



Title	肝ミクロゾームNADPH-チトクロムc還元酵素の研究
Author(s)	佐竹, 晴彦
Citation	大阪大学, 1975, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31353
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

【6】

氏名・(本籍)	佐 竹 晴 彦
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 3 2 9 5 号
学位授与の日付	昭 和 50 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	肝ミクロゾーム NADPH-チトクロム <u>c</u> 還元酵素の研究
論文審査委員	(主査) 教 授 佐藤 了 (副査) 教 授 松原 央 助教授 中村 隆雄

論 文 内 容 の 要 旨

肝ミクロゾーム(Ms)の NADPH-チトクロムと還元酵素(fp₂)はトリプシン消化で可溶化, 精製されているが, このようにして得られた標品(t-fp₂)は部分的にプロテアーゼ分解を受けた断片である可能性があるので, 界面活性剤法により本来の fp₂分子を精製することを試みた。ウサギ肝 Ms から中性界面活性剤 Emulqen 911を用いて fp₂ を可溶化し, DEAE-セファデックス A-50, ヒドロキシアパタイトを用いて精製し, SDS-ゲル電気泳動的にほぼ均一な標品を得た。この標品(d-fp₂)は, FAD と FMN を酵素分子当り各一分子含むフラビン酵素で, 当量の NADPH 添加で, O₂-stable semiquinone を生成する。d-fp₂は, t-fp₂とは異なり, 精製した P-450とともに, 低濃度の界面活性剤の共存下で, 薬物水酸化活性を再構成する能力をもち, また界面活性剤を用いて精製したチトクロム b₅(d-b₅)との高い反応性を保持していた。d-fp₂をトリプシン処理すると, P-450及びd-b₅との反応性が消失し, 逆にチトクロム c 還元活性の上昇がみられた。

SDS 電気泳動で調べたところ,これに伴って分子量は9.0万からt-fp₂と同じ8.2万に移行した。d-fp₂は水溶液中で, 分子量約50万の会合体として存在するが, トリプシン処理によって, t-fp₂の単量体に変換する。d-fp₂と Ms を37℃で25分間反応させると, 添加した d-fp₂濃度に依存して d-fp₂の膜へのとり込みが見られる, NADPH-チトクロム c 活性からみると, 結合量は膜に既存のものの7倍にも達する。この結合によって Ms のアニリン水酸化活性は30~40%上昇する。この結合量は, 温度依存性で, 37℃で最も効率よく起る。d-fp₂をトリプシン処理すると, 生理的活性の消失とともに膜への結合性はなくなる。t-fp₂も同様に膜結合能はない。このd-fp₂は音波処理した赤血球膜にも結合する。Ms 膜に再結合したd-fp₂は高イオン強度の溶液で数回処理しても, 既存の fp₂と同様に膜から遊離し

ない。膜に再結合した $d\text{-fp}_2$ は "Intact" fp_2 と同様に、低濃度のトリプシンで、Ms 膜から容易に可溶化される。

これらの結果は、 $d\text{-fp}_2$ 分子表面の疎水域(分子量約8千)が P-450 との水酸化活性の再構成、 $d\text{-b}_5$ との反応性のような機能的な面および、膜への結合においても重要な役割を果たしていることを示すものである。このような性質は、膜酵素に広く見られる基本的な性質であると思われる。事実、榎本らと Strittmatter らは独立にチトクロム b_5 について、および三原らと Strittmatter らは NADH - チトクロム b_5 還元酵素について同様な現象を報告している。

論文の審査結果の要旨

肝ミクロゾームの NADPH-チトクロム c 還元酵素(以下 fp_2 と略記)はトリプシンによってミクロゾーム膜から可溶化され、高度に精製されているが、このようにして得られた標品($t\text{-fp}_2$ と呼ぶ)は、その本来の機能であるチトクロム P-450 (P-450 と略記) およびチトクロム b_5 (b_5 と略記) と反応する能力を失っていることから、本来の fp_2 分子が部分的にトリプシン分解を受けた断片であると考えられる。

佐竹君はこの点を明らかにするために、ウサギ肝ミクロゾームから中性界面活性剤を用いて fp_2 を可溶化し、これをほぼ均一にまで精製することに成功した。このようにして得られた標品($d\text{-fp}_2$ と呼ぶ)の性質を $t\text{-fp}_2$ のそれと比較検討した結果、次のような諸事実を明らかにすることができた。i) $d\text{-fp}_2$ も $t\text{-fp}_2$ も 1 分子中に FAD と FMN を 1 個ずつ含み、NADPH によるチトクロム c やフェリシアニドなどの人工電子受容体の還元を同様に触媒する。ii) $t\text{-fp}_2$ は上述のように、 b_5 および P-450 の還元を行なうことができないが、 $d\text{-fp}_2$ はリン脂質または低濃度の界面活性剤の存在下で b_5 および P-450 と反応することができる。iii) $t\text{-fp}_2$ は分子量約8万で水中に単分子分散するが、 $d\text{-fp}_2$ は分子量約9万で水溶液中では見かけの分子量約50万のミセルとして溶存する。iv) $d\text{-fp}_2$ はトリプシン処理によって分子量約1万に相当する部分を失って $t\text{-fp}_2$ に転換する。これらの事実から、 $d\text{-fp}_2$ が本来の分子であること、 $d\text{-fp}_2$ はフラビンを含む親水性領域($t\text{-fp}_2$ に相当する部分)と膜との結合あるいはミセル形成に関与する疎水性領域とから成る両親媒性タンパク質であることが推定された。

佐竹君はさらに $d\text{-fp}_2$ がミクロゾーム膜に *in vitro* で結合し、膜中の P-450 と正常に相互作用をなうこと ($t\text{-fp}_2$ にはこの結合能がない)、また $d\text{-fp}_2$ と均一にまで精製された P-450 とを低濃度の界面活性剤の存在下で混合すると、NADPH 依存性の薬物水酸化活性を再構成しうることを見だし、この再構成系の基礎的性質を明らかにした。

以上のように、佐竹君の業績は生体膜タンパク質の一つである fp_2 をその本来の形で精製し、膜タンパク質のモデルとしてその性質を明らかにしたものであり、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。