Osaka University Knowledge Archive

Title	ミクロゾームのヘムタンパク質P-450の物理化学的性質ならびにP-420への相互転換の機作に関する研究
Author(s)	市川, 佳幸
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29129
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 4 】

氏名・(本籍)	市川佳幸（いちかわよしゆき）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1139 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	**ミクロゾームのヘムタンパク質 P-450 の物理化学的性質ならびに P-420 への相互転換の機作に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 山野 俊雄 (副査) 教授 萩原 文二 教授 坂本 幸哉

論文内容の要旨

〔目　　的〕

1958年 Klingenberg および Garfinkel によりミクロゾームに CO 結合性の色素 (P-450) の存在が報告され，後に大村，佐藤らにより P-420 と呼ばれる b 型のヘムタンパク質が可溶化精製された。P-420 が P-450 から由来することは，すでに明らかであるが，しかし P-420 と P-450 とは ESR のシグナル，分光学的性質，生理的機能の点において大いに異なっている。著者はこの性質の差を詳細にしらべるとともに P-450 からP-420 への転換の機作を探求しようとした。

〔実験方法ならびに成績〕

ミクロゾームは各種動物の各臓器より Mitoma らの方法で調製した。分光測定は，Cary 14 recording spectrophotometer および split beam-spectrophotometer を使用した。電子スピン共鳴吸収測定は Varian 4,500 型に 100 KC 変調ユニットを使用した。チトクローム b_5 および P-450 の量は，Garfinkel, 大村らの方法を用いミクロゾーマル Fex の量は，標準試料 $CuSO_4$-EDTA と比較して計算された。アルキルイソシアニッドは，Ugi および Gautiér らの方法により合成した。

得られた結果はつぎのように列記できる。

1）P-450 とミクロゾマール Fex の量は各種動物の各臓器についても，生長過程時の増減においても，このヘムタンパク質の薬物誘導時においても，きわめて厳密な平行関係を認めた。しかもミクロゾームの全ヘム量は，チトクローム b_5 と P-450 で説明できる。それゆえ P-450 とミクロゾマール Fex は同一ヘムタンパク質によると考えられる。

2）P-450 は液体窒素温度において低スピン状態の特有なシグナルを示すが，イソシアニッド，OH イオン等を加えると，それぞれ特有の g 値を示す。P-450 の低スピン状態は，他のヘムタンパク質にくらべて巾がせまく P-450 のヘム鉄のリガンドの場が強いことがわかった。

3）P-450 の可視部還元型吸収は，555mμ および 450mμ にピークを示した。

4）P-450 は他のヘムタンパク質に比較して自動酸化性が極めて強く，CO 対 O_2 の分配係数を求めると pH 7.0–7.4 (25°) で30〜80を示し，しかも酸素圧と P-450-CO 結合物との関係は pH 依存性があり，pH7.5 以上では，2相性カーブを示すことから解離にともなう2種の型が考えられる。

5）ヘモグロビン，ミオグロビン等については，イソシアニッド類の結合の差とイソシアニッド類の構造の差を結びつけて steric hindrance 説が報告されているが，P-450 とイソシアニッド類の結合を検討すると，メチルー，エチルー，n- プロピルー，n- ブチルー，tert.- ブチルーイソシアニッドなどの還元型 P-450 への解離係数は $5.0 \sim 7.0 \times 10^{-6}$ M でありイソシアニッドの構造と解離係数との間には有意の差は認められなかった。上記のことから P-450 のヘム位置は，ほかのヘムタンパク質のごとく Crevice に埋もれてはいないものと考えられる。

いっぽう Hill の式から Sigmoid Coefficient, n, を求めると酸化型，還元型 P-450 について，ともに n=1.0 となり P-420 でも同様の結果を得た。

6）P-450 は各種タンパク質変性剤により P-420 に変化するが，その変化は疎水性基の増加につれて転換作用を高めた。またフエノール，アニリン等について，この有機溶媒のオクタノールと水との分配係数 π と P-450 の 50% を P-420 に変換する有機溶媒の濃度の間には，一定の関係が成立した。それゆえ P-450 の維持には，Hydrophobic な結合が関与しているものと考えられる。

7）P-450 はグリセリン，エチレングリコールにより安定化され25%グリセロールの存在のもとでは数週間，75%グリセロールの存在下では数ケ月，もとの状態を維持した。また中性コール酸で生じた P-420 は 20°C 以下ではグリセロールなどによって可逆的に P-450 にもどることが見出された。

〔総　　括〕

以上の実験結果よりつぎのことがいえる。

1．P-420 は一つの状態にあるとはいえず P-420 にはいくつかの状態のちがいが見出される。

2．P-450 ではヘム鉄が低スピン状態で存在する。

3．P-450 に関して分光的には 555 mμ, 450 mμ に還元型のピークが見出され，CO/O_2 の分配係数としては30–80 (pH 7.0–7.4) の値が求められた。

4．P-450 の状態の維持には Hydrophobic な結合がヘムとアポタンパク質の間に介在する。

5．P-450 はポリオールで安定化され，中性コール酸で生じた P-420 はポリオールにより可逆的に P-450 に回復することが見出された。

論文の審査結果の要旨

ミクロゾームのヘムたんぱく質 P-450 はミクロゾーム内にある状態と可溶化され精製された状態すなわち，P-420 とでは分光的磁気的性質の上で大きな差がみとめられる。P-450 の生理的機能としての水酸化反応機作を解明するために，P-450 から P-420 への転換機序を知ることは必然の研究方向である。本研究はとくにこの点をくわしく追求して以下の結論を得ている。

1）ミクロゾームの内で P-450 の分光的性質を維持するためには，ヘム周辺における hydrophobic な結合が重要であること，このことは，多くの試薬の疎水性をあらわす定数 π 値と P-450 の P-420 への転換作用の強度をあらわす $\log 1/c_{\frac{1}{2}}$ の間の一次関係から定量的にいえる。

2）P-450 の P-420 の転換は従来不可逆と考えられていたが，コール酸処理によって生じた P-420 はポリオール添加によって P-450 に復帰し得ることを見出した。

3）P-450 がポリオールによって，きわめて安定化される。

これらの発見は P-450 の生理機能と結びつく重要なものであり，また従来きわめて困難とされていた P-450 の精製純化の方法に関して新しい方法を提供するものであり，この方法の研究分野に貢献するところが大きいことが指摘できる。