあるが，いまだ再現性のある結晶標品の調製法は確立されていなかった。本論文の研究ではマイクロソームよりのチトクローム b_5 の抽出に，単一の結晶蛋白分解酵素（トリプシン，又はナガーゼ）を用いるという新しい方法を取り，さらにイオン交換体による有効な精製法を検討して，これらを主体とする一連の操作を案出し，極めて再現性よく高収量にこのチトクローム b_5 を結晶化することに成功した。この結晶調製法は今後のチトクローム b_5 の物理化学的ならびに生理的な研究の発展に貢献するところが大きいと思われる。なお，すでにこの結晶標品を用いる研究によって，結晶状態と溶液状態とで吸収スペクトルに差があるというような極めて興味ある知見が得られている。