



Title	ネズミ肝臓ATPクエン酸リアーゼの免疫化学的研究
Author(s)	福西, 啓八
Citation	大阪大学, 1969, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/29657
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

ネズミ肝臓 ATP クエン酸リアーゼの免疫化学的研究

福 西 啓 八

Immunochemical Studies on ATP Citrate Lyase of Rat Liver

Keihachi FUKUNISHI

(昭和43年12月24日受付)

序 言

ATP クエン酸リアーゼ [ATP citrate lyase; EC 4.1.3.8; ATP: citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating and ATP-dephosphorylating)]; 以下 ACL と略す] は、1953年 Sreene と Lipmann¹⁾ によってハト肝臓より見出された酵素であつて、Sreene^{2,3)} は本酵素を citrate cleavage enzyme

と命名し、フギの反応を触媒することを明らかにした。

クエン酸 + ATP + CoA $\xrightarrow{M^{++}}$ アセチル CoA + オキサロ酢酸 + ADP + P_i

本酵素はその後、脳、腎臓、心臓、脾臓、脂肪組織などの各種動物組織^{2,4)}の可溶画分に広く分布していることが証明された。

本酵素の活性、とくに肝臓および脂肪組織の酵素は種々の食餌性およびホルモン性誘導を受け、⁴⁻¹²⁾ 飢餓や糖尿病では著明な活性低下を示し、高糖食あるいはインスリン投与により著しい活性上昇をきたす。その生理的意義については長らく不明であったが、最近 Lowenstein^{5,6)} および Chaikoff⁸⁾ によつて、本酵素が脂肪酸合成系の重要な律速酵素の一つであることが明らかにされるにあつて、にわかに注目を浴びるようになってきた。

しかしながら、本酵素の性状については未だ十分明らかではなく、むしろ Snare^{2,3,13)} がニワトリ肝臓酵素に部分精製を加え、その

性質の若干について報告しているにすぎない

。

本研究においては、生理的重要性の強調されているネズミ肝臓の本酵素の精製を行なつて、物理化学的にのみならず、免疫化学的にも均一な標品をうることに成功し、さらにその抗酵素血清を用いて本酵素の免疫化学的諸性質を明らかにした。また肝臓における本酵素の活性の変動についても免疫化学的手段を用いて検討を加えた。

実験材料ならびに実験方法

実験には雄性、ウィスター系ネズミ（体重200g前後）を使用し、普通食としてはオリエンタル酵母株式会社製の固形試料MFを用いた。

1. 酵素精製

1) 粗酵素：上記ネズミを2日間絶食後、

高蔗糖合成食⁹⁾を3日間自由に摂食させて肝臓の本酵素活性を約10倍誘導したのち、肝臓を摘出(1回の酵素精製に肝臓約550g使用)し、4倍量の0.02Mトリス緩衝液(pH8.0)を含む0.25M蔗糖液を用いてPotter-Elvehjemガラスホモジナイザー中で磨砕し、15,000×gで30分、ついで105,000×gで30分遠心した上清をとる。この上清に本酵素の安定化に必要な2-メルカプトエタノール、 $MgCl_2$ をそれぞれ0.01M、0.001Mとなるように加えた。以後の操作はこの両試薬の存在下に、温度0~4℃のもとで行なった。

2) 硫酸分画：粗酵素について硫酸分画を行ない25~45%画分を集めて0.01Mトリス緩衝液(pH7.8)に溶解し、30倍量の同じ緩衝液に對して一昼夜透析する。

3) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー：前記透析酵素(25.3g蛋白)を蛋白含量が20mg/mlになるように0.01Mトリス緩衝液(pH7.8)にて稀釈し、これをDEAE-セルロースカ

ラム (直径 8 cm, 高さ 35 cm) に吸着させ、 0.005 M トリス緩衝液 (pH 7.4) を含む $0.02 \sim 0.4$ M KCl の連続勾配で溶出する。比活性 0.4 以上の活性画分を集め硫酸 40% 飽和で濃縮したのち、少量の 0.005 M トリス緩衝液 (pH 7.4) にとかし 200 倍量の同じ緩衝液に対して一昼夜透析する。

4) アルミナ C_{γ} ゲル吸脱着 : 前記透析標品に 1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加えて pH を 6.8 に補正したのち、蛋白量と同量のアルミナ C_{γ} ゲルを加えて酵素を吸着させる。 200 ml の 0.01 M クエン酸カリウム (pH 7.4) で2回洗滌後、 200 ml の 0.15 M クエン酸カリウム (pH 7.4) で3回ついで 200 ml の 0.3 M クエン酸カリウム (pH 7.4) で1回溶出する。溶出液をあわせ、硫酸 40% 飽和で濃縮したのち、少量の 0.005 M トリス緩衝液 (pH 7.4) にとかし 200 倍量の同じ緩衝液に対して一昼夜透析する。

5) ブラシャイトカラムクロマトグラフィ : 前記透析酵素をブラシャイトカラム (蛋白 1 mg に対してブラシャイト 1 ml) に吸着さ

せ、 0.07M リン酸カリウム緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) で溶出し、比活性 3.8 以上の画分を集める。

6) 第1回セファデックス G-200 ゲルろ過：前記画分に飽和硫酸を硫酸 40% 飽和になるように加え、えられた沈渣を少量の 0.05M クエン酸カリウム ($\text{pH } 7.4$) を含む 0.01M トリス緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) に溶解したのち、酵素液の 50 倍量のセファデックス G-200 カラム (同じ緩衝液で洗滌) 上に重層し同じ緩衝液で溶出する。比活性 5.5 以上の活性画分を集める。

7) 第2回セファデックス G-200 ゲルろ過：前記活性画分を硫酸 40% 飽和で濃縮して、前と同様にして再びセファデックス G-200 ゲルろ過を行なう。同じ比活性 (6.25) をもつ活性画分を集める。

2. 超遠心分析

精製酵素を 0.01M α -メルカプトエタノール、 0.001M MgCl_2 、 0.05M クエン酸カリウムを含む 0.01M トリス緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) に対して透析し、蛋白濃度を 8 mg/ml に調製したのち、日立 UCA-1 型

超遠心機を用いて14~17℃で回転速度52,100rpmで超遠心分析を行ない、5分間隔で沈降像を撮影した。

3. 移動界面電気泳動

精製酵素3ml (蛋白濃度8 mg/ml) を、前記と同様にして透析したのち、日立HTP-B型移動界面電気泳動装置を用いて4.5℃, 10 mA, 73 Vの条件のもとで電気泳動を行なった。

4. アミノ酸分析

トリプトファン以外のアミノ酸組成は精製酵素を6 N HCl で110℃ 20時間加水分解を行ないスピニコ120型アミノ酸分析計で分析した。

トリプトファン含量は2 N KOH で37℃ 16時間加水分解を行なった後同様にして分析した。

5. 免疫化学的実験法

ネズミ肝臓ACLに対する抗血清は、精製酵素を免疫原として感作したラサギから調製した。すなわち、精製酵素8 mgをFreund complete adjuvant (Iatron社製) と乳濁状にしラサギの大腿部に筋肉内注射を行ない、約1か月

後に、1週間おきに3回各々4, 1, 1 mgの
 精製酵素をbooster注射して、最後のbooster注
 射の約1週間後に、ウサギ頸動脈より採血し
 血清を調製した。対照血清はFreund complete
 adjuvantのみを注射したウサギより同様にして
 調製した。両血清とも56℃ 30分非動化した
 のち約2 mlづつに分注して-20℃で保存し実験
 に供した。また抗血清は標品によつては
 Ouchterlony 法により、抗ACL以外の非特異的
 成分の混在の認められる場合がある。この
 場合それを取り除くためにほつぎのような操
 作を行なつた。すなわち、ネズミ肝臓のミ
 トコンドリア画分を0.01 M トリス緩衝液 (pH 7.4
) で十分洗滌し、これを抗血清10 mlと混合し
 て37℃ 15分間インキュベートする。反応後
 氷冷し、15,000 × g, 20分間遠心した上清を第
 1回吸収血清とし、この操作を7~10回くり
 返すことによつて非特異成分は完全に除去で
 きた。吸収血清の回収率は、はじめの抗血
 清抗体価の80%以上であつた。実験によつ

ては、抗血清、対照血清ともそれぞれ硫酸40%飽和で3回処理して0.005Mリン酸緩衝液(pH7.4)を含む0.9%食塩水に対して透析し、最初の1/4量に濃縮したものをを用いた。この抗血清1mlによって精製ACL 363単位(約85 μ gN)が中和された。

Ouchterlony二重拡散ゲル内沈降反応および定量沈降反応はKabatら⁽¹⁴⁾の記載にしたがって実施した。ただし、窒素の定量にはSchiffmanら⁽¹⁵⁾の方法を用いた。寒天板は0.9%NaCl, 0.01Mトリス緩衝液(pH7.4), 0.01M2-メルカプトエタノール, 0.001M $MgCl_2$ を含む0.7%Special Agar Noble (Difco社製)を用いてシャーレに調製し、ゲル内沈降反応は密閉容器内にそのシャーレを入れ37℃で48時間拡散させた後、沈降像を撮影した。定量沈降反応は、抗血清または対照血清を、0.01M2-メルカプトエタノール, 0.001M $MgCl_2$ を含む0.9%食塩水(リン酸緩衝液にてpH7.0に調製)の存在下に、酵素(抗原)液とまず37℃で30分間、ついで0℃で1時間

反応させ、生じた沈降物を遠心除去後、上清中の残存酵素活性を測定した。沈降物は氷冷0.9%食塩水(pH7.0)で3回洗ってのち窒素定量を行なった。

6. 各種組織粗酵素液調製

ネズミの肝臓1.5gを0.02Mトリス緩衝液(pH8.0)を含む0.25M蔗糖液7ml中で、Potter-Elvehjemガラスホモジナイザーを用いて磨碎し、その105,000Xg 30分の超遠心上清を肝臓粗酵素液とした。ネズミの他の組織(腎臓、心臓、脳、副睪丸脂肪組織)およびニワトリ、ウサギ、イヌ、モルモットの肝臓の粗酵素も同様にして調製した。

7. 活性測定および定量法

ATPクエン酸リアーゼの活性測定には(1)アセトヒドロキサム酸法⁹⁾、(2)spectrophotometer法¹⁶⁾および(3)radioisotope法¹⁶⁾を使用した。ただし緩衝液は本酵素の至適pH(pH8.4)のものをを用いた。(1)は粗酵素、(2)は精製酵素の活性測定に使用した。酵

素活性の単位は 37°C で 1 分間に $1\ \mu\text{mole}$ の アセ
トヒドロキシサム酸を形成、または $1\ \mu\text{mole}$ の
NADH を酸化する酵素量を 1 単位 (U) とし、
比活性は蛋白 $1\ \text{mg}$ 当りの単位数で表わした。

(3) の radioisotope 法は酵素の抗原として
の特異性を検討する場合に用いた。反応組
成はトリス緩衝液 ($\text{pH } 8.4$) $200\ \mu\text{moles}$, MgCl_2 $10\ \mu\text{moles}$,
ATP $10\ \mu\text{moles}$, γ -メルカプトエタノール
 $10\ \mu\text{moles}$, CoA $0.1\ \mu\text{mole}$, オキガロ酢酸 Na 塩 $10\ \mu\text{moles}$,
クエン酸 [$1,5\text{-C}^{14}$] ($10\ \mu\text{C}/\mu\text{mole}$) $2\ \mu\text{moles}$, 抗
血清または対照血清 $10\ \mu\text{l}$ (蛋白量 $0.73\ \text{mg}$) およ
び適当量の各種組織粗酵素を加え、全量を $1\ \text{ml}$ とした。
反応は密閉したワールブルグフ
ラスコ中で行ない、 37°C 10 分間プレインキュ
ベート後、側室より ATP を添加して反応を開始
した。 37°C 1 時間インキュベートしたの
ち、 $2\ \text{N}$ HCl を加えて反応を止めた。形成
されたオキガロ酢酸 [4-C^{14}] を Krebs, Eggleston
法¹⁾ で脱炭酸し、発生した C^{14}O_2 を副室に入れた
 $1\ \text{M}$ ハイアミン-メタノール溶液 $0.15\ \text{ml}$ に吸収さ

せ、それを0.5 ml メタノールでトルエンシンチ
レーター溶液¹⁸⁾ 10 ml 中に移して、パッカード社
製液体シンチレーションスペクトロメーター
で放射能を測定した。

脂肪酸合成酵素の活性測定は Hsu¹⁹⁾ および
Lyner²⁰⁾ の方法によった。反応組成はリン酸
カリウム緩衝液 (pH 7.0) 100 μ moles, γ -メルカプ
トエタノール 10 μ moles, EDTA 5 μ moles, NADP 1 μ
mole, グルコース-6-リン酸 10 μ moles, グルコー
ス-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.49] 0.05 単位,
マロニル CoA 0.05 μ mole, アセチル CoA [$1-C^{14}$]
(約 27,000 c.p.m.) 0.02 μ mole, 粗酵素 (蛋白約 0.4 mg
) を加え全量 1 ml とした。アセチル CoA [$1-C^{14}$]
] の添加によつて反応を開始し 37°C 30 分間イ
ンキュベート後、メタノール+KOH 溶液 (70 %
メタノール 100 ml 中に 10 g KOH を含む) 1 ml を
加えて反応を止める。パルミチン酸、ステ
アリン酸それぞれ 2.5 μ moles を脂肪酸キャリアー
として加えて 90°C 30 分間けん化したのち、12
N 硫酸 0.2 ml で酸性化した。長鎖脂肪酸は石

油エーテル4mlで3回抽出し、それを水5ml
 で1回洗滌後、放射能測定用バイアル中に移
 し蒸発乾固させる。これをメチルセロソル
 ブ0.2mlに溶解し、さらにトルエンシンチレー
 ター溶液¹⁸⁾7mlを加えてパッカード社製液体シ
 ンチレーションスペクトロメーターで放射能
 を測定した。酵素活性は上記条件下で蛋白
 1mg当り、長鎖脂肪酸に取込まれたアセチル
 CoA [^{14}C] の μmole 数で表わした。

蛋白定量は、粗酵素にはビウレット法²¹⁾、
 精製酵素にはLowry's²²⁾の方法を用いた。

実 験 結 果

1. 酵素精製

表1

ネズミ肝臓のACLの精製法の大要を表1に
 示した。表のような7段階の操作により比
 活性は約50倍上昇し、収量は約20%であった

2. 物理化学的均一性

図 1

精製酵素は図 1 のように超遠心的に均一であり、沈降係数 ($S_{20,w}$) は $13.5 \times 10^{13} \text{ sec}$, 拡散係数 ($D_{20,w}$) は $2.62 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{sec}$ であり、偏比容を 0.75 として計算すると本酵素の分子量は約 500,000 である。

図 2

また図 2 のように精製酵素は電気泳動的にも均一であり、電気泳動易動度は $-2.53 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec/V}$ であり、pH 7.4 では酵素蛋白が負に荷電していることを示している。

3. アミノ酸組成

表 2

精製酵素のアミノ酸分析の結果を表 2 に示した。本酵素は酸性アミノ酸に富んでおり、これは電気泳動易動度の結果とよく一致している。

4. 免疫化学的均一性

図 3

精製酵素を免疫原として調製した抗ACLウサギ血清と精製酵素とは、Ouchterlonyニ重拡散ゲル内沈降反応で図3に示すごとく一本の沈降線しか生じない。図4

酵素液に抗血清を加えると図4に示すように、単一な抗原-抗体系に典型的な定量沈降反応曲線がえられ、酵素活性は90%以上阻害された。この際上清中の残存酵素活性および上清テストの結果から等量点における抗体N/抗原Nは約2であった。

以上Ouchterlony法および定量沈降反応の結果から精製酵素が免疫化学的にも均一であることが証明された。

5. ネズミ各種臓器、各種動物肝臓ACLの抗原性の異同

ACLは前記のごとく肝臓のほか、腎臓、心臓、脳、脂肪組織などにも広く分布しており、しかも肝臓と脂肪組織のもののみは種々の生理的条件下で著しい活性変動を示すが、ほかの臓器のものはほとんど活性変動を示さな

い。^{4,12)} そこでネズミの各種臓器に存在する A-CL の抗原性の異同を、肝臓酵素に対する抗血清を用いて検討した。すなわち腎臓、心臓、脳、脂肪組織より抽出した粗酵素液を、肝臓酵素に対する抗血清と 37℃ で 10 分間反応させた後、生じた沈降物を遠心除去して上清中の残存酵素活性を測定した。

表 3

その結果表 3 実験 No. 1 に示すように、いずれの臓器抽出物においても、肝臓酵素におけると同様に、その活性の 90% 以上が阻害される。したが、ネズミの各種臓器の本酵素の抗原特異性は、たがいにきわめてよく類似していることが明らかとなった。

つぎに同様な方法を用いて、各種動物の肝臓に存在する本酵素の種属特異性について検討を加えた。表 3 実験 No. 2 に示すように、ネズミ肝臓酵素に対する抗血清による酵素活性の阻害度は、酵素の由来によつて一様ではない。すなわちこの抗血清によつて、ネズ

ミ肝臓酵素は90%以上阻害されるが、ニワトリ肝臓のものは約50%しか阻害されず、またウサギ、イヌ、モルモット肝臓酵素では著明な阻害は認められなかった。したがってネズミ肝臓酵素の抗原性は、ニワトリ肝臓酵素のそれとは部分的に共通しているが、ウサギ、イヌ、モルモット肝臓酵素のそれとはほとんど共通しておらず、種属特異性の存在することが明らかとなった。

6、食餌性誘導酵素の免疫化学的検討
前記のごとくACLは脂肪酸合成系の重要な律速酵素の一つであり、したがって肝臓や脂肪組織の酵素は、飢餓や糖尿病では著明な活性低下を示し、一方高糖食あるいはインスリン投与により逆に著しい活性上昇をきたす^{4,12)}。そこでまず、高蔗糖食投与により誘導したネズミ肝臓のACLが正常ネズミのそれと、免疫化学的に同一であるか否かを検討した。

図5

図5は高蔗糖食投与により誘導したネズミ

肝臓の ACL と、誘導していない正常ネズミのそれとについて、さきと同様に定量沈降反応を行なった結果を示したものである。両酵素の定量沈降反応曲線は全く一致しており、かつ上清中に酵素活性が出現し始める点も両者全く一致している。したがって両酵素は免疫化学的に同一の酵素蛋白であると考えられ、食餌性誘導による本酵素活性の上昇が、正常ネズミの酵素と質的に同じ蛋白質の量的増加による可能性を示唆している。

図 6

この両酵素蛋白の異同をさらに検討するため Ouchterlony 法を行なった結果が図 6 である。すなわち、誘導していない正常ネズミ肝臓の酵素、食餌性誘導を行なったネズミ肝臓の酵素およびそれから精製した酵素の三者とも、全く一本の沈降線を示し、かつそれらが完全に fuse している。この結果は両酵素が免疫化学的に同一の酵素蛋白であることをさらに強く示すものである。

7. ACL の活性変動と酵素蛋白量の変動

図7 図8

前記の高蔗糖食投与による肝臓酵素の誘導が、実際に酵素蛋白自体の量的増加によるものか否かをつぎに検討した。すなわち高蔗糖食を投与したネズミ肝臓より抽出した粗酵素液を用いて、抗体過剰域で定量沈降反応を行なった。その結果図7に示すように、食餌性誘導の時間経過に伴うACLの比活性の上昇は、酵素抗体結合物の量的増加とほぼ平行している。

つぎに図8の換算表を用いて、この粗酵素液中の沈降酵素蛋白量を決定した。この換算表は、既知量の精製ACLを一定量の抗血清と、抗体過剰域で定量沈降反応を行なって求めた。そして、図7に示した食餌性誘導による比活性の変化と、換算表からえられた沈降酵素蛋白量との間の平行関係を図8に示した。この結果から食餌性誘導の時間経過に伴うACLの比活性の上昇は、酵素蛋白量の

増加と密接な平行関係にあり、したがってネズミ肝臓 ACL の食餌性誘導が、酵素蛋白自体の量的増加によるものであることが明らかである。

図 9 図 10

また本酵素は絶食により著明な活性低下をきたすが、この活性の低下が酵素蛋白自体の量的減少によるものか否かを、同様な方法を用いて検討した。すなわち高蔗糖食を3日間投与して酵素を誘導した後、絶食させ、前と同様にして定量沈降反応を行なった。その結果、図 9 に示すように、絶食時間の経過に伴う ACL の比活性の低下は、酵素-抗体結合物の量的減少とほぼ平行している。図 9 に示した比活性の变化と、図 8 の換算表から求めた沈降酵素蛋白量との間の平行関係を図 10 に示した。この結果は、絶食時間の経過に伴う ACL の比活性の低下が、酵素蛋白量の減少と密接な平行関係にあり、したがって、絶食の場合のネズミ肝臓 ACL の活性低下が、酵素蛋白自体の量的減少によるものである。

ことを示している。

8. ネズミ肝臓の ACL と脂肪酸合成酵素との抗原性の異同 **表4**

ネズミ肝臓 ACL と脂肪酸合成酵素とは、物理化学的および生理的性質において、多くの類似点^{16, 19, 23, 24)}がみられる。したがってネズミ肝臓の両酵素の活性が、multi-functional enzyme として、単一の酵素蛋白によつて触媒されるのではないかという可能性が考えられる。

そこでこの点を検討するために、高蔗糖食投与により誘導したネズミ肝臓の粗酵素を、ACL に対する抗血清と反応させたのち、生じた沈降物を遠心除去して、上清中の両酵素の残存活性を比較した。その結果、表4に示すように、抗 ACL 血清によつて ACL は 90% 以上阻害されるが、一方、脂肪酸合成酵素は全く阻害されなかった。さらに精製した ACL は、脂肪酸合成酵素の活性を全く有していない。したがって両酵素の活性が単一の酵素蛋白により触媒される可能性は否定され、両

酵素が全く異なつた酵素であることが証明された。

考 察

ATPクイン酸リアーゼについては、これまで Sreene²⁾ がニワトリ肝臓よりその精製を試みたが、わずかに部分精製にとどまり、高度の精製には成功しなかった。その理由は、酵素が不安定で、特に精製が進むにつれて非常に失活し易くなるためであった。そこで著者ら^{16, 23)} は、ネズミに63%高蔗糖食を3日間投与すると肝臓の酵素活性が約10倍誘導されることを利用してネズミ肝臓よりACLの精製を試みたが、精製に先立って酵素を安定化する条件を検討した。その結果、2-MercaptoethanolおよびMg⁺⁺の両者の共存により、本酵素が著しく安定化されることを見出した。そこで、この両者の存在下にネズミ肝臓より

本酵素の精製を行ない、結晶状に単離することに成功した。

著者は今回の実験で、さきの精製法^{16,23)}のうち各カラムクロマトグラフィーの段階で改良を加え、約20%の高収量で精製酵素標品をうることができた。この精製酵素は、超遠心的にも、電気泳動的にも、また免疫化学的にも均一である。本酵素は約50倍の精製で均一となるので、高蔗糖食投与により誘導したネズミ肝臓のACL含量はきわめて高く、可溶画分の総蛋白量の約2%を占めることになる。一方、誘導しない正常ネズミ肝臓では約0.2%であった。

ネズミ肝臓のACLは、その抗酵素ウサギ血清と沈降反応をおこし、その際酵素活性はほぼ完全に中和される。このことは、酵素の活性中心と抗原決定基とが近接して存在することを示唆している。

ACLは前記のごとく肝臓のほか、腎臓、心臓、脳、脂肪組織などにも広く分布しており

24) しかも肝臓と脂肪組織の酵素のみは、著明な食餌性およびホルモン性誘導を受けるが、ほかの臓器のものはほとんど活性変動を示さない。⁴⁻¹²⁾ しかし、このように活性変動の様相が異なるにもかかわらず、ネズミの腎臓、心臓、脳、脂肪組織などの本酵素は、肝臓のそれとは、免疫化学的には区別できない。したがってネズミ各種臓器のACLの抗原決定基は、同一であるか、あるいはきわめて共通した部分があると考えられる。このことは、同一種属においては、各種臓器のACLの抗原特異性は、たがいによく類似していることを示している。一方、ニワトリ、イヌ、ウサギ、モルモットなどの肝臓酵素の抗原性は、ネズミ肝臓酵素のそれとは必ずしも共通していない。したがって、種属が異なれば、本酵素の抗原決定基もまた同一であるとは限らず、本酵素には種属特異性の存在することが明らかにされた。なおこれら各酵素の抗原性の異同を、Ouchterlony法を使用して検討する

ことを試みたが、各臓器あるいは各種属によ
つて、本酵素の比活性に著しい差が存在する
ために、この方法では明確な結果をうること
ができなかった。

ネズミ肝臓のACLは、種々の食餌性および
ホルモン性誘導をうけ、飢餓や糖尿病では著
明な活性低下を示し、一方、高糖食あるいは
インスリン投与により逆に著しい活性上昇を
きたす。^(4,12)しかし食餌性誘導をしたネズミ肝
臓の本酵素は、誘導をしない正常ネズミのそ
れと、免疫化学的には区別できない。この
ことは本酵素の場合には、ネズミ肝臓の1キ
ソキナーゼにみられる⁽²⁵⁻²⁷⁾ように種々の型のア
イソザイムが存在していて、そのうちのある
もののみが食餌性誘導をうけるという可能性
がないことを示している。

さらにこれらの結果を定量沈降反応のそれ
と考えあわせると、ネズミ肝臓のACLの活性
変動は、誘導を行なっていない正常ネズミ肝臓
酵素と、質的に同一の酵素蛋白の量的変動に

よるものであることは明らかである。したがって、本酵素の活性変動が specific inhibitor や allosteric effector のような、活性調節因子と酵素との interaction によるという可能性も否定された。

最近、Hsu¹⁹⁾ はハト肝臓から、Burton²⁴⁾ はネズミ肝臓から、脂肪酸合成酵素をそれぞれ均一な標品にまで精製した。この酵素と、ネズミ肝臓 ACL とは、物理化学的および生理的性質において、多くの類似点が認められる。^{16,19,23,24)} たとえば、両酵素ともに分子量は約 500,000 であり、酵素反応や安定化に -SH 試薬を要求すること、重金属によって阻害されること、また表面変性をうけやすいことなどである。さらにネズミ肝臓の両酵素は、いずれも可溶画分に局在し、^{24,28)} その活性は種々の生理的条件下で、ともに脂質合成の速度と平行して変動する。^{29,30)} また Plowman³¹⁾ は、彼らの精製過程でネズミ肝臓の脂肪酸合成酵素と ACL が一緒に精製されてくるので、ACL が脂肪酸合成酵素

複合体の一部をなしているのではないかと考
 えている。したがって、ネズミ肝臓の両酵
 素活性が multi-functional enzyme として、単一の
 酵素蛋白によつて触媒されるのではないかと
 いう可能性が考えられた。しかしながら本
 文中で述べたように、脂肪酸合成酵素の活性
 は抗 ACL 血清によつて全く阻害されない。
 さらに精製した ACL は、脂肪酸合成酵素の活
 性を全く示さない。したがって前記の可能
 性は否定され、両酵素が全く異なつた酵素で
 あることが証明された。

結 語

ネズミ肝臓より ATP クエン酸リアーゼ (ACL
) の抽出精製を行ない、超遠心的にもまた電
 気泳動的にも均一な標品を高収量でうること
 に成功した。つぎに精製酵素を免疫原とし
 てウサギに感作し、抗酵素ウサギ血清を調製

した。この抗血清を用いて Ouchterlony 法を行ない、えられた精製酵素標品が免疫化学的にも均一であることを証明した。

酵素液に抗血清を加えると、単一な抗原-抗体系に典型的な定量沈降反応曲線がえられ、その際、酵素活性は 90% 以上阻害された。

抗血清を用いて酵素活性の阻害度の面から、ネズミの各種臓器、あるいは各種動物の肝臓の ACL の抗原としての特異性について検討した。その結果、同一種属においては各種臓器 ACL の抗原特異性は、たがいにきわめてよく類似しているが、一方、異なる種属間では本酵素の抗原特異性は必ずしも類似しておらず、種属特異性の存在することを示す成績がえられた。

本酵素は脂肪酸合成系の重要な律速酵素の一つであり、したがってネズミ肝臓の ACL は、高糖食投与により著明な活性上昇を示し、絶食により逆に著しい活性低下をきたす。このような ACL の活性変動が、誘導を行な

ていない正常ネズミ肝臓のACLと、質的に同一の酵素蛋白の量的増減によるものであることが、Ouchterlony法、定量沈降反応などの免疫化学的手段を用いることによって明らかにされた。

ネズミ肝臓のACLは種々の物理化学的および生理的性質において、脂肪酸合成酵素と多くの類似点がみられ、両反応が単一の酵素蛋白によって触媒される可能性が考えられたが、両酵素が全く異なった酵素であることも本研究によって明らかになった。

稿を終るに臨み、終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜った、恩師竹田義朗教授に衷心より謝意を表するとともに、種々ご教示ご助言をいただいた鈴木不二男助教授を始め生化学教室の諸兄に厚くお礼申し上げます。

- 1) Srere, P.A. and Lipmann, F. (1953): An enzymatic reaction between citrate, ATP and CoA. J. Amer. Chem. Soc. 75, 4874.
- 2) Srere, P.A. (1959): The citrate cleavage enzyme. I. Distribution and purification. J. Biol. Chem. 234, 2544-2547.
- 3) Srere, P.A. (1961): The citrate cleavage enzyme. II. Stoichiometry, substrate specificity and its use for coenzyme A assay. J. Biol. Chem. 236, 50-53.
- 4) Kornacker, M.S. and Ball, E.G. (1965): Citrate cleavage in adipose tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54, 899-904.
- 5) Kornacker, M.S. and Lowenstein, J.M. (1964): Citrate cleavage and acetate activation in livers of normal and diabetic rats. Biochim. Biophys. Acta 84, 490-492.
- 6) Spencer, A., Corman, L. and Lowenstein, J.M. (1964): Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. A comparison of citrate and acetate incorporation into fatty acids. Biochem. J. 93, 378-388.
- 7) 竹田義朗, 足達綱三郎, 井上秀夫, 谷岡博昭 (1964): 肝脂質代謝に及ぼすインスリンの影響について. 医化学シンポジウム 4, 59-62, 昭和39.
- 8) Abraham, S., Kopelovich, L. and Chaikoff, I.L. (1964): Dietary and hormonal regulation of the hepatic citrate-cleavage enzyme. Biochim. Biophys. Acta 93, 185-187.
- 9) 井上秀夫 (1965): ネズミ肝臓 Citrate cleavage enzyme について. (I) 生理的意義について. 阪大医誌 43, 439-442, 昭和40.
- 10) Kornacker, M.S. and Lowenstein, J.M. (1965): Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. The activities of citrate cleavage enzyme and acetate thiokinase in livers of starved and refed rats. Biochem. J. 94, 209-215.
- 11) Kornacker, M.S. and Lowenstein, J.M. (1965): Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. Activities of citrate-cleavage enzyme and acetate thiokinase in livers of normal and diabetic rats. Biochem. J. 95, 832-837.
- 12) Brown, J. and McLean, P. (1965): Effect of alloxan-diabetes on the activity of citrate cleavage enzyme in adipose tissue. Nature 207, 407-408.
- 13) Srere, P.A. and Bhaduri, A. (1964): The citrate cleavage enzyme. III. Citryl coenzyme A as a substrate and stereospecificity of the enzyme. J. Biol. Chem. 279, 714-718.
- 14) Kabat, E.A. and Mayer, M.M. (1961): Experimental immunochemistry. ed. 2, Charles C. Thomas Publisher, Illinois, 22-383.
- 15) Schiffman, G., Kabat, E.A. and Thompson, W. (1964): Immunochemical studies on blood groups XXX. Cleavage of A, B, and H blood-group substances by alkali. Biochemistry 3, 113-120.

- 16) 井上秀夫 (1965): ネズミ肝臓 Citrate cleavage enzyme について.
(II) 酵素精製. 阪大医誌 17, 443-447, 昭和40.
- 17) Krebs, H.A. and Eggleston, L.V. (1945): Metabolism of acetate in animal tissues. I. Biochem.J. 39, 408-419.
- 18) Ichihara, A., Adachi, K., Daikuhara, Y. and Takeda, Y. (1965): The biochemistry of animal cells. II. Lipid Biosynthesis in dispersed rat liver cells. J.Biochem. 57, 696-705.
- 19) Hsu, R.-Y., Wasson, G. and Porter, J.W. (1965): The purification and properties of the fatty acid synthetase of pigeon liver. J.Biol.Chem. 240, 3736-3746.
- 20) Lynen, F., Hopper-Kessel, I. and Eggerer, H. (1960): Zur Biosynthese der Fettsäuren. III. Die Fettsäuresynthetase der Hefe und die Bildung enzymgebundener Acetessigsäure. Biochem.Z. 340, 95-124.
- 21) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M. (1949): Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J.Biol.Chem. 177, 751-766.
- 22) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265-275.
- 23) Inoue, H., Adachi, K., Suzuki, F., Fukunishi, K. and Takeda, Y. (1965): Crystallization and some properties of the citrate cleavage enzyme of rat liver. Biochem.Biophys.Research Commun. 21, 432-437.
- 24) Burton, D.N., Haavik, A.G. and Porter, J.W. (1968): Comparative studies of the rat and pigeon liver fatty acid synthetases. Arch.Biochem.Biophys. 126, 141-154.
- 25) González, C., Ureta, T., Sanchez, R. and Niemeyer, H. (1964): Multiple forms of ATP:hexose 6-phosphotransferase from rat liver. Biochem.Biophys.Research Commun. 16, 347-352.
- 26) Katzen, H.M. and Schimke, R.T. (1965): Multiple forms of hexokinase in the rat: Tissue distribution, age dependency and properties. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 54, 1218-1225.
- 27) Grossbard, L. and Schimke, R.T. (1966): Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms. J.Biol.Chem. 241, 3546-3560.
- 28) Masoro, E.J., Korchak, H.M. and Porter, E. (1962): A study of the lipogenic inhibitory mechanisms induced by fasting. Biochim.Biophys.Acta 58, 407-416.

- 29) Numa, S., Matsushashi, M. and lynen, F. (1961): Zur Störung der Fettsäuresynthese bei Hunger und Alloxan-Diabetes. I. Fettsäuresynthese in der Leber normaler und hungernder Ratten. Biochem. Z. 334, 203-217.
- 30) Korchak, H.M. and Masoro, E.J. (1962): Changes in the level of the fatty acid synthesizing enzymes during starvation. Biochim. Biophys. Acta 58, 354-356.
- 31) Plowman, K.M. and Cleland, W.W. (1966): Kinetic studies on citrate cleavage enzyme. Federation Proc. 25, 340.

表題脚注

大阪大学薬学部生化学講座 (主任 竹
田義朗教授)

表1 ネズミ肝臓ACLの精製

表2 ACLのアミノ酸組成

精製過程	蛋白量 (mg)	総活性 (U)	比活性	収量 (%)	アミノ酸	アミノ酸 100g蛋白当りの含量(g)	アミノ酸残基
1) 粗酵素	56,100	6,452	0.12	100	アスパラギン酸	9.03	7.82
2) 硫酸分画 (25~45%)	25,300	5,060	0.20	78.4	グルタミン酸	10.57	9.28
3) DEAE-セルロース カラムクロマトグラフィー	3,210	4,350	1.36	67.4	グリシン	5.55	4.23
4) アルミナ C ₂ ゲル吸脱着	2,040	4,202	2.06	65.1	アラニン	5.92	4.72
5) ブラジャイトカラムクロ マトグラフィー	541	2,299	4.25	35.6	バリン	6.39	5.41
6) 第1回セファデックス G-200 ゲルろ過	288	1,713	5.95	26.5	ロイシン	8.27	7.13
7) 第2回セファデックス G-200 ゲルろ過	220	1,375	6.25	21.3	イソロイシン	6.08	5.25
					セリン	4.11	3.40
					スレオニン	5.01	4.25
					シスチン $\frac{1}{2}$	7.88	6.70
					メチオニン	3.29	2.90
					プロリン	4.73	3.99
					フェニルアラニン	5.30	4.73
					スレオニン	5.19	4.69
					ヒスチジン	2.02	1.79
					リジン	5.72	5.02
					アルギニン	5.55	4.98
					アンモニア	0.73	0.73
					トリプトファン	0.86	0.79

表3 ネズミ各種臓器、各種動物肝臓ACLの抗原性の異同

実験 No.	酵 素 源		各血清処理後の残存酵素活性		
	種	臓 器	対照血清 (A) (c.p.m.)	抗血清 (B) (c.p.m.)	B/A×100
	ネズミ	肝臓	16,490	1,111	6.8
	ネズミ	腎臓	8,488	421	5.0
	ネズミ	心臓	13,003	1,209	9.1
	ネズミ	脳	7,432	298	4.0
	ネズミ	脂肪組織	19,919	1,098	5.5
	ネズミ	肝臓	7,842	568	7.2
	ニワトリ	肝臓	8,399	4,373	51.9
2	イヌ	肝臓	7,591	5,961	78.5
	ウサギ	肝臓	21,298	18,699	87.8
	モルモット	肝臓	11,136	8,527	76.5

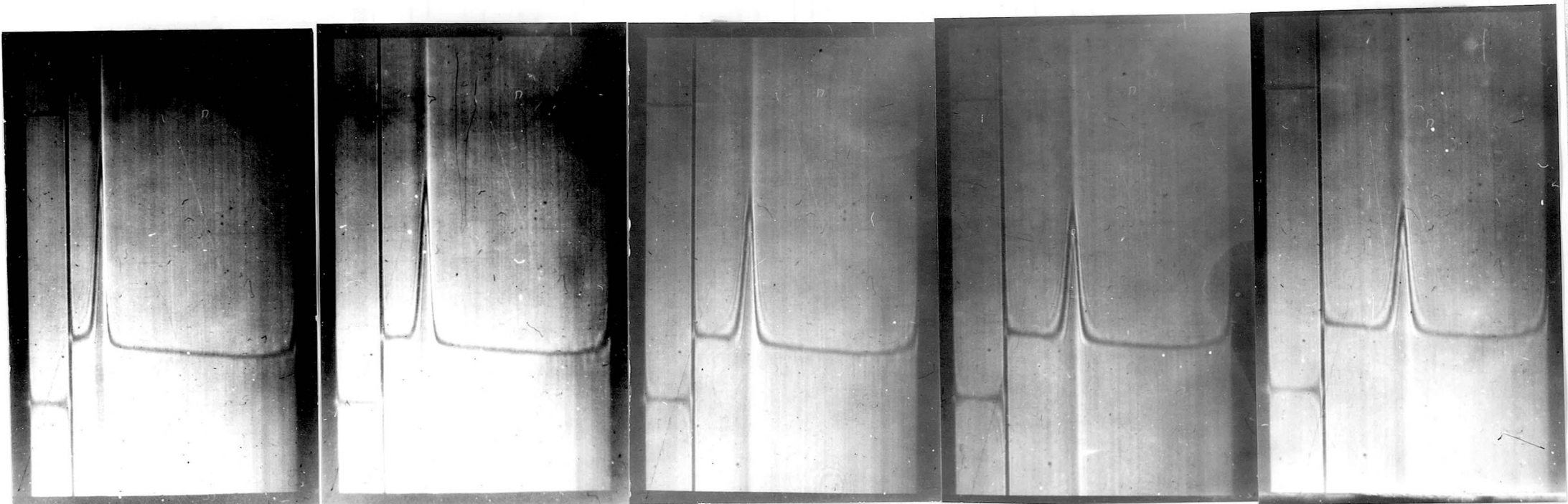
酵素活性はradioisotope法で測定した。

表 4 ネズミ肝臓 ACL と脂肪酸合成酵素との抗原性の異同

実験 No.	酵 素	各血清処理後の残存酵素活性		
		対照血清	抗血清	%
1	ATP ケン酸リアーゼリ 脂肪酸合成 酵素	75.5	5.83	7.6
		0.64	0.58	90.6
2	ATP ケン酸リアーゼリ 脂肪酸合成 酵素	102	5.83	5.7
		0.52	0.60	115

高蔗糖食により誘導したネズミ肝臓の粗酵素 50 μ l (蛋白約 2 mg) を 0.01 M 2-メルカプトエタノール, 0.001 M $MgCl_2$, 0.3 ml 対照血清または抗血清と 37 $^{\circ}C$ 10 分反応させ、沈降物を遠心して除いた上清中の両酵素活性を測定した。ACL の活性測定には spectrophotometer 法を使用した。

- 1) 単位: 酸化された NADH μ moles/min/mg 蛋白
- 2) 単位: 長鎖脂肪酸に取込まれたアセチル CoA [$1-C^{14}$] μ moles/min/mg 蛋白

[illegible]

回	転	速	度	図	1	精	製	AC	の	超	遠	心	パ	タ	ン			
				52,100 rpm		到	達	後		5	分	間	隔	で	撮	影	し	た。

福西裕八

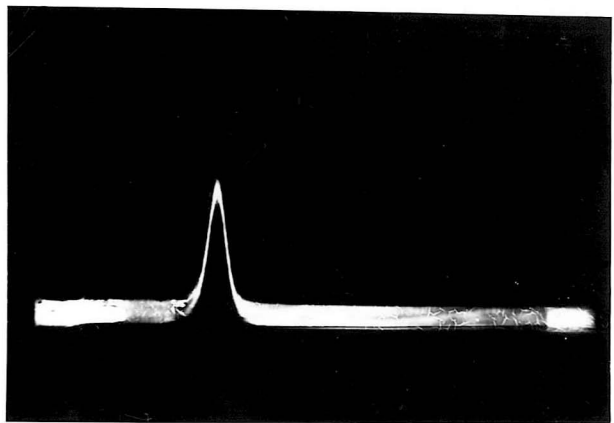
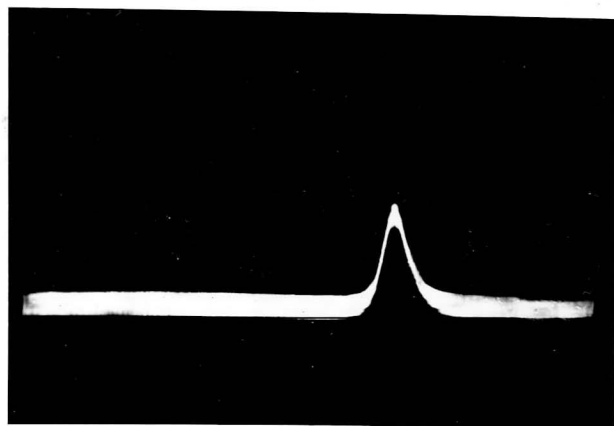
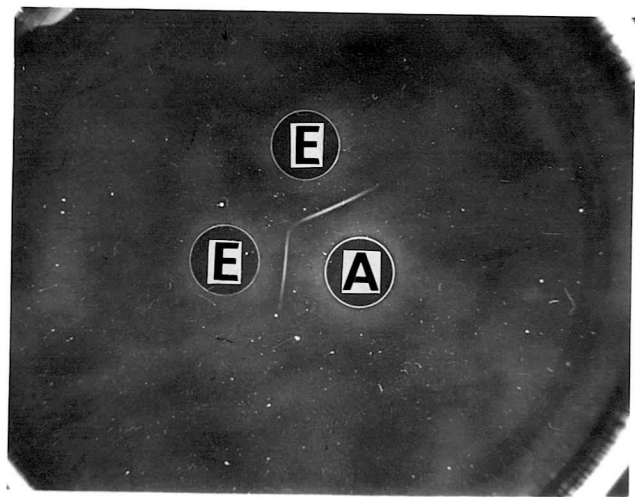


図3 精製ACLと抗ACL血清との
 Ouchterlony=重拡散ゲル内沈降反応
 槽A: 抗ACLウサギ血清 0.1ml
 槽E: 精製ACL 50 μ g
 48時間拡散後の沈降像

図2 精製ACLの電気泳動パターン
 上方: 下降側 下方: 上昇側
 泳動開始150分後のパターン

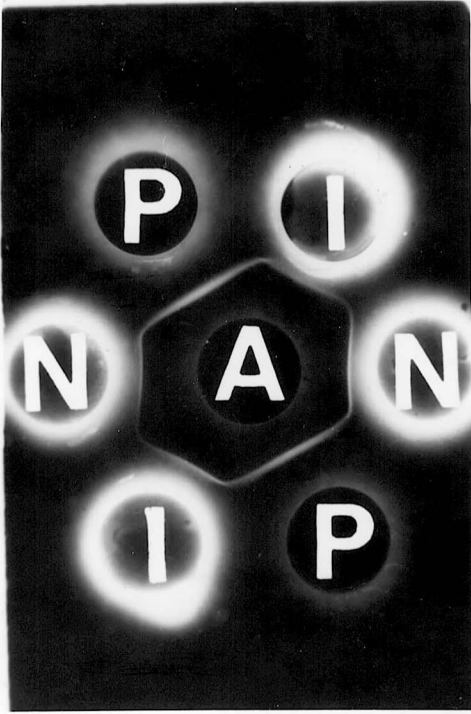


図6 誘導したネズミおよび誘導しないネズミ肝臓のACLと抗ACL血清とのOuchterlony二重拡散ゲル内沈降反応

槽A: 抗血清—硫酸で濃縮した抗血清30 μ l

槽B: 誘導しない酵素—正常ネズミ肝臓の粗酵素をDEAE-セルロースカラムを通して硫酸で濃縮した標品

(ACLの比活性0.1U/mg蛋白)を0.09U使用

槽I: 誘導した酵素—食餌性誘導したネズミ肝臓の粗酵素(ACLの比活性2.11U/mg蛋白)を0.06U使用

槽P: 精製酵素—精製ACL(比活性6.25U/mg蛋白)を0.1U使用

48時間拡散後の沈降像

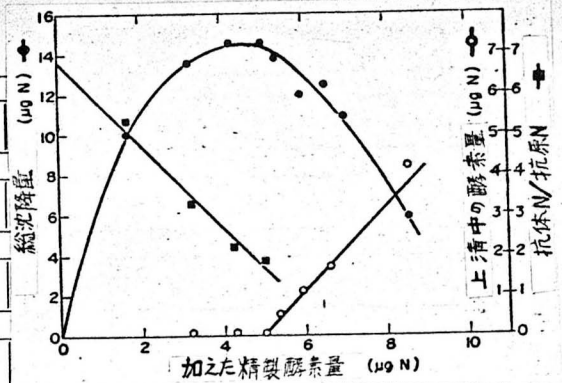


図4 精製ACLと抗ACL血清との定量沈降反応

抗血清0.2mlを使用し、実験方法に記した条件下(全量0.5ml)で行なった。上清中の酵素量はspectrophotometer法で測定した。

対照血清を使用して同様に行ったが認めべき沈降物は生じなかった。

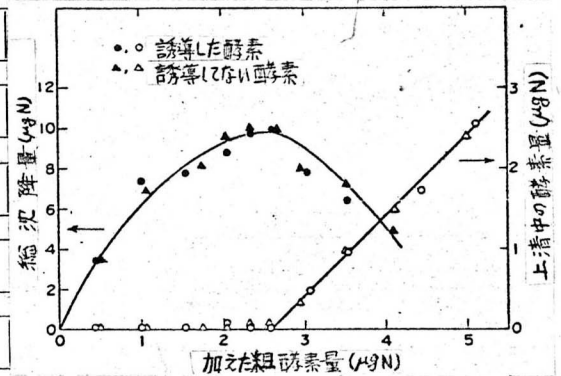


図5 誘導したネズミおよび誘導していないネズミ肝臓のACLと抗ACL血清との定量沈降反応

誘導した酵素および誘導しない酵素の調製法は図6に記した。

硫酸で濃縮した抗血清30 μ lを使用し、全量0.25mlで図4と同様にした。ただし上清中の酵素量はアセトヒドロキシ酸法で測定した。

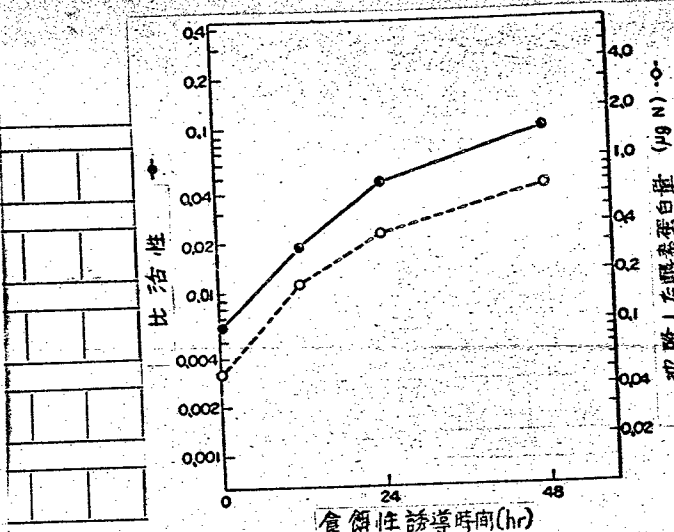
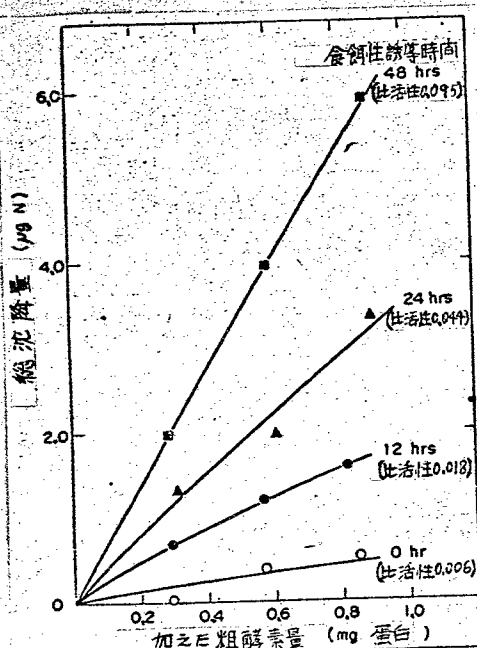


図8 飼餌性誘導によるACL含量の経時的増加

図7の総沈降量の値から、下の換算表に
ずいて、沈降酵素蛋白量を計算した。

図7 飼餌性誘導によるACL含量の变化

硫酸で濃縮した抗血清と、誘導していないネズミの肝臓より抽出した粗酵素を、抗体過剰域において、図5と同様にして、定量沈降反応を行なった。

加えた精製ACL量 (μg N)	総沈降量 (μg N)
0.46	3.03
0.93	5.33
1.39	7.49

換算表は表示量の精製ACLを使用し、抗体過剰域において、図5と同様にして定量沈降反応を行なった。

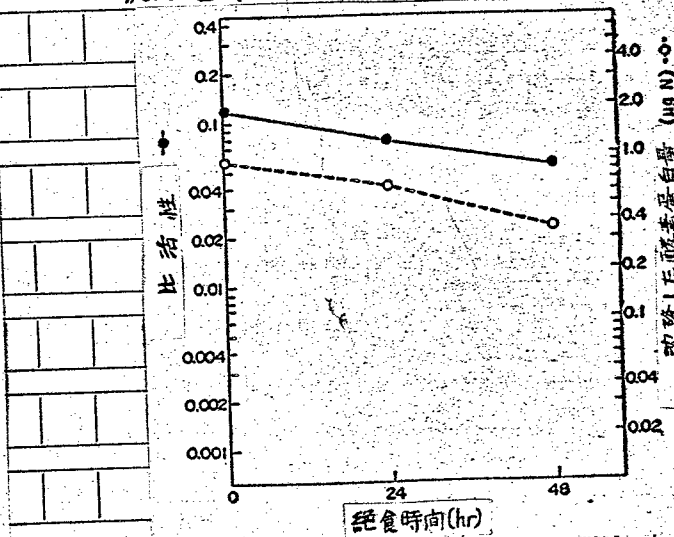
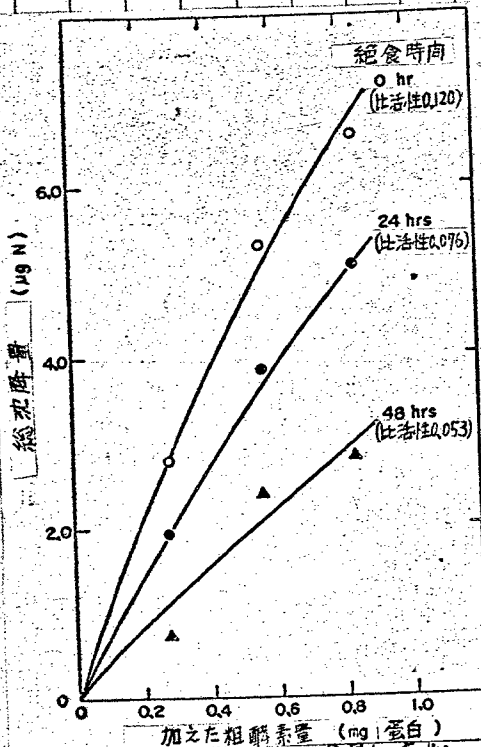


図10 絶食によるACL含量の経時的減少

図9の総沈降量の値から、図8の換算表に
もつて、沈降酵素蛋白量を計算した。

図9 絶食によるACL含量の变化

実験条件は図7と同様である。