

Title	NADPH-アドレノドキシソ還元酵素の物理化学的性質
Author(s)	樋渡, 敦夫
Citation	大阪大学, 1976, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31563
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

【5】

氏名・(本籍)	樋 渡 敦 夫
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 3571 号
学位授与の日付	昭和51年3月25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	NADPH-アドレノドキシ還元酵素の物理化学的性質
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〕

副じん皮質ミトコンドリアにおけるステロイドの水酸化反応(ステロイド11 β 位水酸化反応及びコレステロール側鎖切断反応)は、NADPHを電子供与体とするチトクロームP-450酸化酵素系で行われている。この酵素系はミトコンドリア内膜に存在しているが、反応機構は不明な点が多い。したがって、チトクロームP-450酸化酵素系の1成分であるNADPH-アドレノドキシ還元酵素(Fp₃)を、ブタや牛の副じん皮質ミトコンドリアから精製結晶化し、この酵素の生理機能を解明するためFp₃の物理化学的性質を調べた。

〔方法ならびに成績〕

Fp₃はブタや牛の副じん皮質ミトコンドリアから DEAE cellulose や Sephadex G-100 のクロマトグラフィーを用いて精製結晶化した。分光測定には、Cary 17及び日立124型分光器を、蛍光測定には、日立204型蛍光光度計を用いた。等電点は Vesterberg, Svensson の方法で決定し、分析用超遠心による Fp₃ の偏比容及び分子量の決定には Edelstein, Schachman の方法を用いた。

得られた結果は列記すると次のようになる。

- (1) ブタ Fp₃ の分光の吸収スペクトルは272,377そして450nmに吸収極大を持ち、272 / 450の吸収比は8.2であった。牛 Fp₃ も同様であった。
- (2) ブタ Fp₃の分子量と偏比容は、超遠心法による結果からそれぞれ45,000, 0.72 (20℃) という値が得られた。またこの酵素は1分子当り1個のFADを持っていた。牛 Fp₃の分子量は53,000であった。

- (3) ブタ Fp₃は糖タンパク質でなかったが、牛 Fp₃は糖タンパク質で、マンノース・ガラクトース・グルコサミンなどを含んでいた。
- (4) ブタ Fp₃の可視部の円偏光二色性 (CD) 吸収スペクトルは負の吸収を示し、フラビン酵素のうち酸化酵素や脱水素酵素で知られている正の吸収とは異なっていた。牛 Fp₃でも同様の結果が得られた。
- (5) ブタ Fp₃の FAD の蛍光 (520nm) は、アドレノドキシシ (Ad) の添加により消光され、その時の結合 FAD の蛍光強度は加えた Ad の濃度に対して 2 相性のカーブとなり、この結合が Fp₃/Ad=1 であることを示した。また、Fp₃のトリプトファン残基の蛍光についても Ad との結合で消光が見られた。この場合も、FAD の蛍光に対応して消光カーブは 2 相性を示し、Fp₃と Ad の結合モル比 1 : 1 が得られた。
- 同様の結果が牛 Fp₃についても得られた。
- (6) ブタ Fp₃の等電点は 5.3 であり、Ad のそれは 4.1 であるが、両者の結合物は 4.6 の値を示した。牛の場合は、Fp₃は 5.4、Ad は 4.1 であり結合物は 4.7 であった。
- (7) ブタ Fp₃の活性は Diethylpyrocarbonate で可逆的に阻害され、Hydroxylamine の添加で部分的に活性の回復が見られた。この化学修飾は NADP⁺ の存在で阻止されたが、NAD⁺は無効であった。よって Fp₃の NADPH 結合部位のヒスチジン残基を修飾したのと考えられる。
- 牛 Fp₃でも同様の結果が得られた。
- (8) ブタ Fp₃の活性は、Ellman 試薬や p-クロル安息香酸第二水銀などの SH 剤によっても可逆的に阻害された。この化学修飾においても、NADP⁺は保護効果があった。
- 牛 Fp₃でも同様の結果が得られた。
- (9) ブタ Fp₃はメチレンブルー存在下に光照射 (1100erg/mm²/秒) を行うと、Fp₃の活性は 1 次反応で減少し、この際ヒスチジン残基が特異的に分解された。チロシンやトリプトファンなどの他のアミノ酸残基の量には変化がなかった。光酸化による Fp₃の活性の減少は NADP⁺や Ad の添加で阻止された。また光照射の前後で Fp₃の CD 吸収スペクトルには有意の差はなかった。
- 牛 Fp₃でも同様の結果が得られた。

[総括]

以上の実験結果より、次のことが言える。

- (1) ブタ及び牛の NADPH-アドレノドキシシ還元酵素 (Fp₃) は 1 分子の FAD を持つフラビン酵素である。ブタ Fp₃は分子量が 45,000 で牛 Fp₃は 53,000 であり、後者のみが糖タンパク質である。
- (2) 化学修飾や光酸化の結果より、1 個のヒスチジン残基と 1 個の SH 基が、ブタ及び牛の Fp₃の活性に必須である。
- (3) 蛍光実験の結果より、ブタ及び牛の Fp₃の Ad 結合部位近傍には、トリプトファン残基と FAD が存在するものと考えられる。

- (4) Fp_3 と Ad との Complex 形成物の等電点は、Ampholine 電気泳動の結果、 Fp_3 及び Ad の等電点とは異なっており、両者の結合が比較的強いことを示している。

論文の審査結果の要旨

副じん皮質ミトコンドリアには、ステロイド 11β 水酸化反応・コレステロール側鎖切断反応に関与するチトクローム P-450 系が知られている。著者は、この系に属する精製結晶化したフラビン酵素を用いて、NADPH 結合部位付近のヒスチジン・システイン残基の重要性を観察した。また、アドレノドキシンの相互作用すなわち、本酵素の結合フラビン・トリプトファン残基近傍でのアドレノドキシンの complex 形成を見出した。精製困難な膜系酵素である本酵素の精製結晶化およびその性質の探究とその成果は、生理的に重要な上記反応の機作解明に寄与することが大きいと信ぜられる。