

Title	ラット肝セリン脱水酵素の結晶化に伴うシスタチオン合成酵素の分離
Author(s)	木村, 博司
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29522
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【11】

氏名・(本籍)	木 村 博 司 き むら ひろ し
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 3 7 6 号
学位授与の日付	昭 和 4 3 年 3 月 2 8 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
学位論文名	ラット肝セリン脱水酵素の結晶化に伴うシスタチオン合成酵素の分離
論文審査委員	(主査) 教 授 須 田 正 巳 (副査) 教 授 田 中 武 彦 教 授 山 村 雄 一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

1959年 Selim and Greenberg はラット肝よりセリン脱水酵素 (SDHと略す) を約70倍精製して SDHは同時にスレオニン脱水酵素 (TDHと略す), シスタチオン合成酵素 (CTSと略す) の三つの活性を触媒する多作用酵素 (multifunctional enzyme) として報告した。最近ホルモンあるいは食餌性による酵素活性の変動について多くの報告がされ, 当研究室の石川らにより SDHは糖新生における律速酵素 (marker enzyme) として注目された。一方 CTS は肝臓でメチオニンからシスチン合成経路上, 最初の不可逆反応でシスチン合成の律速酵素であることが予想され, 当研究室から加藤らによりその調節機作について報告されている。このように代謝機能のちがいを示す酵素が同一の蛋白であるとは考えにくく, この点を一層あきらかにするために SDH を精製して SDH と CTS は同一の酵素蛋白で触媒されるものか, 異った酵素であるかをあきらかにすべく以下の実験をおこなった。

〔方法ならびに成績〕

(1) SDHの精製と結晶化

約100~200匹の雄ウィスター系ラットに高蛋白食を5日間与えSDHの活性を上昇させる。肝臓より粗抽出液を得て, 硫酸分画 (30~45%), アセトン分画 (44~67%) 2回, DEAE セルローズカラムクロマトグラフィを行なって約100倍に精製された。DEAE 溶出液を更に硫酸50%で分画を行ないその沈澱物を少量の緩衝液に溶解し不溶性蛋白を遠沈して沈澱を更に2回抽出して上清を混合した。これを4°C数時間放置すると結晶が出はじめ, 更に2~5日放置後針状の結晶を得た。約500倍に精製りされ各ステップで SDH/TDH の活性比はほぼ一定であり, SDH, TDH は同一の酵素蛋白により触媒されることを確認した。結晶は超遠心, 電気泳動, 免疫学的に単一であり4°Cで最低3

ヶ月は安定である。

(2) 家兎免疫血清の作製

結晶SDH約1~2mgをFreund's complete adjuvantでエマルジョンにして、家兎の大腿筋に数ヶ所注射した。2週間毎に計3回注射して1週間後試験採血により抗体の産生をたしかめ、腹部大静脈より100~150ml採血し、硫酸で濃縮して1mlあたり10unitsのSDHを中和する抗SDHを得た。

(3) CTS活性測定および抗SDHの影響

serine-U- C^{14} 0.01M (Sp. Act. 7400 cpm/ μ mole), L-homocysteine thiolactone 0.04M (使用直前にアルカリで開環する), dithiothreitol 0.001M, EDTA 0.001M, Tris-HCl buffer pH 8.6, 0.1M, enzyme solution. 全量0.5mlで37°C 15分間 incubate して8% TCA 0.5ml 加えて反応を止める。遠心除蛋白後、上清0.5mlに脱イオン水20ml加えてDowex 50W-Z 8 (0.9×3cm) に apply する。更に脱イオン水10mlでカラムを洗い、0.4N HCl 30ml で C^{14} -serine を溶出、次で IN pyridine で C^{14} -cystathionine を溶出して gas flow counter で測定した。肝抽出液に抗SDH, TDH, SDSの活性に対する影響をしらべた。SDH, TDHは同様に阻害されるがCTSは影響されなかった。

以上の結果により免疫学的にもSDH, TDHは同一の蛋白でありCTSは異種蛋白であることはあきらかになった。

(4) Sephadex G-200 によるSDHとCTSの分離

CTSはSephadex G-200にretentionされずその分子量は20万以上であり、SDHとの分量の差を利用して分離することができる。

(5) 結晶SDHの諸性質

補酵素としてピリドキサル磷酸(PakPと略す)を必要としcysteine又はhydroxylamine処理によって得られたapoenzymeにはない。PALPの解離定数は 3.7×10^{-1} Mで、結晶酵素に結合しているPALPは蛋白1分子であった(Wada and Snell法で測定)。沈降定数 $S_{20,w}$ は4.25S分子量63,600(沈降平衡法)、等電点はpH 6.73である。酵素活性のpH optimumは8.3, serineおよびthreonineに対する K_m は 5.7×10^{-2} M, 8.7×10^{-2} Mであった。又SH阻害剤に感受性がよく、PCMB 6×10^{-6} M 半阻害を受ける。

(6) SDHとCTSの代謝変動

種々の代謝条件でSDH/CTS比を測定した。無蛋白食物でその比は2.3, 高蛋白食では74.3, と著明な差を示し、又ホルモンによりtriamcinolone投与で5.4, glucagon投与で4.0, alloxan diabetesで60.1, diabetesにinsulinを投与すると6.8となり代謝調節のうえからも以上の様な両酵素の応答の差異から別の酵素であることは想像される。又、栄養実験においてCTSはcystine添加食を3~5日間投与すると30~60%の低下がみられるがSDHは著明な変化を受けなかった。

〔総括〕

(1) ラット肝よりSDHの結晶化

(2) 結晶化されたSDHにはTDH活性は認められるがCTS活性は認められない。又免疫学的に

もSDHとCTSは別個の酵素蛋白であり、この諸事実は両酵素が代謝変動時にその応答に著しい差異があることをよく説明し得たものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

セリン脱水酵素〔SDH〕とシスタチオン合成酵素〔CTS〕は、従来同一酵素が基質により別々の反応を触媒すると考えられていた。〔SDH〕はアミノ酸から糖新生につながる律速酵素であり、一方〔CTS〕はメチオニンからシスチンの代謝経路上、律速酵素である。この様に異なった生理機能を示す二つの酵素が同じ酵素蛋白であるか否かに多大の疑問がもたれた。

著者はラット肝臓より〔SDH〕を精製し、初めて結晶化に成功した。この結晶標品にはCTS活性は含まれず、又抗SDH家兎抗体によりCTS活性は阻害されない。この知見にもとずいて両酵素を分離定量し、種々の代謝変動下で〔SDH〕と〔CTS〕は全く異なった応答をすることがあきらかになった。

本論文は従来の見解に対して代謝調節上および酵素化学上、明確な解答を与えたもので学位論文としての価値を認めるものである。