

Title	ウサギ肝ミクロゾームのチトクロームP-450の分子多様性：精製と性質
Author(s)	青山, 俊文
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33345">https://hdl.handle.net/11094/33345</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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)	あお 青	やま 山	とし 俊	ふみ 文
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	5962	号	
学位授与の日付	昭和58年3月25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	ウサギ肝ミクロゾームのチトクロームP-450の分子多様性： 精製と性質			
論文審査委員	(主査) 教授	佐藤		了
	(副査) 教授	堀尾	武一	教授 松原 央

### 論文内容の要旨

肝ミクロゾームのチトクロームP-450 (以下P-450と略す) 含有モノオキシゲナーゼ系は内在性脂質 (脂肪酸, ステロイドなど) の代謝に関与するほか, 多種多様の外来性薬物 (医薬・農薬・食品添加物・癌原性物質など) の解毒や活性化を触媒する。近年この酵素系の研究が進み, 1) 肝ミクロゾームには複数種のP-450が存在すること, 2) 各分子種のP-450の基質特異性は異常に広くかつ相互に重複していること, 3) 動物に薬物を投与すると, 投与した薬物に応じて, 特定分子種のP-450が誘導的に増量することなどの事実が明らかにされてきた。しかし, 肝ミクロゾームのP-450の分子多様性の意義及びこの酵素系の多彩な機能の分子的基盤を明らかにするためには, 尚多くの研究が必要である。本研究では, 従来あまり研究の進展がみられなかった薬物末投与の動物 (本研究にてはウサギ) の肝ミクロゾームから出来る限り多種類のP-450を精製し, それらの分子的性質と触媒活性を詳細に調べることによって, この問題へのアプローチを試みた。得られた結果は次のように要約することができる。

1) 薬物末投与及びフェノバルビタールを投与したウサギの肝ミクロゾームからそれぞれ13種及び3種, 合計して15種 (P-448<sub>1</sub> という分子種は両者から得られることも精製標品の比較から明らかとなった) のP-450を分離精製した。後述する諸性質から, このうちの5種は本研究室及び他研究室で既に得られているものと同一と判定される。

2) これらの標品はSDS存在下のアクリルアミドゲル電気泳動で均一又はほぼ均一である。それらの見かけの分子量は4.8万から6万の間に分布する。

3) ヘム蛋白であるP-450の吸収スペクトルから, 13種は酸化型で低スピン状態にあるが, 1種

(P-448<sub>1</sub>)は高スピン状態に、また、もう1種(P-448<sub>4</sub>)は混合スピン状態にある。低スピン型の分子種も低温(-196℃)スペクトルの $\alpha$ ,  $\beta$ 帯の位置及び高さから幾つかのグループに分けられる。還元型C O複合体のSoret吸収帯が447—448nmにある4種を“P-448”グループ、449—451nmにある11種を“P-450”グループと便宜的に分類した。諸性質の比較から、この分類は有意なものであることが明らかにされた。

4) 各分子種のアミノ酸組成は相互にかなり類似しているが、他の膜蛋白質の組成とは異なり、“P-450的特徴”を持つと判断される。

5) P-450<sub>1</sub>, P-450<sub>4</sub>及びP-448<sub>1</sub>に対する抗体を山羊を用いて調製し、それらの各分子種に対する反応性を調べた結果、P-450グループの11分子種は免疫学的に3つのサブグループに大別されること、また、P-448グループに属する4分子種は免疫学的にもP-450グループとは明らかに異なることがわかった。

6) 各分子種のP-450の12種の薬物を代謝する活性を再構成法で測定したところ、N脱メチル化反応とニトロアルカンの脱ニトロ化反応は、幾つかの分子種が特に高い活性を示すものの、おしなべて全ての分子種によって代謝されるのに対して、水酸化反応やO脱アルキル化反応は比較的限定された分子種だけに活性が認められた。再構成系にチトクロームb<sub>5</sub>を添加すると、P-450の分子種及び薬物基質の種類によって、促進したり、阻害したり、無影響であったりする。尚、幾つかの分子種は7-メトキシクマリンの代謝に伴って経時的に失活するが、この失活はチトクロームb<sub>5</sub>の添加によって抑制される。

7) 炭素鎖長12, 14, 16及び18の直鎖飽和脂肪酸、ビタミンD<sub>3</sub>、プロスタグランジンA<sub>1</sub>及びE<sub>1</sub>はP-450によって水酸化され、位置異性体の化合物に代謝されるので、生成する位置異性体を完全分離定量できる方法を開発使用した。P-450分子種のうちP-448<sub>1</sub>は脂肪酸の( $\omega-1$ )と( $\omega-2$ )位のいずれかに水酸基を導入し、P-450<sub>6</sub>とP-450<sub>7</sub>は( $\omega-1$ )位のみ、7種のP-450が $\omega$ と( $\omega-1$ )位のいずれかに水酸基を導入することがわかった。これらの各分子種により生ずる位置異性体の生成比及びチトクロームb<sub>5</sub>の活性促進効果は基質の鎖長により著しい画一的影響を受ける。ビタミンD<sub>3</sub>の25及び26位水酸化、プロスタグランジンの19及び20位水酸化は複数分子種のP-450によって触媒されるが、これらの分子種には脂肪酸の $\omega$ 酸化及びP-450の臓器特異性と関連した極めて興味ある特徴が見出された。

8) 以上のことから、これら15種のP-450は全て相互に異なる分子種であることが確実となった。

## 論文の審査結果の要旨

哺乳類動物の肝ミクロゾームのチトクロームP-450はモノオキシゲナーゼとして薬物および内在性脂質の代謝に関与している。近年、肝ミクロゾームのP-450が分子多様性を示すことが明らかとなり、関心を集めるに至っている。

青山君は薬物未投与およびフェノバルビタールを投与したウサギの肝ミクロゾームから合計15種類のP-450を均一またはほぼ均一に精製し、それらの見かけの分子量、吸収スペクトル、免疫学的性質ならびに十数種の薬物に対する触媒活性を調べ、これら15種のP-450が免疫学的にいくつかのグループに分類されること、各グループ内では相互にかなり類似しているが、明らかに異なる分子種であることなどを明らかにした。

また、これら15種のP-450のビタミンD<sub>3</sub>、プロスタグランジンA<sub>1</sub>（およびE<sub>1</sub>）、脂肪酸（ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸）などの内在性脂質水酸化活性を詳細に調べ、これらの脂質は、薬物とは異なり、比較的限られた分子種のP-450によって代謝されること、生成物として $\omega$ -水酸化体、( $\omega-1$ )水酸化体あるいは両者をつくるものがあることなどを明らかにした。

さらに、薬物および内在性脂質の代謝において、基質およびP-450の種類に応じて、チトクロムb<sub>5</sub>の添加が活性を促進することも、阻害することも、影響を与えないこともあることを明らかにした。

これらの成果は肝ミクロゾームのチトクロムP-450の分子多様性の生物学的意義を解明するための重要な寄与であり、理学博士の学位に十分値するものと認められる。