

Title	副腎皮質ミトコンドリア水酸化酵素系成分の研究
Author(s)	須原, 克子
Citation	大阪大学, 1974, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31342
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

【10】

氏名・(本籍)	須原克子
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 3161 号
学位授与の日付	昭和 49 年 6 月 15 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	副腎皮質ミトコンドリア水酸化酵素系成分の研究
論文審査委員	(主査) 教授 佐藤 了
	(副査) 教授 堀尾 武一 教授 松原 央 助教授 中村 隆雄

論文内容の要旨

副腎皮質ミトコンドリアのステロイド水酸化酵素系の反応機構を解析する目的から、この電子伝達成分である NADPH・アドレノフェレドキシ還元酵素、アドレノフェレドキシ、チトクロム P-450 の三成分を副腎皮質の同じ出発物質から系統的に抽出精製する方法を確立した。

アドレノフェレドキシは、副腎皮質からしょ糖溶液を用いてミトコンドリアを単離する過程で容易に抽出され、DEAE・セルロースセファデックス G100で精製後硫酸法により結晶化された。結晶標品は、鉄いおうたんぱく質に特有の吸収スペクトルを示し、414nm と 276nm の吸収の比は 0.86 である。鉄およびいおうの含量はともに 150ng 原子/mg たんぱく質 (成分比は 1) の分析値が得られた。

アドレノフェレドキシを 4% 三塩化酢酸で処理すると、アポたんぱく質が得られる。この標品に 8M 尿素の共存下で、硫酸鉄と硫化ナトリウムを加えると 77% の好収量で、アドレノフェレドキシが再構成される。これを DEAE セルローズで処理した後、硫酸法により結晶化した。再構成標品は、吸収スペクトル、鉄およびいおうの分析値は、原標品と一致し、チトクロム c の還元反応 superoxide anion の生成反応による電子伝達能、II β -水酸化系における機能はもとの標品と同じ活性を示す。

NADPH・アドレノフェレドキシ還元酵素は、ミトコンドリアを音波処理して抽出し、硫酸分画、DEAE-セルロース、セファデックス G-100 により精製した。得られた標品は、電気泳動、超遠心でほぼ均一であり、273, 379, 450nm に吸収極大、475nm に肩をもつフラビンたんぱく質の吸収スペクトルを示す。酵素にふくまれるフラビンは、ペーパークロマトグラフィー、蛍光分析、アポ D-アミノ酸酵素の再活性化の実験により、FAD であることが決定された。フラビンの分析から求められるこの酵素の最小分子量は 55,000 であり、SDS で処理した標品のディスク電気泳動から得られる最小

分子量は50,000である。また、セファデックス G-100によるゲルろ過から求めた分子量は54,000であり、沈降定数 ($S_{20,w}$) と拡散定数 ($D_{20,w}$) から求めると58,000となる。このことからアドレノフェレドキシン還元酵素は、FAD 1分子を含む分子量約5万のモノマー酵素である。

チトクロム P-450は、ミトコンドリア画分からデオキシコルチコステロンの存在下でコール酸によって可溶化して後、アニリンを結合させたセファローズ 4 Bによるアフィニティークロマトグラフィー、アルミナ Cr ゲル処理によって精製すると、プロトヘム 1モルあたりのたんぱく質が80,000gの標品が得られる。この標品は、超遠心で均一であり、SDS処理後ディスク電気泳動にかけると、最小分子量50,000が得られた。精製標品は、394, 645nmに吸収極大540nmに肩をもつ吸収スペクトルを示し(高スピン型)、ジチオナイトで還元した後COを通すと、448, 550nmに吸収極大をもつCO結合型の吸収スペクトルになる。チトクロム P-420は、ほとんど含まれていない。精製標品を、本来の電子伝達系(NADPH, アドレノフェレドキシン還元酵素, アドレノフェレドキシン)と反応させると、416, 539, 570nmに吸収極大をもついわゆる低スピン型スペクトル(酸化型)に移行し、コレステロールの添加によって、再び、高スピン型の吸収スペクトルを示すようになる。

論文の審査結果の要旨

副腎皮質のミトコンドリアには、コレステロールからの皮質ホルモンの合成に関与するステロイド水酸化酵素系が存在し、この酵素系はNADPH-副腎フェレドキシン還元酵素(フラビン蛋白質)、副腎フェレドキシン(非ヘム蛋白質)、およびチトクロム P-450(ヘム蛋白質)の3成分から構成される。

須原君はこの酵素系の性質ならびに反応機作を解明する目的をもって、ウシ副腎皮質から上記3成分酵素を高収量で精製する方法を確立し、それらの性質を詳細に検討した。

まず副腎フェレドキシンを結晶化し、それが“不安定イオウ”を含む非ヘム鉄蛋白質であることを確認した後、それをトリクロール酢酸で処理することによってアポ蛋白質とした。次に、アポ蛋白質を2価鉄イオン、 Na_2S と2-メルカプトエタノールの存在下で処理することによって副腎フェレドキシンを再構成することに成功した。また、還元型フェレドキシンによるチトクロム c の還元は O_2^- イオンの生成によることを証明した。

副腎フェレドキシン還元酵素も均一状態にまで精製し、その分子量が約55,000であること、1モルあたり1モルのFADを含むこと、NADPHに依存した副腎フェレドキシンおよびインドフェノール系色素の還元を触媒することなどのことを明らかにした。

チトクロム P-450はまだ完全には精製されていないが、得られた標品は80,000gの蛋白質あたり1モルのプロトヘムを含み、純度60~70%と推定される。得られた標品は精製のときに添加した基質デオキシコルチコステロンとの結合物と思われ、高スピン型の吸収スペクトルを示すが、これにNADPH, 副腎フェレドキシン還元酵素, 副腎フェレドキシンを加えて結合している基質を代謝させると、典型

的な低スピン型ヘム蛋白質の吸収スペクトルを示すことを見いだした。

以上のように、須原君の業績は、着実な実験を積み重ねて、複雑な副腎皮質ミトコンドリアのステロイド水酸化酵素系の基礎的な知見を確立したものであり、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。