

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 山田 慎

チトクロム P450 は様々な臓器に存在して、ステロイドホルモンの生合成や薬物代謝(解毒)など重要な役割を果たしている。論文提出者が用いた P450 は、副腎皮質ミトコンドリアに存在し、コレステロールの側鎖を切断してプレグネノロンに変換する P450scc 及び化学発癌物質、メチルコラントレンで肝臓ミクロソームに誘導される P4501A2 (ラビット), P4501A1 (ラット) である。これらの P450 と電子伝達に關与する蛋白質間の相互作用に關する研究はこれまでも数多くあるが、P450 が膜内在性の蛋白質であるにも関わらず、その測定が多くが溶液中か膜-蛋白質系を壊して行ったものであった。これは P450 が不安定な蛋白質であり脂質膜への再構成が難しいことやスペクトル測定、カラムや架橋剤を用いた測定では脂質膜中での測定が困難であることに因っており、P450 が実際に機能している脂質二重膜中での測定が必要とされていた。

本論文「チトクロム P450 系における電子伝達相互作用の蛋白質回転運動による解析」は、チトクロム P450 を脂質膜中に再構成し、その回転ブラウン運動を時間分解偏光解消法(時間分解蛋白質回転拡散測定法)を用いて測定し、P450 系蛋白質間の電子伝達相互作用を明らかにした。

本論文で用いられた時間分解偏光解消法は、膜蛋白質を脂質膜中で非侵襲的にその回転運動を捉えることができるため、活性のある「生きた」状態での蛋白質間の相互作用の測定が、P450 が本来を発揮している脂質膜中において可能であり、なおかつミリ秒以下の短寿命の会合体でも検出できるという特徴を持つ、膜蛋白質間の相互作用を測定するのに適した測定法である。

本論文では、まず、ミトコンドリア型の電子伝達を行う P450scc をミトコンドリア膜の主要脂質であるフォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、カルジオリピンから成る脂質膜中にコール酸透析法で再構成した。P450scc への電子伝達に關与するアドレノドキシニン(ADX)とアドレノドキシニン還元酵素(ADR)は内在性のプローブを持たないため、リン光色素、エリスロシンで標識して、P450scc+ADX+ADR 系における ADX, ADR の回転拡散運動を測定した。この系に抗 P450scc 抗体を加えて、特異的に P450scc を凝集させると ADX, ADR の異方性の減衰は浅くなり、運動性の低下が見られた。この結果によって、ADX-ADR-P450scc という 3 者会合体が形成されることを明らかにした。そして、

この会合体の割合は10-12%であった。しかし、3者会合体はカラムクロマトグラフィーや架橋剤による架橋といった手法では殆ど検出できていないことから、本研究により検出された3者会合体は、これまでに提唱されていた寿命数十分以上という安定した会合体ではなく、ミリ秒程度の寿命を持つ、全く新しい会合体である。

第二に、ミクロソーム型の電子伝達を行う P4501A2 をミクロソーム膜の主要脂質であるフォスファチジルコリン、フォルファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリンから成る脂質膜中にコール酸透析法で再構成した。P4501A2 のみの系、P4501A2+P450 還元酵素系、P4501A2+チトクロム b5 系で P450 の回転運動を測定すると、P450 還元酵素、チトクロム b5 を加えると、加える前と比べて、異方性の減衰は深くなり、P4501A2 の運動性の上昇が見られた。この結果によって、P4501A2 が P450 還元酵素、チトクロム b5 と会合体を形成することを明らかにした。P4501A2 は膜蛋白質である P450 のうちでも、特に疎水的な蛋白質の1つであり、P4501A2 の脂質膜中へ再構成は本研究が初めてである。

第三に、P4501A1、P4501A1 と P450 還元酵素（共発現系）、P4501A1 と P450 還元酵素との融合酵素（融合酵素系）を酵母ミクロソームに遺伝子発現して、その回転運動を測定した。P4501A1 のみの系と比べて、共発現系では異方性の減衰が深くなり、P4501A1 の運動性の上昇が見られた。この結果によって、P4501A1 は還元酵素と会合体を形成することを明らかにした。更に、寿命 ∞ の安定した P450-P450 還元酵素複合体である融合酵素の異方性は、共発現系のそれとの間に有意な差が見られなかったことも、この解釈の妥当性を示す。メチルコラントレンでラットの肝ミクロソームに誘導される P450 は P4501A1、P4501A2 の2つであり、蛋白質精製過程においてこの2つの P450 を分離することは不可能であるため、脂質膜中に再構成した系でも P4501A1 のみの運動測定は不可能であった。本研究において、蛋白質精製という手段では単離不可能な P4501A1 と P4501A2 を、遺伝子発現法を用いることにより、単一種の P4501A1 として運動測定を可能にした。

以上をまとめると、論文提出者は、本研究において、脂質膜中で非侵襲的な運動測定が可能な時間分解偏光解消法で、P450 系蛋白質のみを再構成した系や単一種の P450 を遺伝子発現させた系を用い、厳密な蛋白質間相互作用の解析を可能とし、P450 系蛋白質間の電子伝達相互作用を明らかにした。これらの結果は生物物理学上、非常に有意義な貢献をしたものと認められる。

よって、審査委員一同、論文提出者山田慎は東京大学博士（学術）の学位を受けるに十分な資格があるものと認めた。なお、本論文の内容は、1995 年に

Biochemistry 誌, 1999 年に Biochemistry 誌, 2001 年に Journal of Inorganic Biochemistry 誌に公表済みである. これらは共著論文であるが, 論文提出者はそのすべてにおいて研究の主要部分に寄与したものであることを確認した.