The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Serine Hydroxymethylaseに関する研究
Author(s)	中野, 陽典
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29128
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

【29】

氏名・(本籍)	中野陽典（なかのようすけ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1164 号
学位授与の日付	昭和42年3月28日
学位授与の要件	医学研究科外科系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**Serine Hydroxymethylase に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 芝 茂 (副査) 教授 山野 俊雄 教授 坂本 幸哉

論文内容の要旨

〔目　　的〕

さきに私どもの研究室の高見等は，Vitamine B_6 と細胞増殖との関係を Rat 再生肝を材料として検討したが，その際 Vitamine B_6 欠乏のRat肝内 B_6 酵素の活性は大多数において著しく低下するにもかかわらず，生体内の active C_1 の転移に重要な意義をもっと考えられている Serine Hydroxymethylase (SHM) 活性のみがほとんど低下を示さないという興味ある事実を見出した。そこで私は，細胞増殖の場におけるこの酵素の役割に興味をもち，細胞内におけるこの酵素の局在を中心として酵素化学的な検討を加えた。

〔材料および方法〕

1．酵素材料

成熟 Wistar 系雄性 Rat の肝臓を Hogeboom & Schneider の方法で細胞分画し，その可溶性およびミトコンドリア画分を酵素材料とした。

2．SHM の測定法

SHM は次の反応を触媒する。

$$\text{L-Serine}+\text{Tetrahydrofolate} \underset{b}{\overset{a}{\rightleftarrows}} N^5, N^{10}\text{- Methylenetetrahydrofolate}+\text{Glycine}+H_2O$$

a） Serine および Tetrahydrofolate を基質としたときの酵素活性の測定法。

反応 a に関する SHM 活性の測定は，過剰の $NADP^+$ および N^5, N^{10}-Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase の存在下で行ない生成物である N^5, N^{10}-Methylenetetrahydrofolate が，N^5, N^{10}-Methenyltetrahydrofolate に変化する際に生じてくる NADPH の単位時間あたりの生成量で測定した。

b） Glycine および N^5, N^{10}-Methylenetetrahydrofolate を基質としたときの酵素活性の測定法。

まず過剰の HCHO と Tetrahydrofolate を混合しnon enzymaticに N^5, N^{10}-Methylenetetrahydrofolate

を形成せしめ，これにGlycineを加えて，SHMを働かしめるとL-SerineとTetrahydrofolateが生成される。この生じたTetrahydrofolateは過剰に存在するHCHOと反応しN^5, N^{10}-Methylenetetrahydrofolateを再生する。このことを利用してHCHOの減少を測定しその活性をみた。

〔成　　績〕

1．細胞各画分内のSHM活性の分布

Hogeboom & Schneiderの方法で分画した可溶性画分，ミトコンドリア画分ならびに700 g沈渣についてSHM活性の分布をみたが，それぞれ40〜60%，20〜40%ならびに20%の割合であった。マイクロソーム画分には，ほとんど活性を認めなかった。このうち700 g沈渣には核成分のほかにミトコンドリアおよび完全細胞の夾雑があると考えられるのでそれについては後にあらためて検討することとし，今回は可溶性画分およびミトコンドリア画分のSHMについて吟味した。

2．可溶性画分SHM (s-SHM) およびミトコンドリア画分SHM (m-SHM) の精製。

1）s-SHMの精製

可溶性画分を硫安分画（43〜58%），熱処理（70°C 3分），再度硫安分画（43〜53%）を行ない，さらにDEAE Cellulose Column Chromatographyにより1.94 units/mg proteinの比活性をもつものを得ることができた。(1 unitは37°Cで1分間に1 μmoleのHCHOを減少せしめる酵素量)

2）m-SHMの精製

ミトコンドリア画分を熱抽出(65°C, 3分)硫安分画（43〜53%）を行ない，さらにBrushite Column Chromatographyにより2.83 units/mg proteinの比活性をもつものを得ることができた。(1 unitは1）に同じ)

3．sおよびm-SHMの諸性質の比較

1）反応至適pH

s-SHMの反応至適pHは7.5附近にあり，m-SHMのそれは6〜8の広域にあった。

2）各基質に対するKm値

s-SHM, m-SHMとも各基質に対する値は非常によく類似しておりSerine, Glycine, Tetrahydrofolate, N^5, N^{10}-Methylenetetrahydrofolateに対するKm値は，それぞれ5.4×10^{-4}M, $1.2\sim1.8\times10^{-3}$M, $3.6\sim5.0\times10^{-6}$M, 6.3×10^{-5}Mであった。

3）DEAE Cellulosoに対する吸着性

s-SHM, m-SHMをそれぞれDEAE Cellulosoに吸着させ，pH 6.5の燐酸カリ緩衝液の20〜300 mMのgradient elutionを行なうと，

s-SHM活性は150 mM附近に，m-SHM活性は70 mM附近に溶出された。またs-SHM, m-SHMを混合して同条件のgradient elutionを行なうと70 mM, 150 mMに活性のpeakをもつ2相性のPatternが得られた。

4）安　定　性

部分精製したs-SHMはm-SHMに比して不安定であった。この不安定なs-SHMは基質であるSerine, Glycineにより完全に保護されるが，SH化合物では部分的に保護されるのみで，EDTAおよび補酵素であるPyridoxal phosphateによっては保護されなかった。

〔総　　括〕

Rat 肝細胞の可溶性画分，およびミトコンドリア画分に存在する SHM を精製し，その諸性質を検討したところ反応至適 pH, DEAE Cellulose に対する吸着性および安定性の面で s-SHM は m-SHM と異なっていた。このことは両者が蛋白としての性質を異にする Isozyme である可能性を示唆するものである。

論文の審査結果の要旨

Serine Hydroxymethylase は Serine, Glycine の代謝および C_1-Unit の形成に重要な役割をはたしている酵素と考えられている。しかしいまだこの酵素に関する詳細な研究は少ない。

本研究は，まずラット肝の細胞質上清画分，およびミトコンドリア画分よりSerine Hydroxymethylase を精製し，その両画分酵素の諸性質を比較検討したもので，特に反応至適pH, DEAE セルローズに対する吸着性，安定性および電気泳動の面で，性質のことなることを示し両画分の酵素が Isozyme であることを明らかにした。

すなわち，本研究は，Isozyme が単なる分子形態ばかりの興味でなく生理的，代謝的または遺伝，発生進化という面でも重要視されていることから考えても，本酵素の生体内での意義をあきらかにするための第一歩であると考えられる。したがって今後この方面の研究にきわめて重要な文献となりうるものと思う。