

Title	3-メチルコランスレンおよびフェノバルビタールで処理したウサギ肝ミクロゾームのチトクロームP-450の精製とその性質
Author(s)	湯通堂, ちか子
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32162
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	湯通堂 ちか子
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 4547 号
学位授与の日付	昭和54年3月24日
学位授与の要件	理学研究科 生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	3-メチルコランズレンおよびフェノバルビタールで処理した ウサギ肝ミクロゾームのチトクロームP-450の精製とその性質
論文審査委員	(主査) 教授 佐藤 了 教授 堀尾 武一 教授 松原 央

論 文 内 容 の 要 旨

チトクロームP-450は、肝ミクロゾーム電子伝達系の末端酵素であり、種々の薬物やステロイドなどの酸化代謝に関与している。これらのP-450は、吸収スペクトルより、“P-450型”と“P-448型”とに大別でき、前者は、フェノバルビタール(PB)等によって、後者は3-メチルコランズレン(MC)等の多環芳香族炭化水素によって誘導され、両者は異なった分子種であることが、示唆されてきた。本研究では、MCで誘導したウサギ肝ミクロゾームの主要P-450成分であるMC P-448とPBで誘導したウサギ肝ミクロゾームに少量存在するPB P-448を均一に精製し、それらの性質をPBで誘導したウサギ肝ミクロゾームの主要P-450成分であるPB P-450と比較検討すること、および、誘導剤であるMCや他の芳香族炭化水素のP-448への結合様式を酵素の活性や構造と関連させて調べることを目的とした。

MC P-448とPB P-448はそれぞれMCおよびPBで誘導したウサギ肝ミクロゾームからコール酸で可溶化した後、 ω -アミノオクチルセファロースカラム、ヒドロキシルアパタイトカラムおよびCMセファデックスカラムによるクロマトグラフィーを行なうことによって、ゲル電気泳動的に均一にまで精製した。このMC P-448とPB P-448はともに同じ分子量(5.4万)でほとんど同じアミノ酸組成であった。また酸化型での吸収スペクトルおよびESRスペクトルから両者は高スピン型であることが示され、さらに還元CO型は448nmにSoret帯の吸収極大をもち、エチルイソシアニド差スペクトルは、430と453nmに極大を持つことが示された。また両者のP-448は、アセトアニリドの水酸化に高い代謝活性を示すが、他の基質に対する活性は比較的低い点でも類似している。これらの結果より、MC P-448とPB P-448は、タンパク質として同一のものであると結論できる。他方、これらのP-448

は、酸化型で低スピン状態にあるPB P-450とは、分子量、アミノ酸組成、スペクトルの性質、代謝活性などの点において全く別種の分子種であることが確認された。このように、MC P-448とPB P-448は同一の分子種であるにもかかわらず、前者がモル当たり、0.2から0.9モルのMCが結合した状態で精製されているという点で異なっており、紫外部の吸収スペクトルおよび近紫外-Soret領域のCDの強度は標品中のMCの存在量に比例して、増大することがわかった。PB P-448およびMC含量の低いMC P-448に外からMCを添加すると、両者は1:1のモル比で結合し、その結果、近紫外-Soret領域にMCを1:1に含むMC P-448と同じく、結合したMCに起因する特有なCD帯が出現することが、明らかになった。また多環芳香族炭化水素であるベンツピレンや β -ナフトフラボンもMCと同じように結合することが明らかとなった。これらはMCと同様にP-448型チトクロームの誘導剤あるいは基質である点で興味深い。さらに、MCで誘導したラット肝ミクロゾームから精製したP-448にはMCは結合するが、ウサギおよびラット肝より精製したP-450型のチトクロームおよび酵母ミクロゾームからのP-450への結合はみられず、MCのP-448への特異的な結合が推定される。

結合したMCが再構成系でのアセトマニリドの代謝を阻害することからMCは酵素の活性部位の近傍に結合することが示唆された。これは塩酸グアニジンによる変性の挙動を調べることでさらに明らかとなった。すなわち低濃度の塩酸グアニジンでヘムを含んだ領域（活性部位が存在している領域）が変性するが、MCが結合しないP-448では、この領域の変性はおこりにくく、より高濃度の塩酸グアニジンによってはじめて変性することが、わかった。この領域の変性に伴ってMCの蛍光が出現することは、MCの遊離を示している。これらのことより、MCはヘムを含んだ領域に結合し、安定化することが明らかとなった。

論文の審査結果の要旨

肝ミクロゾームにはチトクロームP-450を末端酵素とする電子伝達系が存在し、薬物やステロイドなどの酸化的代謝に関与しているが、近年ミクロゾームには分子種を異にする数種のチトクロームP-450が含まれ、動物を各種薬物で処理すると、薬物の種類に応じて、それらのうちの一つが選択的に誘導されてくることが明らかとなってきた。

湯通堂君は3-メチルコランスレン（MC）で誘導したウサギの肝ミクロゾームの主要P-450成分（“MC P-448”）およびフェノバルビタール（PB）で誘導したウサギ肝ミクロゾームに小量存在するP-450成分（“PB P-448”）をそれぞれ均一に精製し、それらの性質を解明するとともに、PB誘導したウサギ肝ミクロゾームの主要P-450成分（“PB P-450”）との比較を行なった。得られた主要な知見は次のとおりである。

1. MCP-448とPB P-448は分子量（5.4万）、アミノ酸組成、Soretおよび可視部での吸収スペクトル、EPRスペクトル（酸化型で高スピン状態）などの点でほとんど同じであり、同一分子種と思われる。しかし、MCP-448にはモル当たり0.2~0.9モルの強固に結合したMCが含まれており、その

ために紫外外部吸収スペクトルおよび近紫外外部と Soret 領域の円二色性 (CD) スペクトルに特徴的な吸収バンドがみられる。

2. MC P-448 と PB P-448 のこれらの性質はすべて PB P-450 とは明らかに異なり、両者は分子種を異にすることは確実である。

3. PB P-448 (および MC 含量の低い MC P-448) に外から MC を添加すると両者は等モルで結合して複合体をつくり、特徴的な吸収ならびに CD スペクトルを発現する。なおベンツピレン、 β -ナフトフラボンなどの多環芳香族炭化水素もこれらの P-448 と結合しうる。しかしこれらの炭化水素は PB P-450 とは結合しない。

4. PB P-448 および PB P-450 のヘムを含む領域は低濃度の塩酸グアニジンで容易に変性するが、その他の領域の変性は変性剤の広い濃度範囲で徐々におこる。MCP-448 のヘム領域の変性は結合している MC のためにかなり高濃度の変性剤を要する。

以上のように湯通堂君の業績はチトクロム P-450 の多様性に新しい光を投げかけたものであり、理学博士の論文として十分に価値あるものと認められる。