

Title	STUDIES ON GLUCOHYDROLASES OF BOVINE SPLEEN
Author(s)	Fujimori, Ken
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/1014
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	藤 盛 健 ふじ もり けん
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 1 7 1 6 号
学位授与の日付	昭 和 4 4 年 3 月 2 8 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	ウシ脾臓グルコハイドロラーゼの研究
論文審査委員	(主査) 教授 二国 二郎 (副査) 教授 奥貫 一男 教授 佐藤 了

論 文 内 容 の 要 旨

グリコーゲン蓄積症第 2 型 (ポンベ氏病) は酸性グルコハイドロラーゼの欠損があることがみつかりされている。この酵素はマルターゼ作用の他にグリコーゲンをグルコースに分解する作用を有するといわれているがまだ充分精製されておらずその性質も明らかでない。私はこの酵素をウシ脾臓から抽出し硫酸, イソプロパノール, エタノール, アセトンによる分別沈澱, P-セルロース, DEAE-セファデックスクロマトグラフィー, アセトン分別沈澱で約 2500 倍精製しアセトンで酸性グルコハイドロラーゼ活性を持つ結晶標品を得た。酵素活性はマルトースおよびグリコーゲンを基質として用い生成するグルコースをグルコースオキシダーゼ法で測定する方法を用いた。マルトースを基質とした活性をマルターゼ活性, グリコーゲンを基質とした活性をグルコアミラーゼ活性とした。2 つの基質に対する結晶標品の酵素活性は pH, 阻害剤, 熱処理に対して異った挙動を示したポリアクリルアミド電気泳動法でマルターゼ活性を示す 2 つのバンドを持つザイモグラムを得たことからこの結晶標品が単一でないことが考えられたので続いてその分離を行なった。

結晶標品をセファデックス G-200 のゲル濾過にかけるとマルターゼ活性は 2 つの画分 (AI, BI) に現れたが AI 画分にはなお酸性マルターゼが混在していることが熱処理より明らかにされた。BI 画分は 1 種の酸性マルターゼのみを含むと考えられる。一方部分精製した酵素標品を同様のゲル濾過にかけ 2 つの画分 (AII, BII) を得たが BII 画分よりディスク電気泳動的, 超遠心的に単一な結晶標品が得られた。この結晶標品はその性質からみて先の結晶標品から分離した BI 画分と同一酵素であると考えられる。また AII 画分には AI 画分同様酸性マルターゼと中性マルターゼが混在していたがポリアクリルアミド電気泳動を応用しそれらの分離を試みたところこの画分には少なくとも 4 つの中性マルターゼが存在することがわかった。酸性マルターゼ, 中性マルターゼ各々のアイソザイム相互には酵素化学的な性質の差がみられなかったが中性と酸性マルターゼ間には至適 pH, 阻害剤に対する

挙動、基質に対する特異性などに顕著な差がみられた。

論文の審査結果の要旨

健康人の組織中にはグリコーゲンおよびマルトースを全部グルコースに分解するグルコヒドロラーゼと呼ぶ酵素があり、これが欠除するとポンペ氏病と称するグリコーゲン蓄積症を起すことが知られている。しかしこの動物性のグルコヒドロラーゼは抽出、精製が困難で充分研究されていなかった。

すでに、藤盛君はウシ脾臓からこの酵素を抽出し種々の方法で約2,500倍まで精製し、pH4.5で最もよく作用する酸性グルコヒドロラーゼを結晶として得ることに成功した。これは動物体から本酵素を結晶化した最初の仕事である。

しかしこの結晶酵素の性質を検討してみるとまだ単一の蛋白質でないことに気付いた。本主論文において、この酵素を更に純化して、単一蛋白質の結晶とし、その性質を詳しくしらべ、同時に旧結晶酵素に混在していた中性に至適pHを持つ中性グルコヒドロラーゼ4種を精製確認し、この酸性および中性の両種酵素の作用機構を明かにしたのである。

即ち旧結晶酵素をセフデックスG-200のゲル濾過にかけることによって酵素蛋白質をAおよびBの2区分に分け、A区分には主として中性酵素、B区分には酸性酵素のみが集ることを見出した。

そこで大量の部分精製酵素を同様の方法で精製し、B区分から酸性グルコヒドロラーゼを美しい板状結晶としてとり出した。この結晶はディスク電気泳動法および超遠心法によって全く単一の蛋白質であり、その分子量は43,000である。またこの酵素蛋白質のマルトース分解作用力とグリコーゲン分解作用力の比は1:1である。

次いでA区分中には数種の中性グルコヒドロラーゼの他に酸性グルコヒドロラーゼも混在していたので、この区分をさらにポリアクリルアミド電気泳動にかけ、4個の中性グルコヒドロラーゼ画分を得た。これらはまだ結晶化するに至っていないが、4種ともその作用、性質はほぼ同一であり、その蛋白構造に微小の差があるアイソザイムである。中性グルコヒドロラーゼは至適pHが7である他に、マルトース分解作用力がグリコーゲン分解作用力の約20倍である点で酸性グルコヒドロラーゼと大きく異っている。

以上藤盛君の研究は、動物性の酸性グルコヒドロラーゼを初めて結晶化してその性質を明かにした上、中性グルコヒドロラーゼの4種のアイソザイムを分割精製しその性質を明かにしたもので、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認めた。