

Title	Glutamic-Oxaloacetic Transaminase (G. O. T) アイソザイムのC末端アミノ酸
Author(s)	渡辺, 建彦
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29539
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	渡 辺 建 彦 わた なべ たけ ひこ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1401 号
学位授与の日付	昭 和 43 年 3 月 28 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	Glutamic-Oxaloacetic Transaminase (G. O. T) アイソザイムのC末端アミノ酸
論文審査委員	(主査) 教 授 山 野 俊 雄 (副査) 教 授 坂 本 幸 哉 教 授 萩 原 文 二

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

細胞上清分画とミトコンドリア分画より精製結晶化された Glutamic-Oxaloacetic Transaminase について物理化学的, 反応動力学的, 免疫化学的研究が行なわれ, 両者の違いからアイソザイムであることが指摘された。さらにアミノ酸分析, N末端アミノ酸の分析からタンパク質の構造上の違いも認められるようになった。筆者は両者のC末端アミノ酸の決定を試み, とくに最近, 松尾らによって開発されたペプチドのC末端アミノ酸の選択的トリウム化法を, 高分子である本アイソザイムに適用して両者のタンパク構造上の差異を明らかにしようとした。

〔方法ならびに成績〕

GOT の精製:

ブタ心筋の細胞上清分画とミトコンドリア分画より鏡山の方法で精製した。(それぞれを s-GOT, m-GOT と略す。)

カルボキシペプチダーゼ (CPase) A および B による分解:

s-GOT および m-GOT はともに native な状態では全く CPase の作用をうけないので pH 3.0 で 100°C 3分間加熱したのち消化を行なった。CPase A は Worthington 社製品を 3回再結晶し, CPase B は Diisopropylphosphofluoridate 処理した同社製のものを用いた。反応はともに 30°C, 1%重曹中に行ない, 試料の 1/20~1/100 の CPase A, 1/100 の CPase B を用いた。遊離してきたアミノ酸の同定は除蛋白, 除塩後, 定性的には二次元ペーパークロマトグラフィー (ピリジン: アセトン: アンモニア水: 水=50:30:5:20: イソプロパノール: ギ酸: 水=80:10:10) により, 定量的には柳本製 LC-2 型アミノ酸自動分析機によって行なった。

s-GOT に対し CPase A を作用させたときはイソロイシンならびにグルタミンが反応初期に速か

に遊離され、つづいてバリン、スレオニン、リジンなどが現われた。グルタミンはアミノ酸分析機ではセリンとの分離が困難であったが、ペーパークロマトグラフィーの成績からセリンは否定された。定量的には 2N HCl にて、110°C、3時間の加水分解ののち、増加するグルタミン酸の量でもって測定した。

m-GOT に CPase B を作用させたときは、1.0 μ mole の m-GOT 当り 1.45 μ mole のリジンのみが遊離してきた。

ヒドラジン分解：

両アイソザイムのヒドラジン分解を種々の条件下（105°C、5~20時間、非触媒法；80°C、36時間、硫酸ヒドラジンによる触媒法）で試みたが、有意の量のアミノ酸の遊離を認めなかった。グルタミン、アスパラギンならびに塩基性アミノ酸に対してヒドラジン分解法は適用困難であるため、CPase による分解の結果と考え合わせて、s-GOT の C 末端はグルタミン、m-GOT それはリジンであると推定した。これを確かめるために C 末端アミノ酸の選択的トリチウム化法を試みた。

C 末端アミノ酸の選択的トリチウム化：

種々の条件を検討した結果、下記の如き方法を用いて行なった。タンパク質 5 mg を 0.3 ml ピリジンにとかし、0.1ml T₂O (ca 50mC), 0.05ml 無水酢酸を加えて 37°C に 20 時間保った後、一夜流水透析し、さらに減圧下に乾燥、洗浄を 3 回行なった。6N HCl にて 105°C、38 時間加水分解後、高圧ロシ電気泳動 (66 V/cm, pH3.6), ペーパークロマトグラフィーでアミノ酸を分離し、ペーパーの小片を 10ml の phosphor solution (0.4% 2,5-diphenyloxazole と 0.01% 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzene のトルエン溶液) 中につけて、Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer で放射能を測定した。

s-GOT の場合はグルタミン酸にのみ、m-GOT の場合はリジンにのみ放射能が集中した。なお、本法による半定量化の試みとして、s-GOT と m-GOT を 1 : 1, 2 : 1 に混合してトリチウム化を行ない、グルタミン酸とリジンへのカウントのとりこみを調べると、それぞれほぼ 1 : 1, 2 : 1 であった。s-GOT と m-GOT の分子量がほぼ等しいこと、m-GOT の CPase B 消化による C 末端リジンの残基数は 1 モル当り 2 モルであることから、s-GOT の C 末端グルタミンも 1 モル当り 2 モルであると考えられる。従って両アイソザイムとも 2 本のおそらく同一のペプチド鎖からなる構造をもっていると考えられる。

〔総括〕

ブタ心筋 s-GOT, m-GOT の C 末端アミノ酸をカルボキシペプチダーゼによる消化、ヒドラジン分解、C 末端アミノ酸の選択的トリチウム化法により分析した結果、それぞれ 1 モルにつき 2 モルのグルタミン、リジンであると結論した。これによって GOT アイソザイムの化学構造上の一つの違いが明らかになった。

論文の審査結果の要旨

カルボキシペプチダーゼ法，ヒドラジン分解法と，高分子タンパクにはじめて適用した選択的トリチウム化法によって，ブタ心筋 s-GOT と m-GOT の C 末端アミノ酸をそれぞれ酵素 1 モルあたり 2 モルのグルタミンと 2 モルのリジンであると決定した。これにより両アイソザイムの一次構造の違いと，2 本のペプチド鎖からなることが明らかになった。したがって有意義な研究であると考えられる。