

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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)

〔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、4-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 (monoxygenase) 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、同様に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)}。

4-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 Horie¹²⁾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

できた^{13)~20)}。最近、Takemori¹⁸⁾ が側鎖切断反
 応に参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-450_{sec} と名付けた。彼
 らによると、チトクローム P-450_{sec} は、いわ
 ゆえに“高スピン型”²¹⁾²²⁾ チトクロームで、これ
 には基質と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醜
 素とアドレノドキシンは、ミトコンドリアか
 ら抽出される事から、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
 醜素 $\xrightarrow{1e^-}$ アドレノドキシン $\xrightarrow{1e^-}$ チトクローム
 P-450_{sec} $\xrightarrow{2e^-}$ O₂ となる。アドレノドキシンは、
 還元醜素とチトクローム P-450_{sec} の間に位置
 しており、電子伝達機構から両者との複合体
 を形成することか予想される。事実、還元醜
 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
 ることか、分光学的方法、ゲル過法、醜素

反応動力学的により²⁷⁾ 又、蛍光測定法により^{30), 31)} 証明されていゝ。

そこで、この電子伝達系成分の配列と特性に注目し、アトレノドキシンを固定化する事により、他の二成分の単離、精製を行つた。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

キトクローム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, ムーキモトリポシノーゲン, 2-6ジクロロフェニールインドフェノール (DCPIP), テオキシコルチコステロン (DOC), コルチコステロン, 酢酸プレグネロン, 20 α -ヒドロコステロールは 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之内製薬より、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、屠殺後たちちに -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

取り除いたのうち、ハサミで丁寧に皮質と髓質とを分離する。皮質は、メスあて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 0.25M sucrose を加えたのうち、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 $900\times g$ 20分間遠心し、その上清をさらに $10,000\times g$, 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 $0.78\sim 0.8$ 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 $\text{pH}7.4$ を用いた。NADPH-4トクロムC還元酵素活性は、 1ml の測定系に $10\mu\text{M}$ 4トクロムC, $20\mu\text{M}$ 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、4トクロムCの還元を増加を 550nm の吸光度の増加で、分子吸光係数 $18.5\times 10^3\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ³⁵⁾

を用いて測定した。

NADPH-DCPIP還元酵素活性は、 $100\mu\text{M}$ NADPH, $50\mu\text{M}$ DCPIP, 適当量のNADPH-アト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 $21 \times 10^3 \text{cm}^2 \text{M}^{-1}$ 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蛍光法を用いて測定した³⁷⁾。測定系(2.0ml)の組成は、 $20\mu\text{l}$ イソプロピルアルコールに溶解した基質(20 α -ヒドロコレステロール及びデオキシコレステロール) 400nmoles , アトレノドキシン 20nmoles , NADPH-アトレノドキシン還元酵素 2nmoles , NADPH $1\mu\text{moles}$ 及びチトクロームP-450 5sec かつたり、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蛍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フルクネノロンを用いた。

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。

キトクローム P-450sec の定量は、Omura らの方法⁴⁰⁾に従い、 β -ニチ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 5 μ M アドレノドキシシンが加えてある。

全ヘム含有量は、セリジンヘモクロモゲン法⁴¹⁾により求めた。

アドレノドキシシンは、414nm で 9.8×10^3 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ²⁵⁾ また、NADPH-アドレノドキシシン還元酵素は 450nm で 11.3×10^3 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 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 10 mM 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 4 トクロム (13,500), α -キモトリポシノーゲン (25,000), 卵アルブミン (43,000), ガ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)

50 mM 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、4-トクロム P-450sec を、それぞれ $54\mu\text{M}$ 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 のニ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 であるがやく洗滌したのち、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 でゆっくり攪拌すると、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、pH 8.0 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、グリシンで遮断されたことになる。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；0.01M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(2x10cm)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、0.1M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

11 54000g, 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%飽和硫酸分画し、その沈渣を、0.07M NaClを含む10mMリン酸緩衝液で十分に透析を行ない、この透析液を10,000g, 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キシナーフイニチーカラム(2x10cm)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%飽和硫酸の沈渣をさらに0.2M KClを含む10mMリン酸緩衝液中で透析し、引き続き Sephadex G-100 (1.5x40cm) 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る

れ、これをやはり硫酸55%飽和で濃縮し、この沈渣を最小量の10 mM緩衝液で溶解させ、がろ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。アドレドキシノーアフィニティフロマトグラフィー操作で、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倍純化したこととなる。この結果、はじめ

図1

めて結晶化に成功した。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トを形成している。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-4トクローム還元酵素活性は、

$22 \mu\text{moles} / \text{min} / \text{mg}$ タンパク という値を得た。

図2

図2は、結晶NADPH-アドレドキシノー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 450 nm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 $1.3 \times 10^3 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$ 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54,000という値とよく
 一致している。

III. ナトリウム P-450 scc の精製と性質

ミトコンドリア破片膜を4%の濃度が、
 20 mg/ml になるように、10 mM 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10 mM
 リン酸緩衝液を徐々に加えた。4°C で60分間
 ゆっくり攪拌して、55,000g 90分間超遠心を行
 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10 mM リン酸緩衝液で平衡化

してあったアドリノドキシノーアフィニティ
 カラム ($2 \times 10 \text{ cm}$) に直接負荷した。カラムをま
 ず最初に 200 ml の 0.1% Triton X-100, 1 mM EDTA を
 含む 10 mM リン酸緩衝液で洗滌し、次いで
 10 mM リン酸緩衝液とさらにカラムを洗滌し
 たのち、 0.6 M NaCl を含む 50 mM 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 ($275 \text{ nm} / 394 \text{ nm}$) が
 $2 \sim 2.5$ の画分を集めて、 45% 飽和になる
 ように硫酸を加え、 $10,000 \times g$, 15 分間遠心して
 その沈渣を 0.6 M NaCl を含む 50 mM 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 ($1.5 \times 100 \text{ cm}$) を用いて、ゲル濾過
 を行なった。この条件下では、 4 ml クローム
 $P-450$ 5 cc は、少なくとも 3×10^6 のピークを与え、
 それぞれ、 20 万 , 40 万 , 80 万 以上は相当する
 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% 飽和硫酸で濃縮したのち、少量

の 50mM リン酸緩衝液を加えて破片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か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透析したものを用いた。

牛副腎ミトコンドリア破片膜を TritonX-100 を用いて可溶化し、アドリノドキシニン-アフラニライクマトグラフィー及び Sephadex G-200 ゲル過法により、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

こととなる¹⁵⁾。本標品の側鎖切断活性は、20α-ヒドロコルステロールを基質にした時、4トクローム P-450_{SCC} 1モル、1分間あたり5モルのブルグネノロンが生成した。しかしデオキシコル4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4コステロンや18-ヒドロデオキシコル4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、4トクローム P-450_{SCC} の分光スペクトルを示した。275, 394, 650nm に、それぞれピークを、594, 570nm に肩をもち、いわゆる“高スピン型” 4トクローム P-450_{SCC} で、本標品は基質(コルステロール)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”標品にコル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-アトレノドキミン還元酵素及び
 アトレノドキミンを加えた再構成系では、
 最初以内、この“高スポン型”から“低ス
 ポン型”スペクトルへの変換が起ることを
 確認した。“高スポン型”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“低スポ
 ン型”チトクロームP-450_{SCC}に変換した²⁰⁾。図5

図5 “高スポン型”標品に Triton X-100 を添加
 して行った時のスペクトル変化を示した。

394nmの吸光度の減少とともに、418nmの増大
 が観察された。それは、407の isosbestic

point を通ることから、Triton X-100 によつて、

“高スポン型”から“低スポン型”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394nm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

を示してあり、臨場ミセル濃度⁽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 によるスラクトルの変換は、チトクローム P-450_{SCC} と Triton X-100 とミセルを形成することに関連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^變

図7 を EPR 分光法によって検討した。図7に、チトクローム P-450_{SCC} = 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 20 α -ヒドロコステロンと P-450 が結合する場合でも見られる⁽¹⁴⁾。

IV. 電子伝達系成分相互間の複合体形成について

NADPH-アトレノドキシン還元酵素及びキトクロム μ -P-450_{scd}それぞれは、精製の項ですでに述べたように、アトレノドキシン-アフィニティカラムに特異的に吸着されることが実験事実から、これらの二成分は、アトレノドキシニ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。

1) キトクロム μ -P-450_{scd}の分子特性に対するアトレノドキシンの影響

キトクロム μ -P-450_{scd}は、高いイオン強度下では、Sephadex G-200ゲルD過の結果から、少なくとも、分子量が20万、40万、80万という種類の集合状態をとっているものと考えられるが、一方低いイオン強度下では、凝集して、さらに巨大な集合体となりこじかわかった。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) 中でインキペーショ
ンした時の変化を示したものである。アドレ
ノトキシンが存在しない時、540nm の吸光度
の増大のみを、その変化は、二相性を示し
てゐる (図 8(1))。最初の相は、少なくとも
200 分までは直線的に増加してゐる。一方、
アドレノト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)) に比べて、
やや吸光度の増大のみを、それ以上の
変化は 200 分までのみをみられた。これは、ア
ドレノトキシンの、まずチトクローム P-450
と結合してしまつたために、チトクローム P-
450 間の凝集が抑制されるのだからと考へら
れよ。これを積極的に証明するため、150
分間インキペーションした、凝集の進行してゐる標品
に、アドレノト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、これは二
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よ。紙

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) ナトクローム P-450 の還元速度に対するアトレノトキシンの影響

既に述べたように、精製したナトクローム 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 (turnover number) を説明することは不可能である。それ故に、アトレノトキシンを介するところの電子伝達系によるナトクローム 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、以下の実験を行なった。

表

49 49-a~c は一酸化炭素を飽和した 50 mM 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、非常にゆっくりとあり、全部還元するのに 30 分以上かかる (49-c)。あらかじめ反応系にアトレノトキシンを添加して

やると、同じジチオチオ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、17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
 ッポドフロ一法により、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、
 ジチオチオイト(系(3))のそれと比べて約250倍大
 きなことがわかった。ジチオチオイト + アトレ
 ノドキミンの系(2)の還元は、 $3.5 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ と
 $7.4 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ という2つの値が求まった。前者
 は、ジチオチオイト単独(系(3))の約9倍ほど大き
 いことより、これは、アトレノドキミンの促
 進効果があると思われるが、詳細は、目下検
 討中である。

iii) ゲルD過法による複合体形成の証明

Chu & Kimura²⁷⁾ は、低い酸素強度下において、
 ゲルD過を行うことにより、NADPH-アトレノ
 ドキミン還元酵素とアトレノドキミンとのニフ

の成分の複合体として存在していることを明らかにした。しかし、4トウロ - の P-450_{SCC} とこの成分の複合体は形成されたか、と報告している。

そこで、精製した2標品とアトレノドキシンの複合体形成をゲル濾過法を用いて検討した。過剰量のアトレノドキシンの4トウロ - の P-450_{SCC} の NADPH-アトレノドキシ還元酵素が共存した試料 0.5ml を 10mM リン酸カリウムの pH 7.4 中で十分透析した。同緩衝液で平衡化したものを Biogel P-200 に負荷した。図 10 はその溶出曲線である。3つのピー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、4トウロ - の P-450_{SCC} とアトレノドキシンの、2番目のピーク(40-44)は NADPH-アトレノドキシ還元酵素とアトレノドキシンの、そして最後のピーク(55-60画分)は、アトレノドキシンのであった。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。

【 考 察 】

アドレノドキミンの固定化カラムにより、
 他のニ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、アドレノドキミン
 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^{(12)~(17)}や
 アニリン⁽¹⁸⁾やω-アミノノオクタル⁽¹⁹⁾などの疎^ど水性^{どちらかと言えは}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
 キミンの認識能は、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²の
 α-D-アミノ酸酸化酵素などは、吸着されない⁽⁴⁵⁾。
 ところか、植物のフェノドキミン⁽⁴⁶⁾を
 含む電子伝達系成分の一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のほ
 とも、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、当然予想されるところである。しかし、動物と植物という大きな形態的な相異があるにもかかわらず、相互に複合体を形成する事は非常に興味をもたれる。電子伝達機構の証明によい材料を提供するものと思われ。

精製したチトクローム P-450 sec 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たやま、¹⁸⁾ Takemori 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¹⁸⁾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 の基質であるカンファールの有無で、"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 が精製された⁵¹⁾。

"高スポン型" 4トクローム P-450 に基質が結合してゐるかどうか明らからない。

ところが、図5に示した Triton X-100 による "低スポン型" 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 "低スポン型" スペクトルと異なりように思われる。なぜなら、もし Triton X-100 が 4トクローム P-450 sec に結合してゐたコレストロールを完全に排除するこゝが可能でありとすれば、すでに精製の段階でコレストロールは、4トクローム P-450 sec から除かれてゐるはずであり、精製した標品にコレストロールが結合してゐるといふ事実と矛盾する。4トクローム P-450 に種々のリガンドありは基質を結合させた時の蛍光スペクトルと ESR スペクトルの対応が研究されてゐる^{(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、低スポン領域のシグナルの増大のみが見られた。図6の結果は、牛血清アルブミン⁽⁵²⁾ ありは、4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。これらのおかげから、Triton X-100 がチトクローム P-450_{scv} 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見られる。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-アトレノドキシン還元酵素とアト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

などから、酵素の立体構造を安定な状態に保持すために、相互間の複合体形成が役立つ子と思われる。実際の副腎ミトコンドリア内の各成分の含有量は、4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。ステロイド生成の調節機構を研究するためには、今後、4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ノーアフィニティカラムを作成した。このカラムを用いて NADPH-アドレノドキシ還元酵素及び4トクロム P-450_{sc} を簡便に、かつ収率よく精製できた。さらに前者は、はじめに結晶化に成功した。

2) 4トクロム P-450_{sc} の分子特性としての命令的、磁氣的、物理化学的性質を明らかにした。

3) 電子伝達系成分間の複合体形成能についてゲルD過、還元速度、分子の解離集合同などの実験結果より、NADPH-アドレノドキシ還元酵素-アドレノドキシ-NB₂ アドレノドキシ-4トクロム P-450_{sc} 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土いたし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冽博士をはじめ第一生化学教室の各位に深謝いたします。

- 1) Stone, D. and Hechter, O. (1954) Arch. Biochem. Biophys. 51, 457-469
- 2) Koritz, S. B. and Kumar, A. M. (1970) J. Biol. Chem. 245, 152-159
- 3) Simson, E. R. and Boyd, G. S. (1967) Eur. J. Biochem. 2, 275-285
- 4) Young, D. G. and Hall, P. F. (1968) Biochem. Biophys. 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) Simoson, E.R., Jefcoate, C.R., Brownie A.C. and Boyd G.S. (1972) *Eur. J. Biochem.* 28, 442-450

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

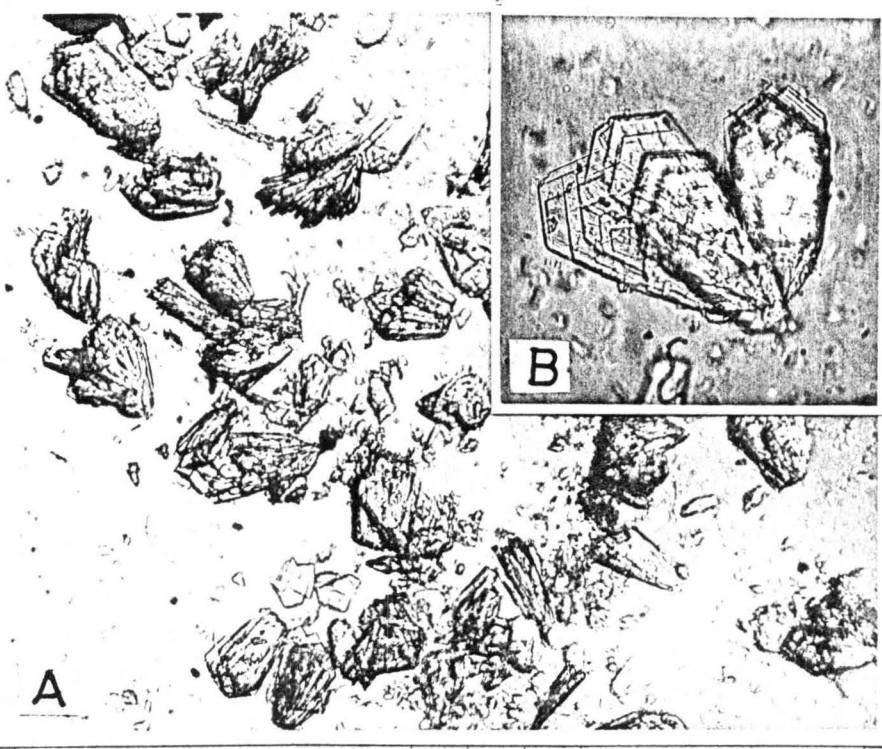
23) Suzuki, K., and Kimura, T. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 340

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

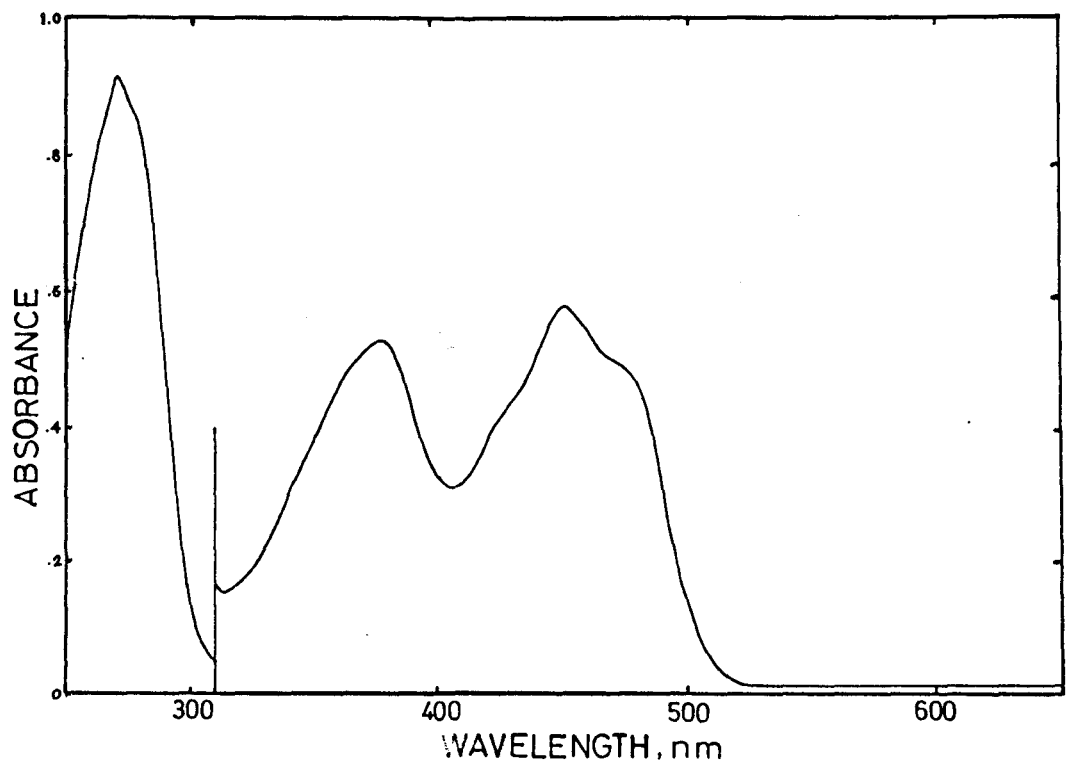
25) Suhara, K., Takemori, S., and Katagiri, M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 263, 272-278

- 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) *Biochemistry* 14, 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

- 40) Omura, T., and Sato, R. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2370-2378
- 41) Paul, K.G., Theorell, h., and Åkeson, A. (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 42 512
- 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・三浦潤・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., and Coon, 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 (生物物理学講座 9) p. 115-156
吉岡書店
- 54) Purvis, J.I., Canick, J.A., Mason, J.I., Estabrook, R.W. and McCarthy, J.L. (1973) Ann. New York Acad. Sci. 212, 319-343



11/2



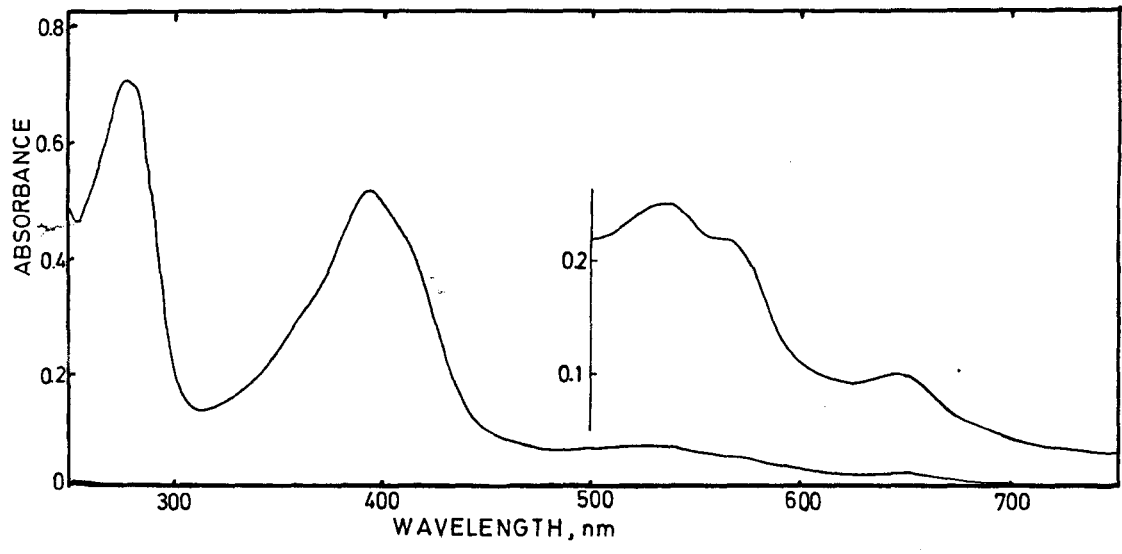
143

⊖

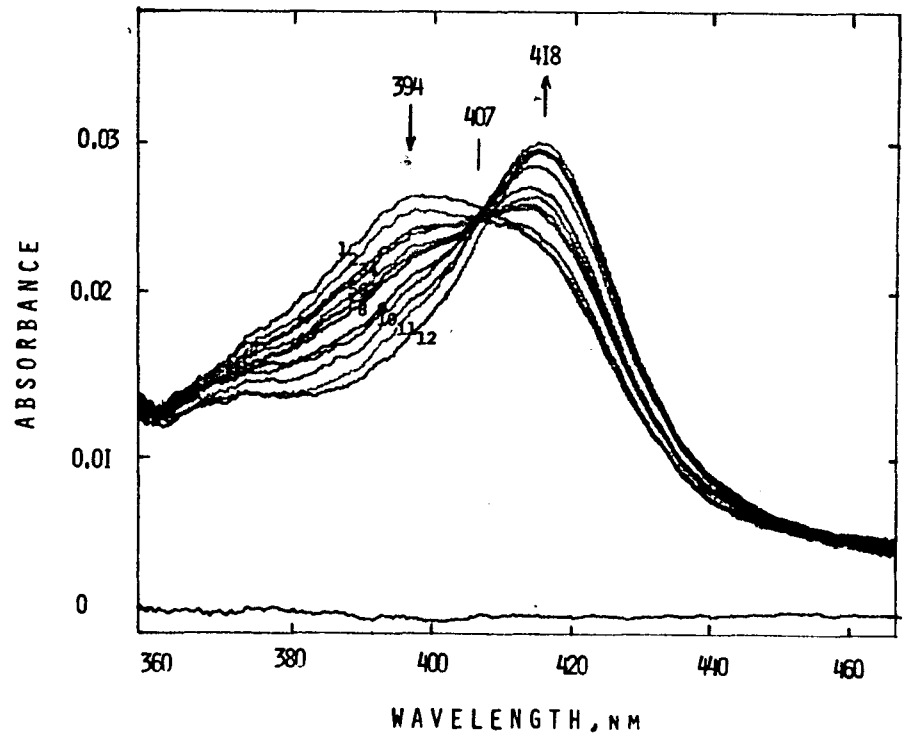
⊕

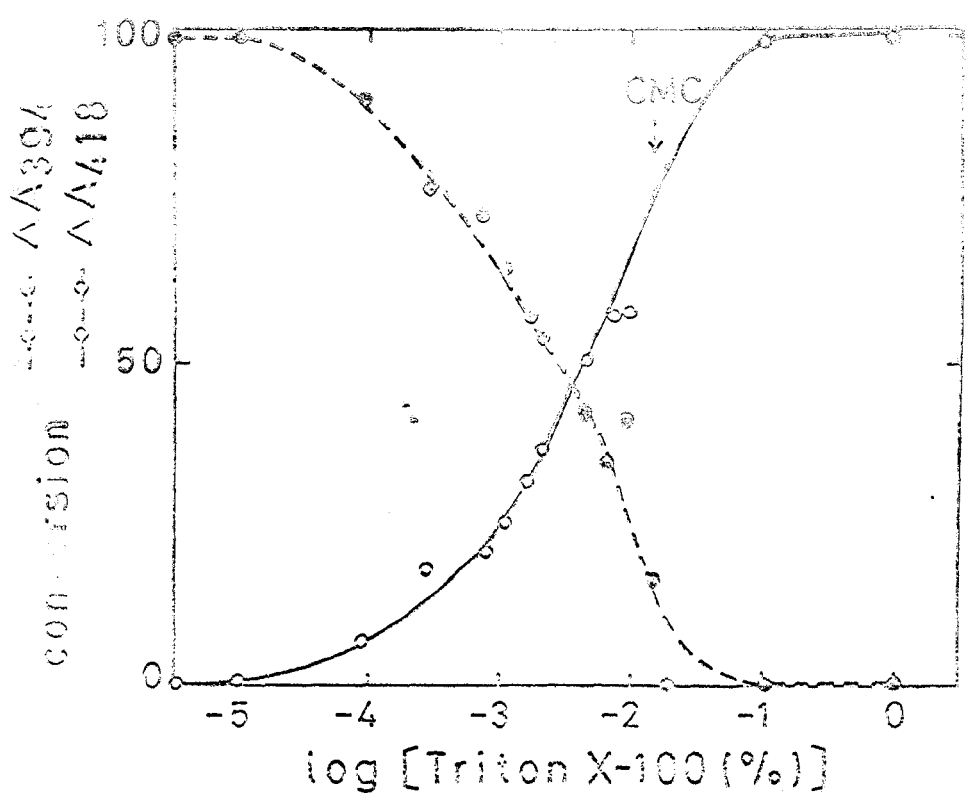
P-450

图 4

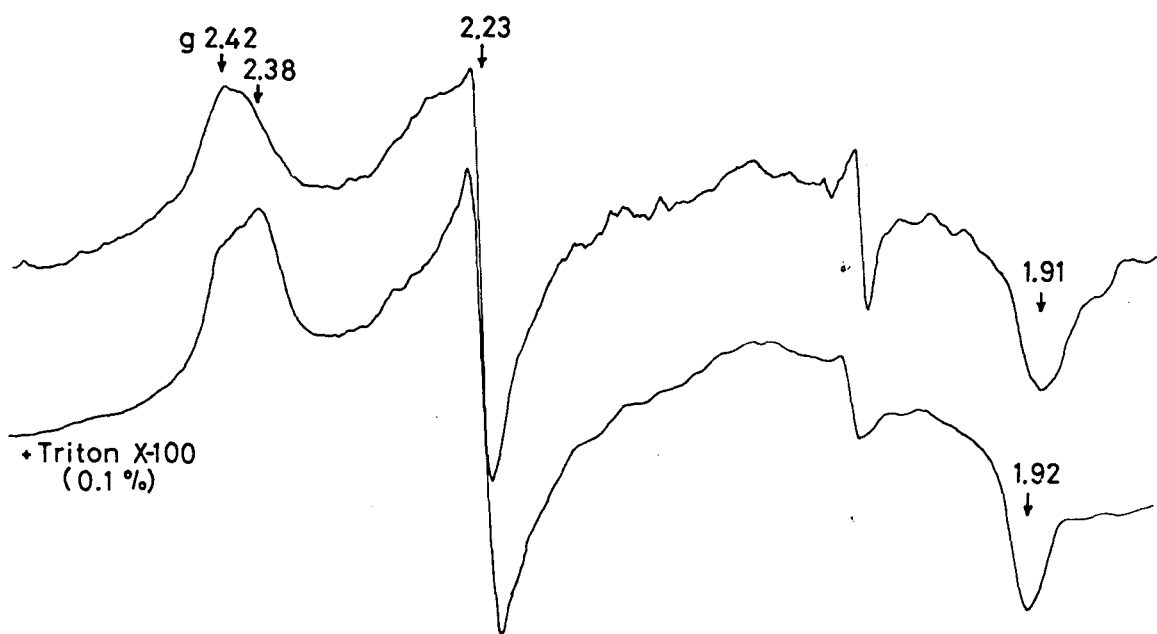


5
71

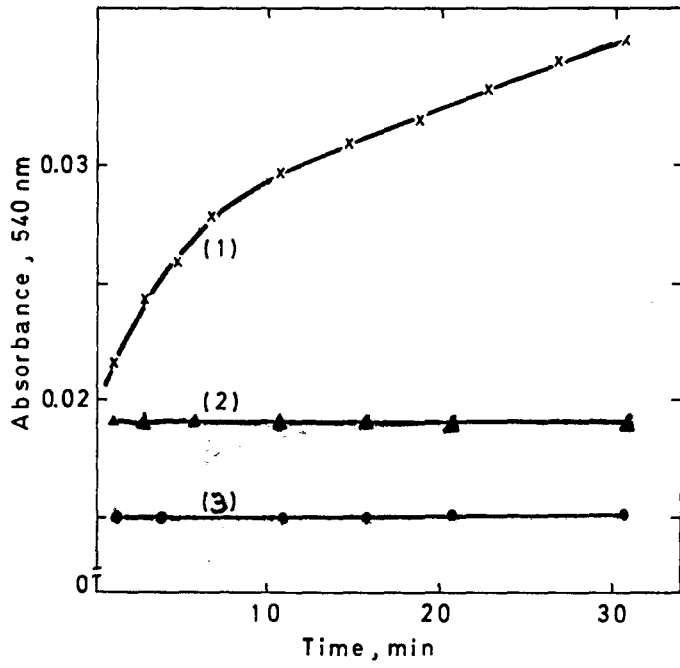


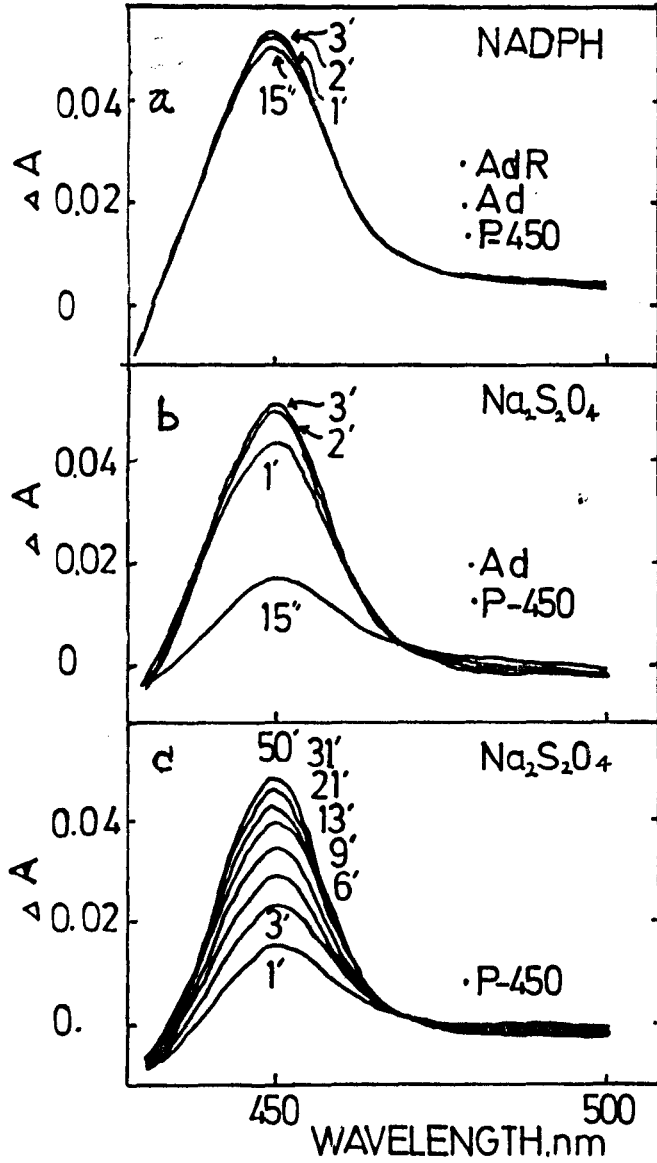


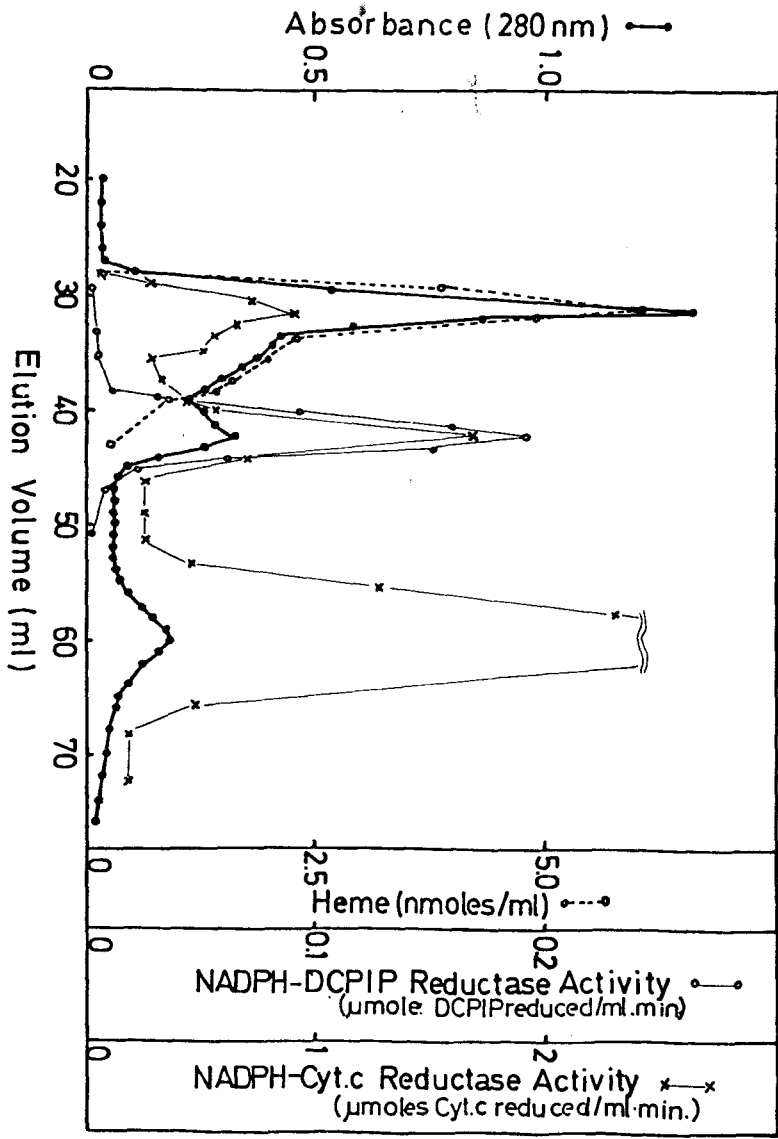
四七



148







11/10

図説明①

〔図説明〕

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

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 $5.3 \mu\text{M}$, 可視部 $53 \mu\text{M}$; 50mM リン酸カリウム, pH 7.4 温度 20°C 。

図3. 4トウロ-4 P-450_{scc} 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 $10 \mu\text{g}$

図4. 4トウロ-4 P-450_{scc} の分光吸収スペクトル。酵素濃度, $5.5 \mu\text{M}$ (長波長領域挿入部 $22 \mu\text{M}$) 50mM リン酸カリウム, pH 7.4 (20°C)

図5. Triton X-100 による 4トウロ-4 P-450_{scc} の Soret 帯のスペクトル消失。

試料 (0.77nmoles P-450_{scc}): 2.2ml 0.6M NaCl

図説明②

含む 10mM リン酸カリウム ($\text{pH} 7.4$) に Triton X-100 (0.1
 あるいは 10% (w/v)) を添加し、 33°C 、5分間イン
 キベーターで処理したのを記録した。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
 表わした。希釈による濃度及び吸光度の補正
 を行った値を示してある。

図7. 4トリクロム P450_{SCC} の EPR スペクトルと
 Triton X-100 の影響。

55mM 4トリクロム P450_{SCC} ; 50mM リン酸カリ
 ウム, $\text{pH} 7.4$. 測定条件: 温度 27°K .

microwave power 100mW . modulation amplitude
 60Gauss , microwave frequency 9.086Hz

④ 8. 4トルクロ-4 P-450_{SCC}の集合化と Pトル / ドキミンの抑制。

あらかじめ 0.1 M リン酸カリウム, pH 7.4 中で
遠析した P-450_{SCC} 標品を 2.4 mmoles. 次にあ
げらぬ二つの系に添加し. 540 nm の吸光度の
増加を記録した。温度 20°C

- (1) 水. (2) 水 + 10 mmoles Pトル / ドキミン
- (3) 0.1 M リン酸カリウム, pH 7.4

④ 9. 4トルクロ-4 P-450_{SCC}の還元速度に及
ぶ Pトル / ドキミンの影響。

反応液の組成, 試料側キニベット. 参照側キニ
ベット 両方ともに次の系を二分して等量ずつ
(2.0 ml) 入れる。一酸化炭素ガス ~~を~~ フローシタ
から. 2.4 ml ずつあるいは NADPH (20 mM) 20 ml
を加えて反応を開始させた。温度 20°C.

a). Pトル / ドキミン ~~2.4~~^{12.8} mmoles, 還元酵素 ~~2.4~~^{4.0} mmoles.

b)

a) b), c) とし 4トルクロ-4 P-450_{SCC} 2.4 mmoles.

図説明④

図10. NADPH-ドレドリン還元酵素・P
ドレドリン・4トクド-4P-450_{sc} 混合液(25ml)
を Biogel P-200 (1.2x100 cm) に負荷した時の
溶出曲線。 酵素濃度は、それぞれ 8.5 mmoles
150 mmoles, 及び 11 mmoles 2" 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

11/4

表 2

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

(1) NADPH, AdR, Ad, CO + P-450, CO	1.04
(2) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, Ad, CO + P-450, CO	$3.5 \times 10^{-2}, 7.4 \times 10^{-3}$
(3) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, CO + P-450, CO	4.0×10^{-3}