



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

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 1 1 6 4 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 B₆ 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 B₆ 欠乏のRat肝内 B₆ 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 C₁ 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。

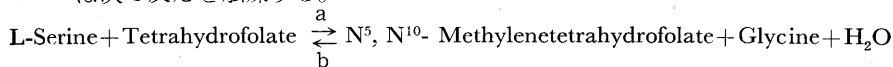
〔材料および方法〕

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。



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 N⁵, N¹⁰-Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase の存在下で行ない生成物である N⁵, N¹⁰-Methylenetetrahydrofolate が, N⁵, N¹⁰-Methylenetetrahydrofolate 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 N⁵, N¹⁰-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 N⁵, N¹⁰-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 N⁵, N¹⁰-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。マイクログソーム画分には、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

可溶性画分を硫酸分画 (43~58%), 熱処理 (70°C 3 分), 再度硫酸分画 (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 μ mole 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) 硫酸分画 (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, N⁵, N¹⁰-Methylenetetrahydrofolate に対する Km 値は、それぞれ $5.4 \times 10^{-4}M$, $1.2 \sim 1.8 \times 10^{-3}M$, $3.6 \sim 5.0 \times 10^{-6}M$, $6.3 \times 10^{-5}M$ であった。

3) DEAE Cellulose に対する吸着性

s-SHM, m-SHM をそれぞれ DEAE Cellulose に吸着させ、pH 6.5 の磷酸カリ緩衝液の 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 C₁-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, 性質の異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。