



Title	STUDIES ON ENZYMES INVOLVED IN THE PURINE NUCLEOTIDE CYCLE IN RAT
Author(s)	Ogawa, Hirofumi
Citation	大阪大学, 1976, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/27731">https://hdl.handle.net/11094/27731</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	小 <sup>お</sup> 川 <sup>がわ</sup> 宏 <sup>ひろ</sup> 文 <sup>ふみ</sup>
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	第 3 7 1 4 号
学位授与の日付	昭 和 51 年 9 月 29 日
学位授与の要件	理学研究科 生理学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	プリンヌクレオチドサイクルに關与する酵素の研究

論 文 審 査 委 員	(主査)	春 名 一 郎
	教 授	
	(副査)	中 川 八 郎 教 授 佐 藤 了
	教 授	

### 論 文 内 容 の 要 旨

新しいアンモニア産生機構であるプリンヌクレオチドサイクル（略、サイクル）の生体内に於る代謝調節機構を明らかにすることを目的とした。即ちこのサイクルを構成する三つの酵素を単離し、その性質を検討することによって生体内での調節機構を考察した。

① アデニロサクシネートシンターゼ (AdSS) をラットの骨格筋から抽出し、熱処理、塩析、イオン交換及びゲルクロマトグラフィーによって 100 倍精製し、ダイヤ型の結晶化に成功した。この標品は物理化学的手法により、分子量 5 万のサブユニット 2 個からなる解離会合型の蛋白であることが推定された。この酵素は種々のスクレオシド三リン酸では影響を受けず、種々の二リン酸及び一リン酸で阻害される傾向をもつが、プリン代謝の分岐点に存在するにも拘らず、特異的な調節因子は見当らなかった。

② AdSS は解糖系の中間体であるフルクトース二リン酸で著しく阻害を受けた。この非拮抗的阻害は解糖系のオシレーションと、サイクルのその同調性をもたらすものと解釈された。③ 骨格筋及び心筋の AdSS の等電点は 8.8、肝臓及び癌細胞のそれは 6.0 の二つのアイソザイムの存在を明らかにした。④ アデニロサクシナーゼ (AdSase) は非常に不安定な酵素であるが、熱処理やグリセロール等の添加で精製を可能にした。⑤ 各組織の AdSase の等電点はほぼ中性であり、しばしば酸性側にマイナーピークがみられた。いずれも  $K_m$  値は他種のそれより 100 倍程大きかった。

⑥ AdSase は重金属イオン ( $Cd^{++}$ ,  $Hg^{++}$ ,  $Cu^{++}$  など) により著しく阻害され、SH 剤や EDTA の添加で活性が回復したので、この酵素反応には SH 基が重要な役役をもつことが示唆され、又この性質はサイクルを任意に抑制することを可能にした。⑦ 筋ホモジェネート残査から、新たに多量の

AdSSが抽出された。残査中のアクチンに結合していたのである。そのモル比は塩のない条件で1 : (AdSS : アクチン) に結合することが分った。肝臓のAdSSは結合しなかった。⑧ AdSSのアミノ酸組成はアクチンのそれと似ていた。特にLys, His, Arg, Asp, Glu, Pro, Ala, Ile含量は一致していた。⑨ AMPデアミナーゼも筋肉残査より抽出され、ミオシンとの相互関係が示唆された。

以上、筋肉内でこのサイクルは、運動（筋収縮）に呼応して、そのエネルギーを供給する解糖系と連関しながら（オシレーション）、収縮後の酸性に傾むいたpHを中和するために、積極的にアンモニアを放出する機構である、という仮説を提出したい。

### 論文の審査結果の要旨

筋肉の運動とアンモニア発生の関係は古くて新しい問題である。古くは1929年にParnasがカエルの筋肉についてこの現象を発見した。最近、Lowensteinは筋肉の運動時アミノ酸からアンモニアが遊離する際、三つの酵素から構成されるプリンヌクレオチドサイクル（アデニロスクシナート・シンテターゼ、アデニロスクシナーゼ、AMP-デアミナーゼ）が重要な役割を果たしていることを示唆した。

小川君は、このような経緯を踏えて、上記三酵素をラットの骨格筋から分離・精製し、再構成することによってアンモニア発生の機構を分子レベルで明かにしようと試み、以下のような興味ある知見を得た。

まず、ラットの骨格筋から初めてアデニロスクシナートシンテターゼを精製、結晶化することに成功し、この酵素が分子量5万の二つのサブユニットからなる解離・会合型の蛋白であることを超遠心、電気泳動、アミノ酸分析等の方法を用いて明かにした。また、この酵素が解糖の中間産物であるフルクトース-1,6-二りん酸で強く阻害されることを見出し、解糖の調節系（プリンヌクレオチドサイクルは解糖の律速酵素の一つであるホスホフルクトキナーゼの重要な活性化因子であるAMPの産生に直接関与している）との同調的調節の存在を明かにした。

更に、この酵素を種々の組織について電気泳動的に比較し、収縮器官（骨格筋、心筋）に存在するものと、非収縮器官（肝臓、腎臓、癌細胞）に存在するものとは明かに異なることを証明した。この研究成果は、一つには解糖、アンモニア発生と、核酸の構成成分であるプリンヌクレオチドの相異がアイソザイムによって説明できる可能性を示唆し、他方では筋肉の収縮機構とこれらの酵素群との機能的相関を示唆している。

小川君は特に後者の可能性に着目して研究をすすめ、アクチンとシンテターゼとの特異的結合を証明した。上述の実験事実と、Suelter, 白木らによって証明されたAMP deaminaseとミオシンとの結合とを考え合せると、収縮蛋白上でプリンヌクレオチドサイクルが作用する可能性が強く、今後の解糖と筋収縮の関係を解明する一つの手がかりを与えるものと評価される。

また、従来、取扱いが困難とされてきたアデニロスクシナーゼの部分精製にも成功し、この酵素の

臓器相関とともに興味ある事実を示した。

以上のように、小川君の研究成果は、骨格筋でのアンモニア代謝が、筋収縮蛋白と解糖とが密接に結びついてなされることを酵素レベルで解明した。よって、本論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。