



Title	腎臓ミクロゾームの脂肪酸の ω 酸化酵素系に関する研究
Author(s)	市原, 宏介
Citation	大阪大学, 1971, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30467
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

氏名・(本籍)	いち 市	はら 原	こう 宏	すけ 介
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	2422	号	
学位授与の日付	昭和46年12月23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	腎臓ミクロゾームの脂肪酸の ω 酸化酵素系に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授	山村 雄一		
	(副査) 教授	坂本 幸哉	教授	山野 俊雄

論文内容の要旨

〔目的〕

脂肪酸の ω 酸化酵素系の本態および生理的意義を研究する目的で、ブタ腎臓皮質ミクロゾームから本酵素系を可溶化、精製し、その性状について研究した。

〔方法ならびに成績〕

(1) 脂肪酸 ω 酸化酵素系の可溶化。ラウリン酸の ω 酸化酵素系をブタ腎皮質ミクロゾームから最終濃度1.5%のTriton X-100を用いて可溶化した。他の表面活性剤は可溶化率および酵素の安定性の点でTriton X-100に劣る。

(2) 脂肪酸 ω 酸化酵素系の分画および精製。上述の方法で得た可溶化酵素を、Triton X-100 および安定化剤としてジチオスレイトールとエチレングリコールを含むトリス-塩酸緩衝液(pH7.9)で平衡化したDEAE-セルロースのカラムにのせ、素通りする画分、および0.15M KClを含む緩衝液で洗浄したのち0.5M KClを含む緩衝液で溶出される画分の2つに分けた。前者は更にDEAE-セルロースおよびセファデックスG-75のカラムにより精製を進め画分Ⅰとし、後者はDEAE-セルロースの再クロマトを行い画分Ⅱとした。画分Ⅰおよび画分Ⅱは各単独ではラウリン酸の ω 酸化活性を示さないが、両画分の存在下に ω 酸化活性が再構成された。画分ⅠのCO差スペクトルは452 m μ および418 m μ にpeakがあり、画分ⅡはNADPH-チトクロームC還元酵素活性をもつ。

(3) 画分Ⅱのフェレドキシン(Fd)およびフェレドキシン-NADP還元酵素(Fd-NADP red.)による代用。以前、筆者は*Pseudomonas denitrificans*による炭化水素の水酸化を研究し、本反応にはルブレドキシンおよびNADH-ルブレドキシン還元酵素が関与し、これらはホウレンソウのFdおよびFd-NADP red.により代用されることを認めた。腎の脂肪酸の ω 酸化反応においても、画分ⅡはFd およびFd-NADP red.によって完全に代用された。すなわちラウリン酸の ω 酸化が腎

の画分Ⅰおよびホウレンソウの非ヘム鉄タンパク質、Fdとフラビンタンパク質、Fd-NADP red.により再構成された。非ヘム鉄タンパク質としてFdの代わりに副腎のアドレノドキシシンあるいは細菌のルブレドキシシンでも部分的に活性がある。

(4) 画分Ⅰ、FdおよびFd-NADP red.による再構成系の性質。本酵素系は一酸化炭素により阻害される。ラウリン酸およびNADPHに対する K_m はおのおの $6.8\mu M$ および $0.25mM$ である。本酵素系は脂肪酸のうちカプリン酸、ラウリン酸およびミリスチン酸のいわゆる中級脂肪酸を活発に酸化するが、パルミチン酸はほとんど酸化しないし、アミノピリンも脱メチル化しない。

(5) Triton X-100の要求性。画分Ⅰをエーテル抽出すると活性は低下するが、これにエーテル抽出物を添加すると活性が回復した。この再活性化因子を同定するためにエーテル抽出物を薄層クロマトグラフィーにより4つの画分に分けると、そのうちの2つに活性があった。これらのスポットは同時に展開したTriton X-100の R_f と完全に一致し、しかもDittmer試薬で染色されず、従ってリン脂質を含まない。更にエーテル処理した画分Ⅰを含む酵素系はTriton X-100によって活性化されたが他の表面活性剤はむしろ阻害的であった。従って本酵素系ではTriton X-100が特異的な活性化因子である。

(6) 画分Ⅱ(腎)と肝の画分ⅡあるいはNADPH-チトクロームC還元酵素標品との関連性。ブタの肝ミクロゾームから腎とほぼ同様の方法で得た画分ⅠおよびⅡと、腎の画分ⅠおよびⅡを互に組み合わせをかって活性を測定すると、腎の画分Ⅰおよび肝の画分Ⅱの系では腎の画分ⅠおよびⅡの系以上の著明な活性が得られた。そこでラット肝ミクロゾームからJickらの方法を改良して電気泳動的にほぼ均一なNADPH-チトクロームC還元酵素標品を得て腎の画分Ⅰと組み合わせると、その両者でラウリン酸の ω 酸化活性が再構成された。とくに制限量の還元酵素標品を用いた場合、Fdによって著しい活性の促進が認められた。

〔総括〕

1. ブタの腎臓皮質ミクロゾームからTriton X-100を用いて中級脂肪酸の ω 酸化酵素系を可溶化し、さらに画分Ⅰおよび画分Ⅱに分画した。 ω 酸化には両画分が必要であり、画分Ⅰは一酸化炭素結合性ヘムタンパク質(チトクロームP-452)を含み、画分ⅡはNADPH-チトクロームC還元酵素活性を示す。

2. ホウレンソウより分離したフェレドキシシンおよびフェレドキシシン-NADP還元酵素は画分Ⅱに代わってラウリン酸の ω 酸化系を再構成することができる。アドレノドキシシンとルブレドキシシンも部分的ではあるが、フェレドキシシンに代わりうる。

3. ラット肝臓ミクロゾームから均一にまで精製したNADPH-チトクロームC還元酵素標品も画分Ⅱの代用をする。その量を制限すると、フェレドキシシンの添加により反応が著しく促進された。

4. 画分Ⅰをエーテル抽出すると、活性の低下がみられたが、Triton X-100の添加により完全に回復した。その他の表面活性剤および各種のリン脂質は活性化しなかった。

論文の審査結果の要旨

本研究は従来不明な点が多いとされていたマイクロゾームによる脂肪酸の ω 酸化の反応機構および生理的意義に関するもので、特にマイクロゾーム中の酵素系を可溶化し、その性状について詳細な検討を行った。

更に本研究は脂肪酸の ω 酸化の研究にとどまらずマイクロゾームの電子伝達系そのものの研究としても意義があり、マイクロゾームにおいて行われる薬物代謝酵素系の反応機構の解明の上で寄与するところが大きい。