OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	肝ミクロゾームのP-450の吸収スペクトル的性質
Author(s)	西林, 洋子
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29819
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【19】

氏名・(本籍)	西林洋子（にしばやしひろこ）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第1514号
学位授与の日付	昭和43年6月19日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**肝ミクロゾームのP-450の吸収スペクトル的性質**
論文審査委員	(主査) 教授 佐藤　了 (副査) 教授 奥貫一男　教授 萩原文二

論文内容の要旨

肝ミクロゾームにはチトクローム b_5 の他にP-450と呼ばれるヘム蛋白が存在し，種々の薬物の酸化的解毒反応やステロイド代謝に重要な役割を果していることが知られている。しかしながらこれらの反応の作用機構については，多くの研究者による生体あるいはミクロゾームレベルでの研究が数多くあるにかかわらず，分子レベルでの研究はまだほとんどなされていない。この反応におけるP-450の作用機構を分子レベルで解明するためにも，P-450の分子的性質を明らかにすることは重要なことである。肝ミクロゾームのP-450は膜に結合した蛋白であり，しかも膜から蛋白を可溶化するための種々の処理に対し異常に不安定で，容易に変性してP-420と呼ばれる形に変化する。このためP-450はまだこの形で可溶化も精製もなされていない。従ってこれまでのP-450の研究は主としてミクロゾーム懸濁液の差スペクトル的方法によっていた。差スペクトル法は有用ではあるが間接的方法であり，直接的な情報を得るためにはどうしても絶対吸収スペクトルをとる必要がある。しかもP-450は差スペクトル的に異常なヘム蛋白であるので異常性を更に詳細に知り原因を理解するためにも絶対吸収スペクタルをとることは重要と考えてこの研究を行った。

P-450が未変性の形では可溶化できないという前提に立つならば，この目的のための唯一の方法はミクロゾームに存在し，しかも強い吸収をもつことによってP-450の吸収スペクトルをとることを妨げているチトクローム b_5 を分離，除去することであった。検討した結果，フェノバルビタールで前処理し，P-450含量を高めたウサギ肝ミクロゾームを25%グリセロール存在下でNagarse (*Babillus subtilis* プロテアーゼ) で嫌気的に0°，15時間消化することにより約35%の蛋白とともにチトクローム b_5 とNADPHに特異的なフラビン酵素が可溶化され，ヘム蛋白としてP-450のみを含む粒子状標品を得ることに成功した。得られた標品はまだ膜に結合した状態であるが，濁りの影響は，過酸化水素で脱色した標品を対照として使うことにより克服し，P-450の絶対吸収スペクトルをとることに成功

した。P-450の酸化型のスペクトルは360，416，535，570 および 650 mμ に吸収極大をもち，典型的な低スピン型の *b* 型チトクロームと比較し特に異常な点は認められなかった。しかし還元型スペクトルは412と555 mμ に吸収極大を示し，プロトヘム化合物としてはきわめて異常であった。一般にヘム蛋白に結合することが知れている種々の配位子の酸化型および還元型P-450に対する影響を調べたところ，NaF, NaN_3 NH_3 のようなイオン結合性の強い配位子はP-450の吸収スペクトルを変化させることができず，KCN のような共有結合性の強い配位子とは結合することができた。配位子との親和性は親水性の配位子より親油性の配位子の方が強い傾向があったが，親油性の配位子はやや高濃度に使うとP-450のP-420への変性を促した。酸化型および還元型P-450とエチルイソシアナイドの間に異常な相互作用が存在することが，これまで差スペクトル的研究から報告されていたが，この点も絶対吸収スペクトルの測定によって確認することができた。

以上のような実験結果から，P-450は酸化型ではヘム鉄の第5，6配位座は相当共有結合性の形い配位子によって配位されていることが考えられる。酸化型と還元型とではヘム鉄に配位している第5，6配位子の少くとも一方は異るものである可能性が強く示唆され，酸化還元することにより蛋白，特にヘム近傍の構造が相当大きく変化している可能性が考えられた。差スペクトル的に見られた異常性はこのような酸化型と還元型との間の質的な相異に基因するものであり，主として還元型の異常性に負うところが大きい。P-450のヘム蛋白としてのスペクトル的異常性と，P-450の特異的な生理的機能との間に何か重要な関連のあることが推察されるが，このことは今後に残された興味ある問題である。

論文の審査結果の要旨

肝細胞ミクローム画分にはP-450とよばれるヘム蛋白質が存在し，ステロイドの酸化的代謝，脂肪酸の酸化，薬物の酸化的解毒反応などに重要な役割を果たしている。P-450はミクロゾーム膜に強固に結合しており，またこれを膜から可溶化するための種々の処理によって容易に変性するために現在までその精製は行なわれておらず，従ってその性質は主として膜に結合したままの状態で，差スペクトル法によってしらべられているにすぎなかった。差スペクトル法でしらべられた限りではP-450は，ヘム蛋白質としてきわめて異常な性質をもつことが指摘されているが，その性質をさらに詳細に知るためには，その絶対吸収スペクトルの測定が望まれた。しかしミクロゾーム膜にはチトクローム b_5 とよばれるもう一つのヘム蛋白質が高濃度に存在し，その吸収がP-450吸収測定を妨害するという困難な事情が存在する。

西林君は，高濃度のグリセロールがP-450の変性を防止するという事実に着目し，肝ミクロゾームを25%グリセロール存在下で枯草菌プロテアーゼで消化することによって，チトクローム b_5 を選択的に可溶化し，ヘム成分としては未変性のP-450のみを含むミクロゾームを得ることができた。得られた標品は濁ったけん濁液であるが，過酸化水素で脱色した標品を対照しし使うことによって濁りの影響を除去し，P-450の絶対吸収スペクトルの測定にはじめて成功した。その結果，酸化型のP-450は 650 mμ に弱い吸収帯をもつ点を除いて，低スピン型の典型的な *b* 型チトクローム特有のスペクト

ルを示し，特に異常な点は認められなかった。しかし還元型のスペクトルは412と555 mμ に吸収帯をもち，その形状は既知のプトロヘム化合物には見られない異常なものであった。また一般にヘム蛋白質に結合することが知られている 7 種の配位子の 影響を詳細にしらべた。 これらの 結果にもとずいて， P-450の異常な性質は主として還元型におけるヘムの配位状態の異常性に起因することおよび酸化還元に伴ないヘム近傍の構造に大きな変動があることを推定することができた。

以上のように，西林君の論文は従来困難であったP-450の絶対吸収スペクトルの測定法を開発し，この異常なヘム蛋白質の性状の研究に大きく貢献したものであり，14編の参考論文の内容と併せ考えて，理学博士の学位論文として十分の価値あるものと認める。