



Title	腎臓ミトコンドリアの腎フェレドキシン（レノレドキシン）の精製とその物理的・化学的性質
Author(s)	丸谷, 宣子
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32850
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

氏名・(本籍)	丸 谷 重 子
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5168 号
学位授与の日付	昭和56年2月24日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	腎臓ミトコンドリアの腎フェレドキシン (レノレドキシン) の 精製とその物理的・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 田川 邦夫

論文内容の要旨

[目 的]

ビタミンD₃ (Cholecalciferol)は、肝臓ミクロソームで25ヒドロキシビタミンD₃に、さらに腎臓ミトコンドリアで1 α ・25ジヒドロキシビタミンD₃へと水酸化されてはじめて生理的活性を示す。腎臓ミトコンドリアにおける25ヒドロキシビタミンD₃・1 α 水酸化反応はシトクロムP-450依存性電子伝達系によって行われるが、この系はNADPH-腎フェレドキシン還元酵素、腎フェレドキシン及びシトクロムP-450の3成分から構成されている。しかし、これらの各成分に関する精製方法及びその性質についてはまだ明らかにされていない。今回、これらの各成分のうち、ウシ腎臓ミトコンドリアに存在するフェレドキシン (Renal Ferredoxinを他の組織のフェレドキシンと区別するためにレノレドキシン (Reno-redoxin)と呼ぶことにした)を精製し、その物理的、化学的性質を調べた。また、精製されたレノレドキシンを用いて再構成実験を行い、このたんぱくが25ヒドロキシビタミンD₃・1 α 水酸化反応に重要な働きをなすことを確認した。

[方法ならびに成績]

1) レノレドキシンの精製

ウシ腎臓ミトコンドリアより、以下の方法でレノレドキシンを精製した。すなわち、ウシ腎臓ミトコンドリアを超音波処理の後、超遠心分離により得られた上澄をDEAE-セルローズカラムにアプライし、100mM NaClを含む20mM Tris-HCl緩衝液で洗い、350mM NaClを含む100mM Tris-HCl緩衝液で溶出した。この溶出液を60%飽和の硫酸アンモニウムで分画し、その上澄を同じく60%飽和の硫酸アンモニウムを含む120mM Tris-HCl緩衝液で平衡化したDEAE-セルローズを充填したカラ

ム (DEAE-セルローズ・硫酸アンモニウムカラム) にアプライすると、レノレドキシンはこのカラムの上部によく吸着した。さらに、60%飽和の硫酸アンモニウムを含む120mM Tris-HCl 緩衝液でよく洗った後、同濃度の Tris-HCl 緩衝液中で硫酸アンモニウムの濃度のみを減少させるグラジエントクロマトグラフィーを行った。この溶出液のうち、レノレドキシン固有の活性を示す分画を透析して DEAE セファローズ CL 6B のカラムにアプライし、180mM NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液で洗い、250mM NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液で溶出した。この溶出液を透析、濃縮の後、500mM NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液で平衡化した Sephadex G-75 のカラムで 2 回ゲルろ過を行った。以上の精製方法によって SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的に単一のレノレドキシンを得た。

2) 精製されたレノレドキシンの物理的・化学的性質

分子量を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法とセファデックス G-100 を用いたゲルろ過法によって測定した結果約 12,500 という値が得られた。アミノ酸組成を測定すると、他のフェレドキシン類と同様アスパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸が多く含まれていた。レノレドキシン 1 分子中の鉄の数は 2 個であった。分光吸収スペクトルを測定したところ吸収極大は 275, 340, 412 と 460nm に存在し、ハイドロサルファイトで還元すると 460nm の吸収は消失した。77°K と 13°K で測定した EPR スペクトルは $g_x = g_y = 1.94$ $g_z = 2.01$ にフェレドキシン特有の吸収を示した。また、副腎皮質に存在するアドレノドキシンの抗体を用いて免疫反応を行ったところ沈降反応が認められた。

3) レノレドキシンを用いた、25ヒドロキシビタミン D₃・1 α 水酸化反応の再構成実験

ウシ副腎皮質ミトコンドリアから精製された NADPH アドレノドキシン還元酵素とウシ腎臓ミトコンドリアから精製されたレノレドキシン及び部分的に精製されたシトクロム P-450 を用い、25ヒドロキシビタミン D₃ を基質として 1 α 水酸化反応を測定したところ、1 α ・25ジヒドロキシビタミン D₃ の生成が確認され、この反応に不可欠なたんぱくであることが分った。

[総括]

- 1) ウシ腎臓ミトコンドリアからレノレドキシンを単離・精製することに成功した。
- 2) 精製されたレノレドキシンの物理的・化学的諸性質を明らかにした。
- 3) レノレドキシンが、ウシ腎臓ミトコンドリアにおけるシトクロム P-450 依存性の 25ヒドロキシビタミン D₃・1 α 水酸化反応に重要な働きをなすたんぱくであることが分り、生理的な意義が確認された。

論文の審査結果の要旨

著者はビタミン D₃ の活性型 1 α ・25 (OH)₂ V. D₃ の生合成における 1 α 水酸化酵素系の成分の一つである腎ミトコンドリア非ヘム鉄フェレドキシン (レノレドキシン) を精製純化した。

この非ヘム鉄は 2Fe, 2S の鉄イオウ活性中心をもち、副腎ミトコンドリアシトクロム P-450 系の

アドレノドキシンは、分子量、EPRシグナルなどかなり類似しているが、分光吸収、アミノ酸組成などで差が見られる。さらに腎ミトコンドリアシトクロムP-450系における 1α 水酸化活性への寄与はアドレノドキシンに比して高く、この種の非ヘム鉄たんぱくが臓器特異性を示す結果が得られた。このような成果から本論文のV. D₃の代謝研究への貢献は大きいと考えられる。