



Title	フォスフォリールエタノラミン形成について
Author(s)	林, 喜一
Citation	大阪大学, 1965, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28724
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	林	喜	一
	はやし	き	いち
学 位 の 種 類	医	学	博 士
学 位 記 番 号	第	6 9 7	号
学位授与の日付	昭 和 40 年 3 月 26 日		
学位授与の要件	医 学 研 究 科 生 理 系 学位規則第5条第1項該当		
学 位 論 文 題 目	フォスフォリールエタノラミン形成について		
	(主査)	(副査)	
論 文 審 査 委 員	教 授 坂本 幸哉	教 授 山村 雄一	教 授 須田 正己

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

1949年 Outhouse によって牛の腫瘍組織中にフォスフォリールエタノラミン (p-E) の存在することが発見されその後正常組織中にも発見されたが特に脾臓、胸腺、膵臓において多くみとめられる (Awapara et al, Smith et al)。最近我々の教室では増殖組織、たとえば腹水肝癌や再生肝では正常肝よりもかなり多量の P-E が含まれていることを報告した。P-E はエタノラミン (E) より ATP の存在下で Kinase の作用で形成され、さらに CDP-E となりフォスファティディールエタノラミン (Pd-E) が形成されると一般に考えられている。そこで著者は P-E の増加の原因を知るために先ず Kinase 作用につき調べることにした。1953年に Wittenberg et al が酵母より ATP の存在下にコリン、エタノラミンおよびエタノラミンの誘導体をそれぞれの O-リン酸エステルにする酵素を見出しこの酵素をCholine phosphokinase とよんだ。また動物組織のアセトン粉末にこの酵素活性を認めて報告しているがその詳細は明らかでなかった。著者は C^{14} -E を基質として家兎の肝臓が ATP 存在下に P-E を生成することを明らかにし、この酵素を部分的に精製しその性質を検討した。(この酵素を便宜上エタノラミンカイネース <E-kinase> と呼ぶことにする) また腫瘍組織における E-Kinase 活性も測定した。

〔方法並びに成績〕

酵素の精製一体重 2000~2500 g の ♂ 家兎の肝臓を5倍量の 0.25 M Sucrose 液と共に Waring Blender で homogenize し 10,000×g で15分間遠心を行ないその上清をさらに 105,000×g で1時間遠心しその上清を使用した。以下精製の操作は 0°~4°C で行なった。上清の 26~40% 飽和硫酸分画を取り 0.005M Tris 緩衝液に透析後 Ca-phosphate-gel に吸着させ、0.05M リン酸緩衝液で脱着させ、約6倍に精製した。この酵素標品を用いて以下の実験を行なった。

酵素活性測定法—反応系は 0.2M Tris 緩衝液, pH 8.0; MgCl_2 30 mM; ATP 10 mM; 1, 2- C^{14}E 0.7 μC ; E. 7.5 mM; 及び酵素液よりなり総液量 2.0 ml とし 37°C, 30 分間反応させた後 100°C, 3 分間の加熱で反応を止める。生成した 1, 2- $\text{C}^{14}\text{p-E}$ を及川等の方法により Amberlite CG 120(H^+) 200~400 mesh を用いて column chromatography を行ない, P-E 分画を集め濃縮してその c. p. m. を Gas-flow-counter で測定した。N 量は micro Kjeldahl の方法, 蛋白量は Folin の方法, P は Fisk-Subba Row の方法で測定した。

至適条件 — pH の影響については家兔の E-Kinase の活性は pH 8.0~8.5 の間で最大となった。ATP と MgCl_2 の濃度を一定に保ち E の濃度を変えて P-E 形成速度を測定した。そして Lineweaver-Burk の法で K_m を求めると $1.55 \times 10^{-3}\text{M}$ であった。同時に Choline phosphokinase の K_m を同様にして測定すると $1.43 \times 10^{-3}\text{M}$ であった。

基質特異性 — K_m よりわかるようにこの肝臓の酵素はコリンに対しても強い Affinity を有している。Rate-limiting 濃度の $\text{C}^{14}\text{-E}$ の存在下ではコリンは $\text{C}^{14}\text{-PE}$ の形成を阻害した。この阻害は competitive のようである。

Activation and Inhibition—Mg を絶対的に必要とする。最大活性は 30 mM の MgCl_2 の存在で得られた。10⁻³M EDTA で 80% 阻害がみられた。10⁻⁴M PCMB では活性に変化を示さなかった。システインは必ずしも必要としない。60°C 5 分間の Preincubation 後では活性は 86% 低下していた。

癌組織における活性 — 動物は雄白ネズミを用いた。腫瘍株は DAB 肝癌では 6 ヶ月~7 ヶ月間 DAB を投与したもの, 及び AH 130 株で 7 日間後の腹水 0.5 cc を腹腔内で継代接種されたものを用いた。DAB 肝癌では正常コントロールに比し比活性は 50~60% で AH 130 株細胞上清ではやや低下している程度であった。

〔総括〕

以上著者は動物組織の E のリン酸化機構についてしらべた。E のリン酸化には, ATP 及び Mg^{++} イオンが必要であり EDTA はこれを阻害した。この酵素はコリンにより competitive に阻害を受ける。最近 Mc Caman は家兔の脳より Choline phosphokinase を部分的に精製し神経組織におけるその性質を報告したが著者の成績と考え併せ同一酵素の可能性が考えられるが, さらに単一まで精製する必要がある。肝臓組織ではこの酵素活性はやや低下していた。以上より肝癌組織に P-E の含量の高いのは E からの形成が増加しているのではないように思われる。むしろ P-E からの Pd-E 合成が低下しているのではないかと考えられるので今後この方面の研究を進めたい。

論文審査の要旨

コリンはりん脂質の中間代謝において重要な位置をしめるが, これをりん酸化する酵素, 即ちコリンフォキナーゼに関しては 2.3 報告があり, この酵素はエタノラミンをもりん酸化すると考えられてい

る。しかしフォスホリールエタノラミンの定量法が確立されていなかった為エタノラミンフォスホキナーゼとしての研究はなされていなかった。本論文は及川等の定量法により家兎肝中にエタノラミンをりん酸化する酵素の存在することを証明しかつ部分的に精製してその性質を調べた。

本酵素は Mg^{++} を必須とし、至適 pH は 8.0~8.5 にある。コリンによって拮抗的に阻害される。さきに教室の及川等はラットの再生肝や腹水肝癌細胞にはフォスホエタノラミンが増加していることをみとめた。フォスホエタノラミンの増加の原因としてはエタノラミンナーゼの活性増加及びフォスホエタノラミンのフォスファチジルエタノラミンへの合成の低下が考えられるが、著者はその原因がエタノラミンキナーゼにあるのではなく、フォスファチジルエタノラミンへの合成能が低下しているためであろうという回答と推察を与える結果を得た。以上本研究はエタノラミン代謝を明らかにすると共に癌細胞の特異性に関して新しい知見を与えた。