

TOMY Micro Smash デモ機使用報告
(Micro Smash を用いた P450 酵素画分の調製)

北海道大学大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座・毒性学教室
石塚真由美

方法：

サンプル：ラット肝臓（♀adult）20-50mg

条件：ジルコニア（1.0）⁽¹⁾、ステンレス（5.5）

3000rpm、40 秒、冷蔵室にて使用（使用する数日前に冷蔵室へ設置）

ラット新鮮肝の一部を TOMY Micro Smash を用いてホモジネートにした。ホモジネートは 4°C、9000g で 20 分間遠心し、得られた上清を酵素画分（S9 フラクション）とした。対照として、同肝臓から従来の方法（ガラス・テフロンホモゲナイザー）によるホモジネートを作成し、同様に S9 フラクションを調製した。得られた S9 について、蛋白量およびシトクロム P450 量を測定し、比較した。

結果：

TOMY Micro Smash を用いた S9 フラクションでは、従来法による S9 画分の P450 濃度の 90% の P450 収量を得た。いずれの方法でも変性 P450 のピーク（420nm の吸光）は殆ど見られなかった。

結論：

P450 はミクロソーム画分（分子種によってミトコンドリア）に存在する膜結合型酵素である⁽²⁾。ポリトロンなどの方法では P450 が変性・破壊されるため、収量が減少することが知られている。しかし、TOMY Micro Smash を用いて作成したホモジネートでは変性 P450 も殆ど見られず、従来法とほぼ同等に短時間で簡便に酵素画分（S9 フラクション）を調製することができた。

⁽¹⁾ ジルコニアを誤って 30mg 使用してしまいましたが、さらに少量で大丈夫だと思われれます。

⁽²⁾ ミクロソーム画分は超遠心（105000g、60 分）操作が必要なので、今回は省略しました。

使用感想：

- 1) 酵素を破壊せずに酵素画分を調製することができた。得られた酵素画分の酵素活性（P450 による薬物代謝活性）に関しては測定していないので不明である。
- 2) チューブ容量が 1-2ml なので、少量かつ多サンプルの調製には非常に便利であると感じた。

- 3) 今回は Micro Smash を冷蔵室で使用し、特に問題は見られなかった。また、サンプル調製時間が短時間である為、冷蔵室を使用せずとも、サンプル調製時のバッファーやチューブを冷やすことでも対応できる可能性も考えられた（今回は試みませんでした）。
- 4) Micro Smash 使用時の速度や時間等については、詳細な検討を行っていないが、条件検討次第でさらに酵素収量度が上がることも考えられた。