The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	副腎皮質コレステロール側鎖切断反応に関与する電子伝達系成分の精製及びそれらの分子的特性についての研究
Author(s)	杉山, 俊博
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/31578
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

主論文

副腎皮質コレステロール側鎖切断反応に関与する電子伝達系成分の精製及びそれらの分子的特性についての研究

Purification and Molecular Characteristics of Components of Electron Transport System Specific for Cholesterol Side Chain Cleavage Activity from Adrenocortical Mitochondria

大阪大学医学部生化学第一教室
（主任　山野俊雄教授）

杉山俊博（Toshihiro Sugiyama）

12 1 20 - 20

〔緒　言〕

コレステロール側鎖切断反応は、種々のステロイドホルモン産出臓器に共通して見出されるもので、ステロイド生合成の律速段階をなす[1)2)]といわれる重要な反応である。この反応を触媒する酵素は、チトクロームP-450と呼ばれる，いわゆる一原子酸素添加酵素（monooxygenase）あるいは mixed-function oxidase であり、NADPH－アドレノドキシン還元酵素〔NADPH：adrenal ferredoxin oxidoreductase；EC 1.6.7.1.〕と、アドレノドキシン（adrenal ferredoxin）とともに、NADPHから分子状酸素に至る一連の電子伝達系を構成している[3)-8)]。これらはミトコンドリア内膜[9)]に局在しており、同じくNADPHは、Krebs回路よりマレイン酸やクエン酸の酸化により供給されているものと考えられる[10),11)]。

チトクロームP-450は、膜結合性タンパク質で精製が困難であったが、近年 Mitani Horie[12)] がコール酸ナトリウムによる可溶化に成功して以来、多くの研究室で精製を試みられ

てきた[13)~20)]。最近、Takemori ら[18)]が側鎖切断反応に関与するチトクローム P-450 を分離し、それをチトクローム P-450scc と名付けた。彼らによると、チトクローム P-450scc は、いわゆる"高スピン型"[21)22)]チトクロームで、これには基質であるコレステロールが結合している。一方、NADPH-アドレノドキシン還元酵素とアドレノドキシンは、ミトコンドリアから抽出されやすいことから、昔くから精製され、それらの性質も比較的詳しく検討されてきた[23)~34)]。これらの電子伝達系成を電子の流れに注目して配列すると、NADPH $\xrightarrow{2e}$ 還元酵素 $\xrightarrow{1e}$ アドレノドキシン $\xrightarrow{1e}$ チトクローム P-450scc $\xrightarrow{2e}$ O_2 となる。アドレノドキシンは、還元酵素とチトクローム P-450scc の間に位置しており、電子伝達機構から両者との複合体を形成することが予想される。事実、還元酵素とアドレノドキシンとの間には、低イオン強度下では、1:1の強固な複合体を形成することが、分光学的方法，ゲルロ過法，酵素

反応動力学的により[27]又、螢光測定法により[30),31)]証明されている。

そこで、この電子伝達系成分の配列と特性に注目し、アドレノドキシンを固定化することにより、他の二成分の単離・精製を行なった。さらに、それらの分子特性を明らかにして、コレステロール側鎖切断反応における重要性を論じた。

〔実験材料及び方法〕

I. 試薬

チトクローム C（タイプ III），結晶牛血清アルブミン，卵アルブミン，グルタミン酸脱水素酵素，α-キモトリプシノーゲン，2-6 ジクロロフェノールインドフェノール（DCPIP），デオキシコルチコステロン（DOC），コルチコステロン，酢酸プレグネノロン，20α-ヒドロコレステロールは Sigma 社より，Sephadex G-100，G-200 及び Sepharose 6B は Pharmacia 社より購入した。NADPH は，阪大蛋白研松尾氏より，また，コレステロール酸化酵素は小三内製薬より，それぞれ寄贈を受けた。又，シアン化臭素，Triton X-100 は和光製薬製を使用した。他の試薬類はすべて市販特級品を用いた。

II. 材料

1) 副腎皮質ミトコンドリアの調整

牛副腎は，大阪市食肉市場にて，屠殺後ただちに −20°C にて凍結した状態で入手した。4°C にて解凍を行ない，付着する脂肪や結合織を

取り除いたのち、ハサミで丁寧に皮質と髄質とを分離する。皮質は、メスあるいはハサミの片方を用いて、被膜よりはぎとる。以下の実験は、4°C以下で行なった。これを4倍量の0.25 M sucroseを加えたのち、ブレンダー（松下製MX-140S）で約2分間ホモゲナイズして、まず900×g 20分間遠心し、その上清をさらに10,000×g, 20分間遠心したその沈渣をミトコンドリア画分とした。

2）アドレノドキシンは、牛副腎皮質より精製結晶化した[25]。276nmと414nmとの吸光度比が0.78～0.8である標品を用いた。

Ⅲ. 定量法

1）酵素活性測定法：緩衝液はすべて50mMリン酸カリウムpH 7.4を用いた。NADPH－チトクロームC還元酵素活性は、1mlの測定系に10μMチトクロームC、20μMアドレノドキシン及び適当量のNADPH－アドレノドキシン還元酵素を加え、NADPHで反応を開始させ、チトクロームCの還元の増加を550nmの吸光度の増加で、分子吸光係数$18.5 \times 10^3 cm^{-1} M^{-1}$[35]

を用いて測定した。

NADPH－DCPIP還元酵素活性は、100μM NADPH，50μM DCPIP，適当量のNADPH－アドレノドキシン還元酵素を含む1.0mlの反応系を用い，NADPHの添加で反応を開始し，590nmのDCPIPの吸光度の減少で測定した。600nmのDCPIPの分子吸光係数は$21\times10^{3}cm^{-1}M^{-1}$を用いた[36]。

コレステロール側鎖切断活性及び11β－水酸化活性は，ガスクロマトグラフィー及び螢光法を用いて測定した[37]。測定系（2.0ml）の組成は、20μlイソプロピルアルコールに溶解した基質（20α－ヒドロコレステロールあるいはデオキシコレステロール）400nmoles，アドレノドキシン20nmoles，NADPH－アドレノドキシン還元酵素2nmoles，NADPH 1μmoles及びチトクローム P－450sccからなり、NADPHの添加で反応を開始した。37°Cでインキュベートした後、ただちに等量のジクロロメタンを反応液に加えて反応を停止するとともに、生成物

を有機層に抽出した。その有機層を乾燥して得られた残渣をガスクロマトグラフィー及び螢光法による分析に用いた。ガスクロマトグラフィー法では、内部標準として酢酸プレグネノロンを用いた。

2) その他の定量法

タンパク質の定量は、biuret 法[38]または、Lowry らの方法[39]を採用し、牛血清アルブミンを標準タンパクとして用いた。

チトクローム P-450scc の定量は、Omura らの方法[40]に従い、ジチオナイト還元による一酸化炭素差スペクトルから求めた。ただし、測定は、50mM リン酸カリウム pH 7.4 で行ない、あらかじめ両方のキュベットに 5μM アドレノドキシンが加えてある。

全ヘム含有量は、ピリジンヘモクロモーゲン法[41]により求めた。

アドレノドキシンは、414nm で 9.8×10^{3} $cm^{-1}M^{-1}$ [25] また、NADPH-アドレノドキシン還元酵素は 450nm で $11.3\times10^{3}cm^{-1}M^{-1}$ の分子吸光係

数を用いて濃度を決定した。

3) SDS－電気泳動法

試料の強度の検定及び分子量測定に、SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法[42]を用いた。試料は、まず0.1% SDS, 5% 2-mercapto-ethanolを含む10mMリン酸ナトリウムpH 7.0中で100°C約3分間熱処理をしたのち、10%アクリルアミドゲルを用いて泳動を行なった。タンパクの染色及び脱色は、上記の方法に従った。分子量測定に用いた標準タンパクは、馬心臓チトクローム(13,500), α－キモトリプシノーゲン(25,000), 卵アルブミン(43,000), グルタミン酸脱水素酵素(53,000), カタラーゼ(60,000)及び牛血清アルブミン(68,000)であった。それぞれの染色バンドを島津製Dual-wavelength TLC scanner CS-900を使用して、原点よりの距離を測定した。

IV. 機器測定法

1) 電子スピン共鳴測定法(EPR)

50mMリン酸カリウムpH 7.4及び0.1%

Triton X-100を含む50mMリン酸カリウムpH7.4に、チトクローム P-450sccが、それぞれ54μMずつ含まれるように調整した試料(0.3ml)を円筒形石英試料チューブ(内径2.5mm)内で凍結させ、Varian E12分光器(磁場変調周波数100KHz)を使用して、77°Kにて測定した。測定終了後、再び常温に戻して、可視部分光スペクトルを記録し、EPRと対応させた。

2) 分光スペクトルは、Union High-Sens Spectrophotometer SM-401, Spectral Data Processor SM-4012 を使用した。

3) ストップドフロー法は、Union Stopped-Flow Spectrophotometer SF-71 を用いて測定した。

4) ガスクロマトグラフィーは Shimadzu Gas Chromatograph GC-5A を使用した。

〔結果〕

I. アドレノドキシン－アフィニティカラムの作成

粒子のそろったセファロース6Bを30ml（静置体積）に対して3.0gのシアン化臭素を添加して、20°Cで活性化した[43]。ガラスフィルター上で2.0lの冷えた0.1M炭酸ナトリウム，pH 8.0ですばやく洗滌したのち、再びこのゲルを0.1M炭酸ナトリウム30mlにサスペンドし、さらにアドレノドキシンを40mg加えて、5°Cでゆっくり撹拌すると、20時間すれば、アドレノドキシンは完全にセファロース上に固定化され、上清は無色になり、もはやタンパクは検出されなかった。次いで、再びガラスフィルター上でゲルを洗滌し、1.0Mグリシンを含む0.1M炭酸ナトリウム，pH8.0にサスペンドして5°Cで4時間反応を行なう。もし過剰のリガンドが存在すれば、グリシンで遮蔽されたことになる。最後に、次のような組成の緩衝液200mlで過剰なグリシンやタンパク

を洗滌した：0.1M炭酸ナトリウム，pH 8.0＋1.0M 塩化ナトリウム；0.1M 酢酸ナトリウム，pH 4.1＋1.0M塩化ナトリウム；0.1M 炭酸ナトリウム，pH 8.0；0.1M 酢酸ナトリウム，pH 4.1；0.1M リン酸カリウム，pH 7.4。0.05M リン酸カリウム，pH 7.4＋0.6M 塩化ナトリウム中で保存した。このようにして調整したアドレノドキシンアフィニティカラム(2×10cm)は、4°C で保存すれば，少なくとも1年間は安定な状態で保存でき、くり返し使用が可能であった。

II. NADPH-アドレノドキシン還元酵素の精製と性質

ミトコンドリア画分を、0.1 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)にタンパク濃度が約20 mg/mlになるようにサスペンドし，ブレンダーで8分間ホモゲナイズして、ミトコンドリアを破壊した。このミトコンドリアホモゲナイトをbarrel rotorを装着した日立55P超遠心機を用

コクヨ 20×20

い 54,000×g，90分間遠心を行なったところ、赤褐色の上清と、黄褐色の沈渣（ミトコンドリア破片膜）を得た。前者を30－60%飽和硫安分画し、その沈渣を、0.07M NaCl を含む10mM リン酸緩衝液で充分に透析を行ない、この透析液を10,000×g，20分間遠心して、透析中に生じた不溶性タンパク質を除いた。このようにして得られた粗酵素標品を、次に、あらかじめ上記透析外液と同じ組成をもつ緩衝液で平衡化してあったアドレノドキシン－アフィニティカラム（2×10cm）に注ぎ、同緩衝液で十分洗滌して、280nm の吸光度が0.05以下になったことを確認したのち、0.4M NaCl を含む10mM リン酸緩衝液で溶出を行なった。450nm の吸光度が0.1以上の画分を集め、これに55%飽和硫安の沈渣をさらに0.2M KCl を含む10mM リン酸緩衝液中で透析し、引き続いて Sephadex G-100（1.5×40cm）で精製を行なった。void volume より少し遅れたところにピークをもつ黄色の画分が得う

れ、これをやはり硫安55%飽和で濃縮し、この沈渣を最小量の10mM緩衝液で溶解させ、かすかに混濁した状態で0℃中に保存しておくと、数日以内に結晶が出現した。

表1 表1に本酵素の精製過程を示した。アドレノドキシン－アフィニティクロマトグラフィの一操作で、比活性は約30倍上昇し、60%という高収率で精製することができた。本酵素は、粗抽出液より計算すると24%の収率で、200倍純化したことになる。この結果、はじめて結晶化に成功した。

図1 図1はその結晶写真を示したもので、顕微鏡下で観察すると、六角板状の黄色の結晶でロゼッタを形成している。本酵素はSDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で、単一タンパクであり、NADPH－チトクロームC還元酵素活性は、22μmoles/min/mgタンパクという値を得た。

図2 図2は、結晶NADPH－アドレノドキシン還元酵素の分光吸収スペクトルを示したものである。273，378及び450nmに吸収のピーク

をもち、475と420 nm に吸収の肩を有する。

本酵素を80%メチルアルコールで処理してその抽出物を薄層クロマトグラフィーにて同定すると、市販のFADと一致した。FADの分子吸光係数を11.3×10^3 $cm^{-1}M^{-1}$として本酵素の分子量を計算すると、FAD 1分子あたり54,300であった。これは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で求めた54000という値とよく一致している。

Ⅲ. チトクローム P-450 scc の精製と性質

ミトコンドリア破片膜をタンパク濃度が、20 mg/ml になるように、10mM リン酸緩衝液にサスペンドし、これに等量の 2%(W/V) Triton X-100 10%(W/V) polyethylene glycol (#6,000) を含む 10mM リン酸緩衝液を除々に加えた。4°C で 60分間ゆっくり撹拌して、55,000g 90分間超遠心を行なったところ，赤褐色の上清を得た。このようにして得られた上清画分(Triton-Extract)を、あらかじめ10mM リン酸緩衝液で平衡化

してあったアドレノドキシン－アフィニティカラム（2×10cm）に直接負荷した。カラムをまず最初に200mlの0.1％Triton X-100，1mM EDTAを含む10mMリン酸緩衝液で洗浄し，次いで10mMリン酸緩衝液でさらにカラムを洗浄したのち，0.6M NaClを含む50mMリン酸緩衝液で溶出を行なった。赤褐色～黄褐色を呈する画分のうち，吸光度比（275nm/394nm）が2～2.5の画分を集めて，45％飽和になるように硫安を加え，10,000×g，15分間遠心してその沈渣を0.6M NaClを含む50mMリン酸緩衝液中で透析した。不溶性タンパク質を遠心で除いたのち，同緩衝液の条件下でSephadex G-200カラム（1.5×100cm）を用いて，ゲル口過を行なった。この条件下では，4トクロームP-450sccは少なくとも3つのピークを与え，それぞれ，20万，40万，80万以上に相当する分子量をもつ画分であった。このうち，20万に相当する画分が最も純度が高く，この画分を集め，45％飽和硫安で濃縮したのち，少量

の50mMリン酸緩衝液を加えて凍結存在下で氷片中に保存した。このように保存すれば、少なくとも1カ月は安定な状態で保存できる。実験に使用する標品は、これをさらに目的とする緩衝液中で遠心したものを用いた。

牛副腎ミトコンドリア破片膜をTritonX-100を用いて可溶化し、アドレノドキシン-アフィニティクロマトグラフィ及びSephadex G-200ゲルロ過法により、図3に示されたように、

図3 電気泳動的に純一なタンパクとして精製できた。回収率及び純化度は、ミトコンドリア破片膜を基準にして計算すると、それぞれ9%、30倍という値を得た。従来報告されている方法よりも操作が非常に簡便であることや、高収率であることから、有効な精製方法であることがわかった。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分子量を求めたところ、約54,000であったが、一方P-450あたりの分子量は93,000という値を得た。即ちサブユニット2個あたりヘムが1個含まれている

ことになる。[15] 本標品の側鎖切断活性は、20α-ヒドロコレステロールを基質にした時、チトクロームP-450$_{scc}$ 1モル、1分間あたり5モルのプレグネノロンが生成した。しかしデオキシコルチコステロンを基質にした時、11β-水酸化反応の生成物であるコルチコステロンや18-ヒドロデオキシコルチコステロンはガスクロマトグラフィーでは検出されなかったことから、本標品は、側鎖切断反応に特異的であると考えられる。

図4 図4に、チトクロームP450$_{scc}$の分光スペクトルを示した。275, 394, 650 nmに、それぞれピークを、534, 570 nmに肩をもつ、いわゆる"高スピン型"チトクロームP-450$_{scc}$で、本標品は基質(コレステロール)を、P-450$_{scc}$ 1モル当たり約0.8-0.6モル含有していることがわかった。

このような"高スピン型"標品にコレステロール酸化酵素を添加すると、"高スピン型"から"低スピン型"スペクトルに変換した。さらに、

NADPH・NADPH－アドレノドキシン還元酵素及びアドレノドキシンを加えた再構成系では、数秒以内に、この"高スピン型"から"低スピン型"スペクトルへの変換が起こることを確認した。"高スピン型"チトクローム P-450$_{scc}$ に Triton X-100 などの表面活性剤，有機溶媒やアルコール類を添加すると、やはり"低スピン型"チトクローム P-450$_{scc}$ に変換した[20]。図5は、"高スピン型"標品に Triton X-100 を添加していった時のスペクトル変化を示した。394 nm の吸光度の減少とともに、418 nm の増大が観察された。それらは、407 の isosbestic point を通ることから、Triton X-100 によって、"高スピン型"から"低スピン型"チトクロームに変換したことを示している。Triton X-100 の最終濃度が 0.1% 以上の時，418 及び 394 nm の吸光度は、それぞれ最大値及び最小値を与えた。そこで、二つの波長での最大変化量に対する割合を Triton X-100 濃度に対して、プロットした（図6）。どちらの曲線も、S字状カーブ

図5

図6

を示しており、臨界ミセル濃度[44]の近傍で最も変化が大きくなっている。これらの結果からTriton X-100によるスペクトルの変換は、チトクローム P-450$_{sc}$とTriton X-100とミセルを形成することに関係していることを示唆する。

さらに、本標品に対するTriton X-100の影響をEPR分光法によって検討した。図7に、チトクローム P-450$_{sc}$に0.1% Triton X-100を加えた時のEPRシグナルの変化を示してある。図からわかるように、Triton X-100を添加することによって、g=2.42のシグナルの減少と、それに対応してg=2.38のシグナルが増加してきている。さらにg=1.91のシグナルがg=1.92に少し低磁場側へ移動している。言いかえればg=2.42, 2.23, 1.91という1組のEPR吸収帯がTriton X-100の添加により狭小化したため、g=2.38, 2.23, 1.92という新たな1組のシグナルが出現したと考えられる。このようなEPRシグナルの変化は、基質20α-ヒドロコレステロールとP-450が結合する場合でも見られる[14]。

図7

IV. 電子伝達系成分相互間の複合体形成について

NADPH－アドレノドキシン還元酵素及びチトクローム P-450scc それぞれは、精製の項ですでに述べたように、アドレノドキシン－アフィニティカラムに特異的に吸着されるという実験事実から、これらの二成分は、アドレノドキシンとそれぞれ複合体を形成するであろうと予測できる。そこで、上記の方法で精製した標品を用いて、電子伝達系成分間の複合体形成を検討した。

i) チトクローム P-450scc の分子特性に対するアドレノドキシンの影響

チトクローム P-450scc は、高イオン強度下では、Sephadex G-200 ゲルロ過の結果から、少なくとも、分子量が 20万, 40万, 80万 という3種類の会合状態をとっているものと考えられるが、一方低イオン強度下では、凝集して、さらに巨大な集合体となることがわかった。図8は、本標品を、非常に希薄な水溶液（1mM

リン酸カリウム pH 7.4)中でインキュベーションした時の変化を示したものである。アドレノドキシンが存在しない時、540nmの吸光度の増大がみられ、その変化は、二相性を示している(図8(1))。第二の相は、少なくとも200分までは直線的に増加している。一方、アドレノドキシンが存在すると、図8(2)に示すように、コントロール(図8(3))に比して、やや吸光度の増大がみられるが、それ以上の変化は200分までみられなかった。これは、アドレノドキシンが、まずチトクロームP-450と結合してしまったために、チトクロームP-450間の凝集が抑制されるのだろうと考えられる。これを積極的に証明するために、150分間インキュベーションした、凝集の進行している標品に、アドレノドキシンを添加してみた。すると、ほぼ30分以内に、図8(2)のレベルまで吸光度が減少した。以上の結果から、これら二つの成分間の結合の方が、チトクロームP-450間の結合より強力であるように思われる。低

イオン強度下では、両者はかなり強固な複合体を形成しているものと考えられる。

ii) チトクローム P-450 の還元速度に対するアドレノドキシンの影響

既に述べたように、精製したチトクローム P-450 標品に対するジチオナイトによる還元速度は非常に遅く、in vitro での側鎖切断活性にみられる代謝回転 (turover number) を説明することは不可能である。それ故に、アドレノドキシンを介するところの電子伝達系によるチトクローム P-450 還元の方が、ジチオナイトに比べて、かなり速いことが予想される。そこで、以下の実験を行った。

表

図9

図 9-a〜c は一酸化炭素を飽和した 50mM リン酸カリウム pH 7.4 中で、図中に示した反応系で還元した時の差スペクトルを経時的にトレースしたものである。ジチオナイトによる還元を行なうと、非常にゆっくりしており、全部還元するのに 30分以上かかる (図 9-c)。あらかじめ反応系にアドレノドキシンを添加して

やはり、同じジチオナイトによる還元でも、図9-bのように、数分以内に全還元してしまった。再構成系(図9-a)では、ほとんど1分以内に反応が完了してしまい、これから速度定数を求めることは不可能だった。そこで、ストップドフロー法により、これらの系でのチトクロームP-450の還元速度定数を求めた(表2)。本来の電子伝達系による(系(1))還元の速度が、ジチオナイト(系(3))のそれに比べて約250倍大きいことがわかった。ジチオナイト+アドレノドキシンの系(2)の還元は、$3.5\times10^{-2}sec^{-1}$と$7.4\times10^{-3}sec^{-1}$という2つの値が求まった。前者は、ジチオナイト単独(系(3))の約9倍ほど大きいことより、これは、アドレノドキシンの促進効果であると思われるが、詳細は、目下検討中である。

iii) ゲルロ過法による複合体形成の証明

Chu & Kimura[27]は、低イオン強度下において、ゲルロ過を行うことによって、NADPH-アドレノドキシン還元酵素とアドレノドキシンの二つ

の成分が複合体として存在していることを明らかにした。しかし、チトクローム P-450$_{scc}$ とこの二成分との複合体は形成されなかったと報告している。

そこで、精製した2標品とアドレノドキシンとの複合体形成をゲルロ過法を用いて検討した。過剰量のアドレノドキシンとチトクローム P-450$_{scc}$ 及び NADPH-アドレノドキシン還元酵素が共存した試料 0.5ml を 10mM リン酸カリウム pH 7.4 中で十分透析したのち、同緩衝液で平衡化してあった Biogel P-200 に負荷した。図10 はその溶出曲線パターンで、3つのタンパクのピークがみられる。それぞれのピークの成分を実験方法に記した方法で同定したところ、最初のピーク(29-35画分)は、チトクローム P-450$_{scc}$ とアドレノドキシン、2番目のピーク(40-44)は NADPH-アドレノドキシン還元酵素とアドレノドキシン、そして最後のピーク(55-60画分)は、アドレノドキシンであった。これらの結果から、少なくとも、二組の複合体が形成されることを証明できた。

図10

〔考　察〕

アドレノドキシンの固定化カラムにより、他の二成分が能率よく高収率で精製できた。本法による精製の特徴は、アドレノドキシン自身のもつ、特異的認識能を利用した点にあり、従来のイオン交換樹脂等による精製[2)~17)]やアニリン[18)]やω-アミノオクチル[19)]などのどちらかと言えば疎水性的性質を利用したアフィニティクロマトグラフィーとは明らかに異なる。アドレノドキシンの認識能は、かなり特異的で、牛血清アルブミン、ヘモグロビンやフラビン酵素であるD-アミノ酸酸化酵素などは、吸着されない[45)]。ところが、植物のフェノドキシン[46)]を含む電子伝達系成分の1つであるフェノドキシン-NADP還元酵素[47)]と固定化アドレノドキシンとは、複合体を形成し、逆に、NADPH-アドレノドキシン還元酵素は、固定化フェレドキシンとも複合体をつくる[48)]。これらの事は、アドレノドキシンとフェレドキシンとは、ともに鉄イオウタンパク質に属し、タンパク

構造的にも、電子伝達系内の役割の類似性からも、当然予想されることであるが、しかし、動物と植物という大きな形態的な相異があるのにもかかわらず、相互に複合体を形成する事は非常に興味がもたれる。電子伝達機構の解明によい材料を提供するものと思われる。

精製したチトクローム P-450scc は、"高スピン型"スペクトルを与え、従来の報告と一致した。[14),18)] この標品に、コレステロール酸化酵素、あるいは再構成系成分を加えてコレステロールを除いてやると、Takemori ら[18)] がすでに観察したように、418, 539 および 570 nm にピークを示す"低スピン型"スペクトルに変換した。これらのスペクトルの変化は Pseudomonas putida から精製されたチトクローム P-450 cam が基質であるカンファーの有無で、"高スピン型"と"低スピン型"のスペクトルを示す[49),50)] のに対応している。さらに、肝ミクロゾームからも、これら二種のスペクトルを示すチトクローム P-450 が精製されている[51)] が、

"高スピン型" チトクロームP-450に基質が結合しているかどうか明らかでない。

ところが、図5に示したTriton X-100による"低スピン型"スペクトルへの変換メカニズムは、上記に述べたところの、いわゆる"低スピン型"スペクトルと異なるように思われる。なぜなら、もしTriton X-100がチトクロームP-450 sccに結合していたコレステロールを完全に排除することが可能であるとすれば、すでに精製の段階でコレステロールは、チトクロームP-450 sccから除かれているはずであり、精製した標品にコレステロールが結合しているという事実と矛盾する。チトクロームP-450に種々のリガンドあるいは基質を結合させた時の分光スペクトルとESRスペクトルの対応が研究されている。[12),14),50)] ところが、図7のEPRの結果からは、0.1% Triton X-100の添加にもかかわらず、EPR的には、低スピン領域のシグナルの増大がみられなかった。図6の結果は、牛血清アルブミン[52)]あるいは、チト

クロームb5の疎水部分[44]に、表面活性剤が結合する様式と類似している。これらのことから、Triton X-100がチトクローム P-450sccと結合することにより、ヘム近傍の電子状態に変化をもたらし、その結果、"低スピン"スペクトルに変換したものと思われる。可視部、近紫外の吸収スペクトルに関係するものは、主としてヘムのポリフィリン部分のπ電子系であるが、EPRや磁化率等に関係するものは、主としてFeに束縛されているd電子系である[53]から、Triton X-100は、ポリフィリンの構造により強く影響を与えていることを示唆する。

本論文において、二組の複合体形成を証明した。そして、複合体を形成することにより、電子伝達系成分間の電子の受授が効率よく起こることを明らかにした。また、NADPH-アドレノドキシン還元酵素とアドレノドキシン複合体が熱変性[27]光酸化[32]に抵抗するという報告や、上記の凝集阻害がみられるという結果

コクヨ 20×20

などから、酵素の立体構造を安定な状態に保持するために、相互間の複合体形成が役立っていると思われる。実際の副腎ミトコンドリア内の各成分の含有量は、チトクロームP-450とアドレノドキシンとはほぼ1:1の比で存在している[54]。従って、ステロイド水酸化反応が効率よく行なわれるためには、やはり、in vivoでも何らかの複合体形成がおこなわれているのではないかと考えられる。ステロイド生合成の調節機構を研究するためには、今後、チトクロームP-450の存在比や、さらに、NADPH－アドレノドキシン還元酵素を含めた電子伝達系成分相互の存在状態を検討することが必要であろうと考える。

〔総括〕

1) アドレノドキシンをセファロース6Bに固定化して、安定なアドレノドキシン－アフィニティカラムを作成した。このカラムを用いて NADPH－アドレノドキシン還元酵素及びチトクロームP-450$_{scc}$を簡便に、かつ収率よく精製できた。さらに前者は、はじめて結晶化に成功した。

2) チトクロームP-450$_{scc}$の分子特性としての分光的、磁気的、物理化学的性質が明らかにした。

3) 電子伝達系成分間の複合体形成能についてゲルロ過、還元速度、分子の解離集合などの実験結果より、NADPH－アドレノドキシン還元酵素－アドレノドキシンおよびアドレノドキシン－チトクロームP-450$_{scc}$という二組の複合体形成を証明した。

稿を終えるにあたり、終始懇切な御指導と御鞭達下さいました山野俊雄教授に深く感謝の意を表します。また本研究について御協力をいただきました三浦洌博士をはじめ第一生化学教室の各位に深謝いたします。

コクヨ 20×20

文献 1

1) Stone,D.and Hechter,O.(1954) Arch.Biochem.Biophy.51,457-469

2) Koritz,S.B.and Kumar,A.M.(1970) J.Biol.Chem.245,152-159

3) Simpson,E.R.and Boyd,G.S.(1967) Eur.J.Biochem.2,275-285

4) Young,D.G.and Hall,P.F.(1968) Biochem.Biophy.Res.Commun. 31,925-

5) Young,D.G.and Hall,P.F.(1969) Biochemistry,8,2987-2997

6)Cheng,S.C. and Harding,B.W.(1973) J.Biol.Chem.248,7263-7271

7) Wilson,L.D.and Harding,B.W.(1970) Biochemistry 9,1621-

8) Ichii,S.,Omata,S.,and Kobayashi,S.(1967) Biochim.Biophys. Acta,139,308

9) Yago,N.and Ichii,S.(1969) J.Biochem.65,215-224

10)Harding,B.W.and Nelson,D.H.(1966)J.Biol.Chem.241,2212-2219

11)Cammer,W.and Estabrook,R.W.(1967)Arch.Biochem.Biophys. 122,721-734

12)Mitani,F.and Horie,S.(1969)J.Biochem.65,269-280

13)Jefcoate,C.R.,Hume,R.,and Boyd,G.S.(1970)FEBS Lett.9,41-44

14)Ando,N.and Horie,S.(1972)J.Biochem.72,583

15)Shikita,M.,and Hall,P.(1973) J.Biol.Chem.248,5598-5604

16)Ramseyer,J.,and Harding,B.W.(1973)Biochim.Biophys.Acta 315,306-316

17)Horie,S.,and Watanabe,T.(1975)J.Steroid Biochem.6,401-409

18)Takemori,S.,Suhara,K.,Hashimoto,S.,Hashimoto,M.,Sato,H., Gomi,T.,and Katagiri,M.,(1975)Biochem.Biophys.Res.Commun. 63,588-593

19)Wang,H-P.,and Kimura,T.,(1976)J.Biol.Chem.251,6068-6074

20)Sugiyama,T.,Miura,R.,and Yamano,T.(1976)in"Iron and Copper Proteins"p.290-302 ed.by Kerry ,T.,Yasunobu,T., Mower,H.F.,Hayaishi,O. Plenum Publishing Co. New York

21)Simpson,E.R.,Jefcoate,C.R.,Brownie A.C.and Boyd G.S.(1972) Eur.J.Biochem.28,442-450

22)Jefcoate,C.R.,Simpson,E.R. and Boyd,S.(1974)Eur.J.Biochem. 42,539-551

23)Suzuki,K.,and Kimura,T.(1965)Biochem.Biophys.Res.Commun. 19,340

24)Omura,T.,Sanders,E.,Estabrook,R.W.,Cooper,D.Y.,and Rosenthal,O.(1966)Arch.Biochem.Biophys.117,660-673

25)Suhara,K.,Takemori,S.,and Katagiri,M.(1972)Biochim.Biophys. Acta,263,272-278

26)Chu,J.W.,and Kimura,T.(1973)J.Biol.Chem.248,2089-2094

27)Chu,J.W.,and Kimura,T.(1973)J.Biol.Chem.248,5183-5187

28)Foster,R.P.,and Wilson,L.D.(1975)Biochemistry14,1477-1484

29)Sugiyama,T.,and Yamano,T.(1975)FEBS Lett.52,145-148

30)Taniguchi,T.,and Kimura,T.(1976)Biochemistry 15,2849-2853

31)Hiwatashi,A.,Ichikawa,Y.,Maruya,N.,Yamano,T.,and Aki,K.
(1976)Biochemistry 14,3082-3090

32)Hiwatashi,A.,Ichikawa,Y.,Yamano,T.,and Maruya,N.(1976)
Biochemistry 14,3091-3096

33)Lambeth,J.D.,and Kamin,H.(1976)J.Biol.Chem.251,4299-4306

34)Lambeth,J.D.,McCaslin,D.R.,and Kamin,H.(1976)J.Biol.Chem.
251,7545-7550

35)Margoliash,E.(1954)Biochem.J.56,535-543

36)Steyn-Parvé,E.P.,and Beinert,H.(1958)J.Biol.Chem.233,843-
852

37)Mattingly,d.(1962)J.Clin.Path.15,374-379

38)Gornall,A.G.,Bardawill,C.J.,and David,M.M.(1949)J.Biol.Chem.
177,751-760

39)Lowry,O.,Rosebrough,N.J.,Farr,A.L.,and Randall,R.J.,
(1951)J.Biol.Chem.193,265-275

文献 4

40)Omura,T.,and Sato,R.(1964)J.Biol.Chem.239,2370-2378

41)Paul,K.G.,Theorell,h.,and Åkeson,Å.(1953)Acta Chem.Scand. 7,1284-1287

42)Weber,K.,and Osborn,M.(1969)J.Biol.Chem.224,4406-4412

43)Axén,R.,and Ernback,S.,(1971)Eur.J.Biochem.18,351-360

44)Robinson,N.C.,and Tanford,C.T.(1975)Biochemistry 14, 369-378

45)杉山俊博・山野俊雄・新勝光 (1975) 生化学 47 512

46)Tagawa,K.,and Arnon,D.I.(1962)Nature(london)195,537-543

47)Shin,M.,Tagawa,K.,and Arnon,D.I.(1963)Biochem.Z.338,84

48)杉山俊博・三浦測・山野俊雄・新勝光・押野礼子・井田正二 (1976) 生化学 48 409

49)Kayagiri,M.,Ganguli,B.N.,and Gunsalus,I.C.(1968) J.Biol.Chem.243,3543-3546

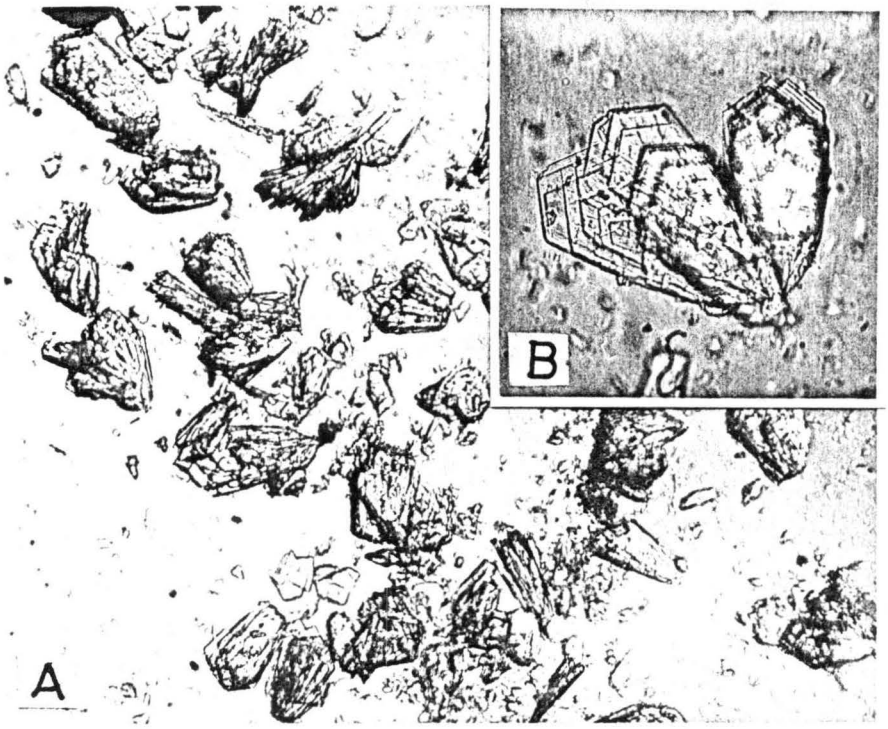
50)Peterson,J.A.(1971)Arch.Biochem.Biophys.144,678-693

51)Haugen,D.A.,andCoon,M.J.(1976)j.Biol.Chem.251,7929-7939

52)Makino,S.,Reynolds,J.A.,and Tanford,C.(1973)J.Biol.Chem. 248,4926-4932

53)小谷正雄 (1965) 量子生物学II (生物理学講座 9.8) p.115-156 吉岡書店

54)Purvis,J.L.,CanickJ.A.,Mason,J.I.,Estabrook,R.W.and McCarthy,J.L.(1973)Ann.New York Acad.Sci.212,319-343


A
B

12 2

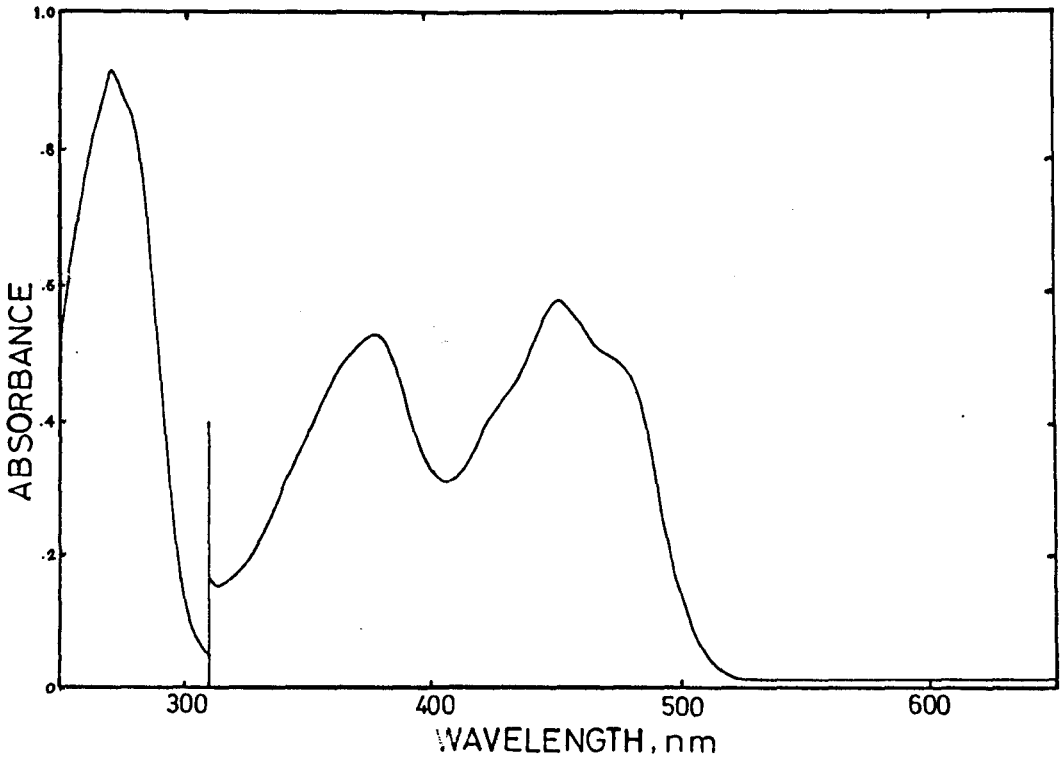


図 3

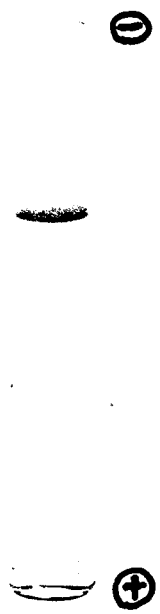


図 4

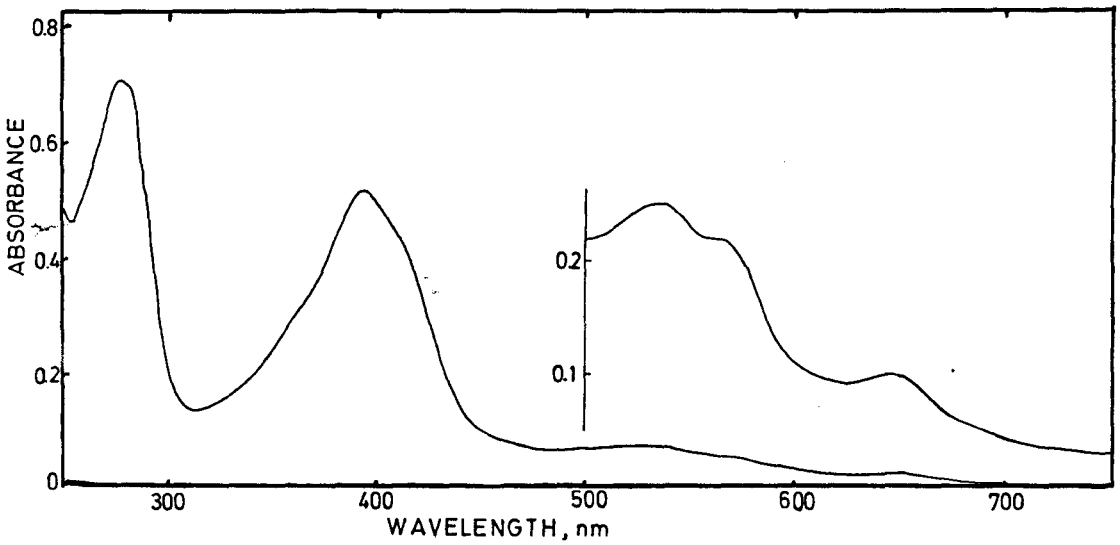

0.8
0.6
0.4
0.2
0
ABSORBANCE
0.2
0.1
300
400
500
600
700
WAVELENGTH, nm

図5

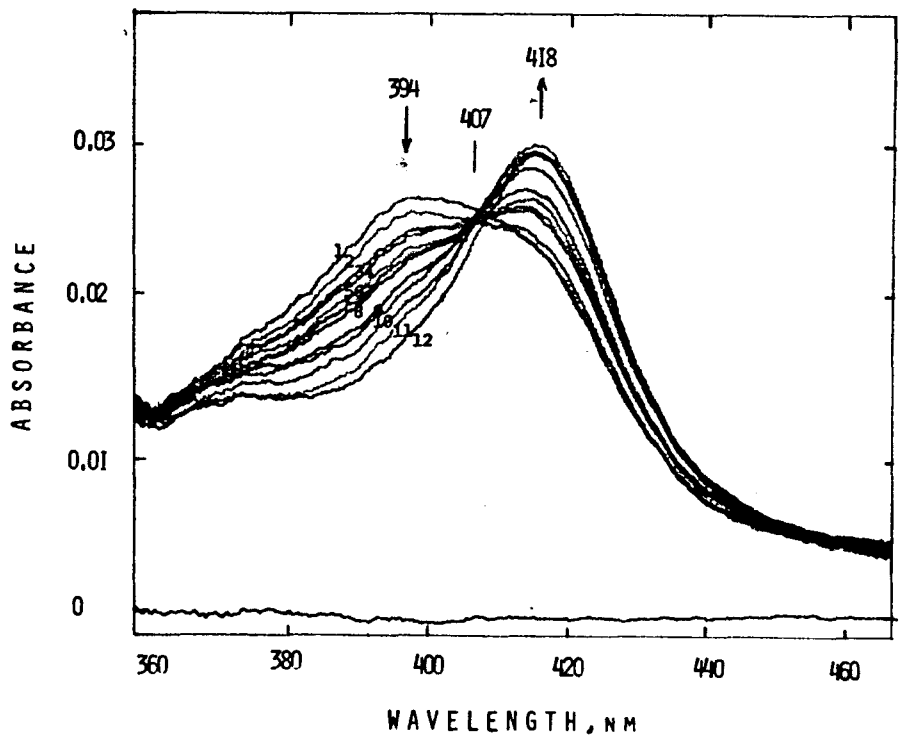

394
407
418
0.03
0.02
0.01
0
ABSORBANCE
360
380
400
420
440
460
WAVELENGTH, NM

図 6

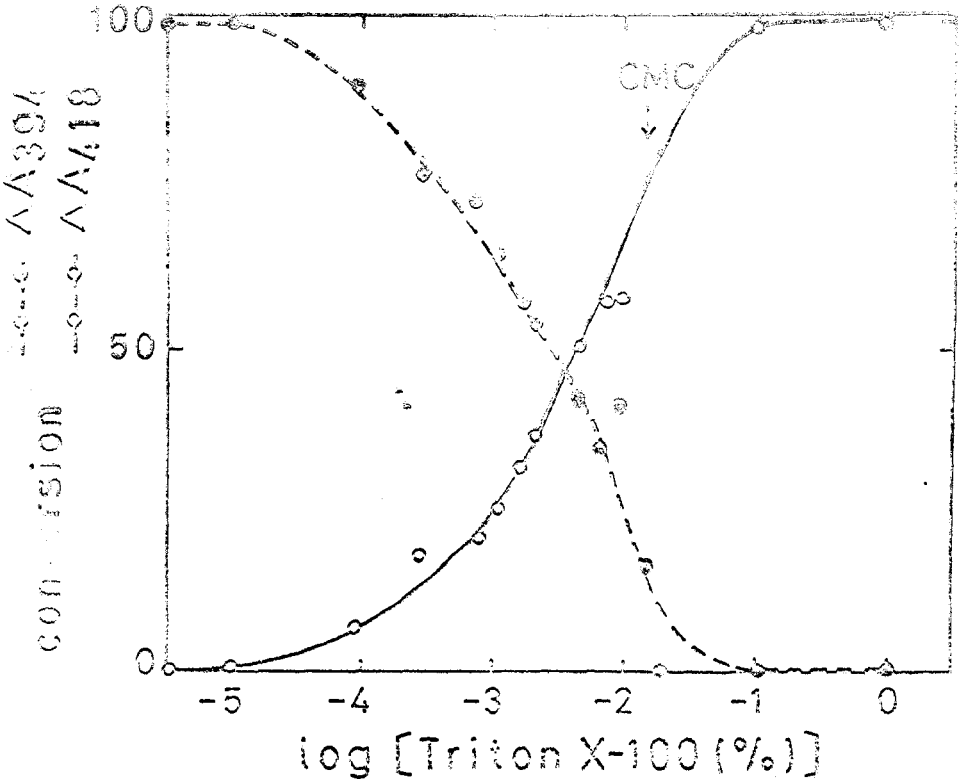


図7

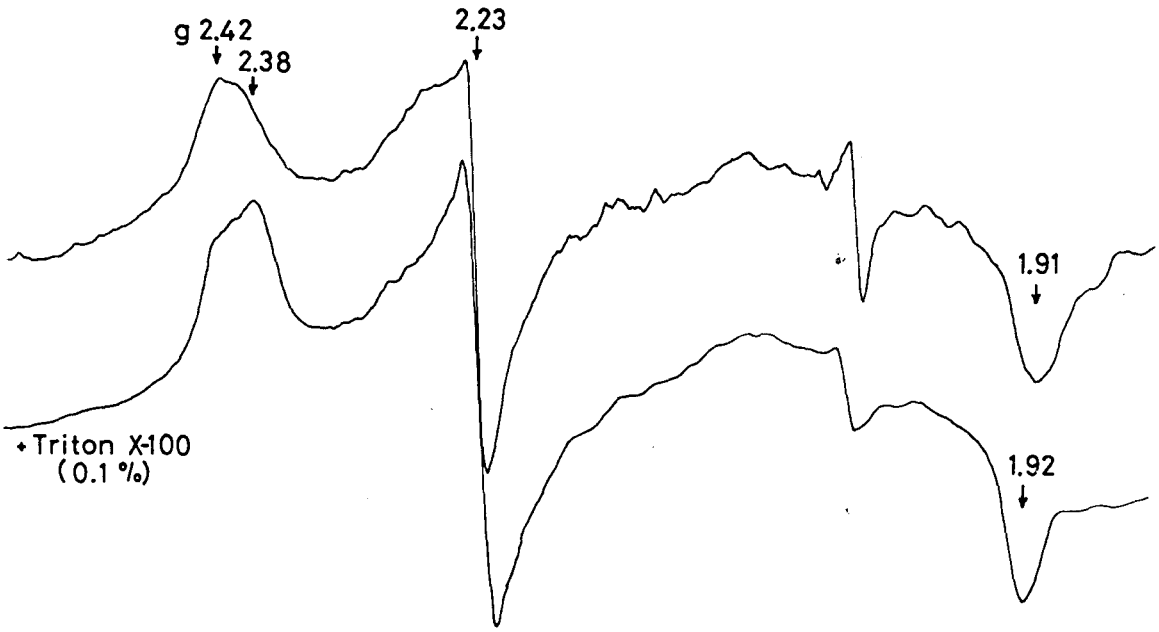


図8

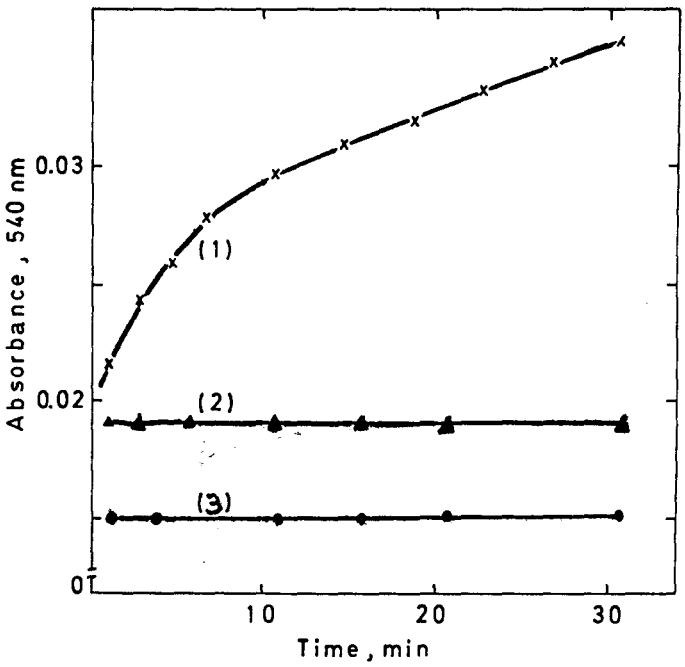


図 9

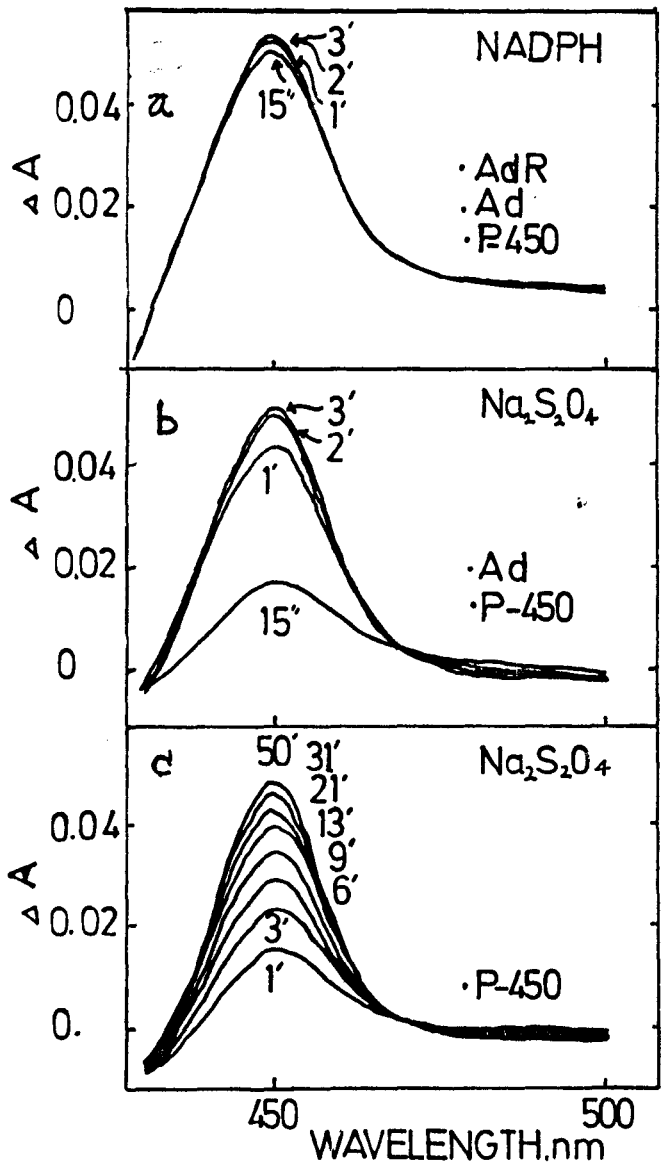
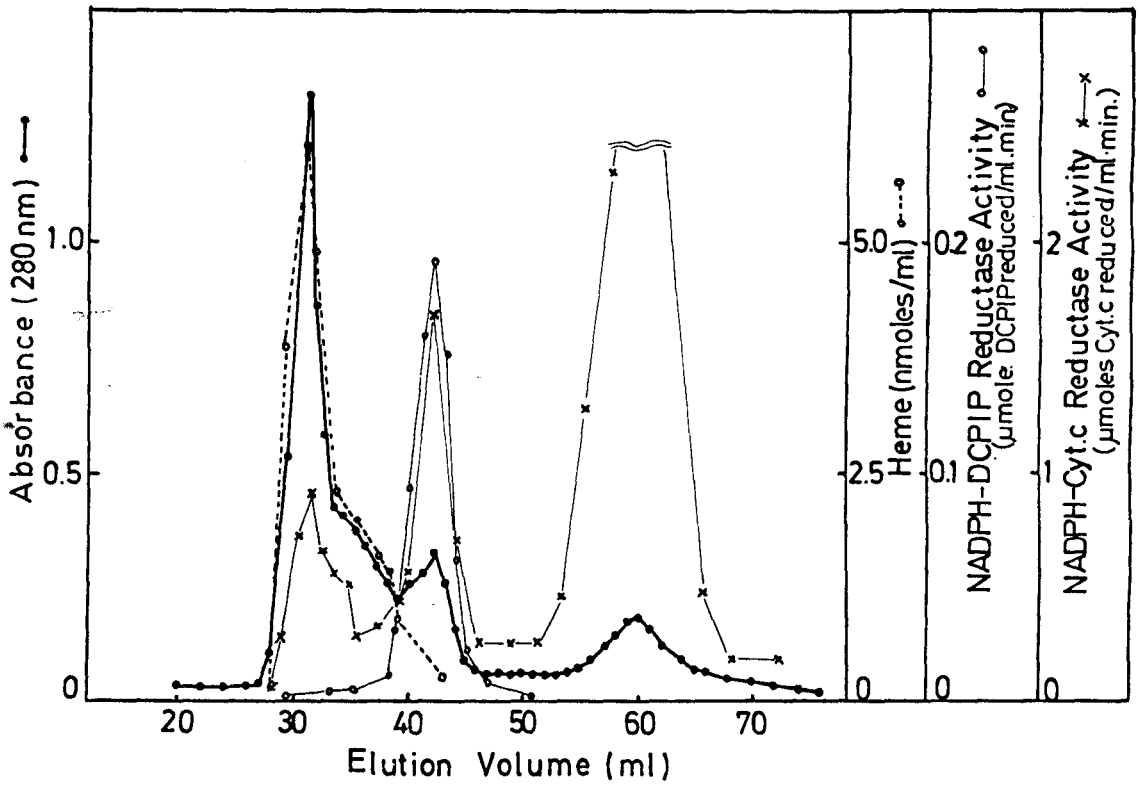

a
NADPH
3′
2′
1′
15′
0.04
0.02
0
ΔA
·AdR
·Ad
·P450
b
$Na_2S_2O_4$
3′
2′
1′
15′
0.04
0.02
0
ΔA
·Ad
·P-450
c
$Na_2S_2O_4$
50′
31′
21′
13′
9′
6′
3′
1′
0.04
0.02
0.
ΔA
·P-450
450
500
WAVELENGTH.nm

図10


Absorbance (280nm)
1.0
0.5
0
20
30
40
50
60
70
Elution Volume (ml)
Heme (nmoles/ml)
5.0
2.5
0
NADPH-DCPIP Reductase Activity
(μmole DCPIPreduced/ml.min)
0.2
0.1
0
NADPH-Cyt.c Reductase Activity
(μmoles Cyt.c reduced/ml.min.)
2
1
0

〔図説明〕

図1. ウシNADPH-アドレノドキシン還元酵素の結晶：倍率 A: ×100, B: ×250

図2. NADPH-アドレノドキシン還元酵素の分光吸収スペクトル。酵素濃度：紫外部5.3μM, 可視部53μM；50mMリン酸カリウム, pH7.4 温度20°C。

図3. チトクロームP-450sccのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動。ゲル濃度10%, タンパク濃度10μg

図4. チトクロームP-450sccの分光吸収スペクトル。酵素濃度, 5.5μM (長波長領域挿入部22μM) 50mMリン酸カリウム, pH7.4 (20°C)

図5. Triton X-100によるチトクロームP-450sccのSoret帯のスペクトル滴定。
試料(0.77 nmole P-450scc：2.2ml 0.6M NaClを

含む 10mM リン酸カリウム pH7.4) に Triton X-100 (0.1 あるいは 1.0 %(w/v)) を添加し、33°C, 5分間インキュベーションしたのち記録した。Triton X-100 最終濃度((w/v) %): 1. 0 ; 2. 0.91×10^{-4} ; 3. 2.7×10^{-4} ; 4. 7.2×10^{-4} ; 5. 1.17×10^{-3} ; 6. 1.62×10^{-3} ; 7. 2.07×10^{-3} ; 8. 4.27×10^{-3} ; 9. 6.54×10^{-3} ; 10. 8.81×10^{-3} ; 11. 1.34×10^{-2} ; 12. 1.79×10^{-2}.

図6. Triton X-100の濃度に対するスペクトルの変換率をプロットした。394nm あるいは 418nm の最大変化量をそれぞれ 100 として表わした。希釈による濃度及び吸光度の補正を行なった値を示してある。

図7. チトクローム P450scc の EPR スペクトルと Triton X-100 の影響。

55μM チトクローム P-450scc ; 50mM リン酸カリウム, pH 7.4. 測定条件: 温度 77°K. microwave power 100 mW. modulation amplitude 10 Gauss, microwave frequency 9.08 GHz

図8. チトクロームP-450sccの凝集化とアドレノドキシンの抑制。

あらかじめ0.1Mリン酸カリウム, pH7.4中で遠心したP-450scc標品を2.4nmoles. 次にあげられている系に添加し. 540nmの吸光度の増加を記録した。温度20°C

(1) 水. (2) 水+10nmolesアドレノドキシン

(3) 0.1Mリン酸カリウム, pH7.4

図9. チトクロームP-450sccの還元速度にたいするアドレノドキシンの影響。

反応液の組成, 試料側キュベット. 参照側キュベット両方ともに次の系を2分して等量づつ(2.0ml)入れる。一酸化炭素ガスをフローしながら. ジチオナイトあるいはNADPH(20mM) 20μlを加えて反応を開始させた。温度20°C.

a). アドレノドキシン 12.8 nmoles, 還元酸素 4.0 nmoles.

b) 〃

a) b). c) とも チトクローム P-450 scc 2.4 nmoles.

図10. NADPH-アドレノドキシン還元酵素・アドレノドキシン・チトクロームP-450$_{scc}$混合液(0.5ml)をBiogel P-200 (1.2×100 cm) に負荷した時の溶出曲線。酵素濃度は、それぞれ8.5 nmoles, 150 nmoles, 及び11 nmolesであった。10 mM リン酸カリウム, pH 7.4. 4°C。

表 1

Purification of Adrenodoxin Reductase from Bovine Adrenocortical Mitochondria

Steps	Total Volume (ml)	Total Protein (mg)	Specific Activity (units/mg)	Total Activity (units)	Yield (%)
1)Crude Extract	1,000	16,000	0.11	1,730	100
2)Dialysis	180	3,450	0.31	1,070	62
3)Affinity Chromatogr.	27	58	10.5	612	36
4)Sephadex G-100	13	33	13.2	436	28
5)Crystallization	1	18	22.3	404	24

表 2

表 2 Reduction Rate Constant (sec^{-1})

(1) NADPH, AdR, Ad, CO	+ P-450, CO	1.04
(2) $Na_2S_2O_4$, Ad, CO	+ P-450, CO	3.5×10^{-2}, 7.4×10^{-3}
(3) $Na_2S_2O_4$, CO	+ P-450, CO	4.0×10^{-3}