OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	生化学に関連する低温の利用
Author(s)	山野, 俊雄
Citation	大阪大学低温センターだより. 1974, 5, p. 8-10
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/7859
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

生化学に関連する低温の利用

医学部　山　野　俊　雄

この方面の低温の利用は大別して，①生物材料の保存，②酵素，リセプタープロティンなどの精製，③生化学物質の物性研究　に分けられる。

① 生物材料の保存：生体はきわめて狭い温度範囲で生息している。したがって生体を使っての実験はながい間この限られた温度領域で実験をするのが大部分であった。ほ乳動物の場合30℃～40℃　細菌，ビールスを含むと0℃～50℃までの温度範囲の実験が大部分であった。しかし，酵素の精製純化が行われるようになって0℃に近い温度が頻用されるようになり冷凍遠心機が必須になってきた。さらに寒剤使用の低温が生物材料の保存に使用されるようになった，いくつかの例　（ミトコンドリアのような高次の膜構造をもったもの，ミオシンのような高分子のものは，凍結で活性を失い構造が破壊される。最近ではCold labileという呼び名でいくつかの酵素が特徴づけられている。ATPase（アデノシン3燐酸水解酵素）などもその一つである）　を除いて概して低温で生体の各Componentは安定である。したがって生物材料の保存には低温は必須である。0℃付近の凍結で酵素は数週間安定であるものが多いが，さらに−80℃，−170℃（190Kから液体窒素温度付近まで）あたりではミクロゾームのような膜系の酵素集団が系としての機能すなわち水酸化酵素系の活性を数ケ月以上にわたって保持できる。また，角膜提供者の角膜を長期にわたって保持して白内障の患者の手術に利用できるのも低温アインバンクのおかげである。この低温は110−77K程度の低温である。ウソの話かマコトの話か知らないが米国のある富豪の癌の患者を液体窒素温度で凍結して永く保持し，癌の治療の確実になった時点で融解してその治療をおこなう予定という。金魚を液体窒素で凍結して死んだようになっているのをまた水に入れると動きまわるという映写を見た人が多いと思うが，おそらくわれわれが普通に行ってはあんなには簡単に行かないだろうと思われる。凍結温度，凍結までの時間，融解に要する時間などの条件でいろいろの場面がでてくるだろう。ミトコンドリア程度の構造で凍結により簡単に機能を失うのだから脳のすみずみまで凍ってしまった後で，融解してもとどおりの構造と機能を保持する根拠はないはずである。

しかし構造を非可逆的に破壊せずに低温にもって行き，また可逆的に融解することの理論と実験ができればいろいろな医学，生物学での応用が展開できるだろう。

② 生体成分の純化：多くの水溶性酵素は純化結晶されてその性質が明らかにされているが，なお膜に結合する酵素は水に可溶化されにくいために研究の壁に来ているものも少くない。さらに最近ホルモ

ン，神経末端遊離物質のリセプターの研究が盛んになってきたがこの場合でもリセプターたんぱくは膜に結合している場合が多い。

膜はホスホリピド，コレステロールなどを含み，水相とは異った相を形成する。そのため現在の一般的な精製法，水相カラムクロマト法，電気泳動法などがただちに利用できない。

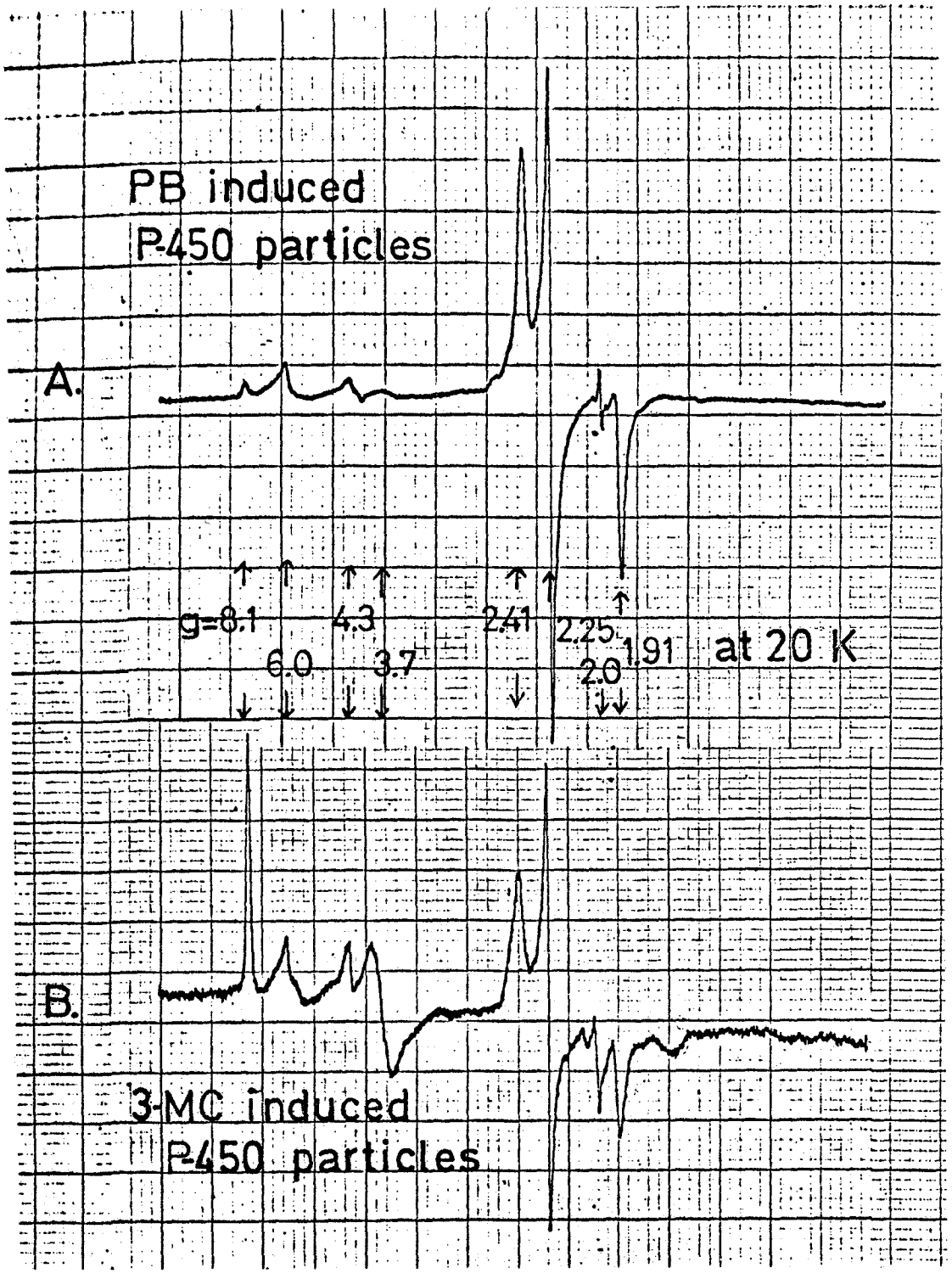
寒剤を使っての精製というのは低温で有機溶媒を使って脂溶性環境を溶出してたんぱくを残し，あと乾燥するか，ポリオール－水系の溶液を加えて水溶液にする方法である。

ミトコンドリアの成分の分離に常温ではコール酸などの処理で透明化することが多いが低温で脱脂するのには低温イソオクタンがしばしば使われる。リセプターたんぱくを含めて系統的に寒剤使用の精製法を行なっているのにSimon Freed 一派の研究がある。彼はもともと実験物理学者である。彼らが行なった研究の一つに脳のNa^+，K^+，Mg^{++} 依存性の ATPase に関するものがある。−75℃ クロロホルム－メタノールで脳組織を処理すると，酵素は変性しないで，膜のリピドが除かれてゆく。これに溶剤で抽出されたリピドを添加すると低下した活性が再現する。

③ 生化学物質の物性研究：ヘムたんぱくの低温分光測定は，1949年Keilin & Hartree によって吸収スペクトルが液体窒素温度で尖鋭化することが報告されて以来，1950年代の後半，Johnsohn 研究所で発達し，その後各所で用いられている。本低温センターだよりの第2号にも飯塚＆萩原によって詳しい紹介が記載されている。ヘム以外のフラビン酵素，NAD^+ 酵素については液体窒素温度あたりでは低温による尖鋭化はそれほど顕著ではなく，低温測定のメリットはそう多くは期待できない。

磁気学的測定ではFe，Cuなどの酵素の低温測定で興味のある成績が最近みられるようになってきた。それらについては磁気能率の測定，ＥＰＲ測定，ともに低温測定がよく使われる。ここではわれわれの取扱っているチトクロームＰ－450(P−450)について述べることにする。

P−450は本来ステロイド生合成などに重要な酵素であるが，生体の異物代謝にも関係し，発癌物質メチールコラントレン(3MC)に対しても顕著に反応を示すものである。ＥＰＲ上，g=2.41, 2.25, 1.91の異方性シグナルは低スピンP−450 の特徴的シグナルである。睡眠薬フェノバルビタール投与で著明にこのシグナルは増大する(図のＡとＢを比較)。3MC投与で奇妙なことに$g_\perp$=8.1, 3.7の異方性の大きい高スピン型のP−450が出現する(図のＢ)。この高スピン型は20Ｋ 以下でないと検出できない。医学部のＥＰＲでは20Ｋ測定ができなかったが，教室の市川教官が基礎工のＥＰＲの低温測定でｇ＝8付近のヘムとしては異常な吸収を見出していた。しかし距離的条件のため，測定頻度が少く，確かめるのに時日を要し，高スピン型P−450と断定するのをためらっていた間にPeisachらに先を越された。

3MCはP−450系で代謝を受け，その代謝物質がDNAと相互作用をもつことが知られてきている。このあたりの詳細な研究には20Ｋ以下の低温測定がわれわれには必須である。しかし液体水素の運

搬と使用に制限があり，液体ヘリウムにはさらに経済的制限が加わり，先の苦しい経験を繰り返す心配をつねに持っているのが現状である。