

Title	共軛酵素反応の循環による新しいNADP定量法と赤血球生物学への応用
Author(s)	下谷, 三喜夫
Citation	大阪大学, 1969, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/29932">https://hdl.handle.net/11094/29932</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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)	しも たに み き お 夫 下 谷 三 喜 夫
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 8 4 3 号
学位授与の日付	昭 和 4 4 年 1 1 月 2 0 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	共軛酵素反応系の循環による新しい NADP 定量法と赤 血球生物学への応用
論文審査委員	(主査) 教 授 阿 部 裕 (副査) 教 授 坂 本 幸 哉 教 授 西 川 光 夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

生理的条件下での赤血球崩壊の研究を進めるうちに赤血球の老化にともない EMBDEN-MEYERHOF pathway の活性の低下にくらべ pentose phosphate pathway (PPP) の活性がより著明に低下することを認めたので、赤血球の老化とそれにつながる崩壊には ATP/ADP 比の消長ばかりでなく、G-6-PDH 欠乏性溶血性貧血にみられるごとく、PPP 活性の障害による NADPH 量の低下もまた重要な要因であろうと推論した。しかし赤血球の NADP 量はきわめて微量なるため未だ正確な定量成績は報告されていない。そこで私は新しい NADP 定量法の開発を志し、赤血球生物学への応用を試みんとした。

#### 〔方 法〕

ホウレンソウ葉より得られる ferredoxin (Fd)-NADP reductase が NADPH-NAD transhydrogenase 活性をもつことに着目し、この反応系と G-6-PDH 反応系を共軛循環させることにより被検液中の NADP を G-6-PDH で還元し、ついで Fd-NADP reductase により単位時間に還元された NADH の生成量から NADP 量を知る計画をたてた。ここで用いた Fd-NADP reductase は従来の方法に一部改良を加えて精製した。酵素単位は G-6-PDH は KORNBERG らの方法にしたがい、Fd-NADP reductase は  $456m\mu$  における吸光度で示した。

反応液組成：G-6-P,  $0.5\mu\text{moles}$  : Tris-HCl 液 pH 7.5,  $20.0\mu\text{moles}$  :  $\text{MgCl}_2$ ,  $10.0\mu\text{moles}$  : NAD,  $1.0\mu\text{moles}$  : 被検液：Fd-NADP reductase, 6.0 単位 : G-6-PDH, 0.5 単位で最終容量 1.0ml とした。NAD の還元は  $340m\mu$  での吸光度の増加を分光光度計で測定し、蛍光測定は蛍光分光光度計を用い励起波長  $350m\mu$  とし蛍光を  $455m\mu$  で測定した。

赤血球からの NADP, NADPH の抽出：家兎血液を用い遠心操作により精製した packed

erythrocyte を溶血せしめ、その NADP 量は酸性抽出液より求め、NADPH 量は中性抽出で求めた全 NADP 量から酸性抽出によって求めた NADP 量を差引くことにより算出した。

〔成績〕

1 共軛酵素反応系における酵素濃度の検討

共軛酵素反応系の循環においては用いる酵素の相対的濃度の決定が重要である。

A) NADH の生成量に対する G-6-PDH の濃度の影響

Fd-NADP reductase の濃度を一定 (6.0単位,  $OD_{456}$ ) とすると G-6-PDH の濃度を上げるにしたがい NADH の生成量は増大するが、0.5 KORNBERG 単位で極大値が得られ、さらに濃度を上げると却って NADH の生成量は低下した。

B) NADH の生成量に対する Fd-NADP reductase の濃度の影響

G-6-PDH の濃度を一定 (0.5 KORNBERG 単位) とすると Fd-NADP reductase の濃度を上げるにしたがって NADH の生成量は増大するが、6.0単位 ( $OD_{456}$ ) 以上では頭打ちの傾向であった。

2 検量曲線の作成

共軛酵素反応系における NADH の生成量の時間的推移をみると反応20分間はほぼ直線的に NADH の生成量は増大する。NADP を  $10^{-6}$  および  $10^{-7}$ M とした場合両者はほぼ同じ反応経過をたどり、20分間で  $10^{-4}$  および  $10^{-5}$ M の NADH を生成した。したがってこの共軛酵素反応系は直接 NADP を定量する場合にくらべて100倍の感度増幅が得られることになる。反応20分値を用いて検量曲線を作成すると、被検液中の NADP 濃度が  $10^{-6}$ ~ $10^{-8}$ M の範囲では生ずる NADH と直線的比例関係が得られた。蛍光測定法を用いると  $10^{-8}$ M 近辺の測定がさらに正確に行なうことができた。

3 家兎赤血球中の NADP 量

上のように考案した共軛循環酵素反応系を用いて赤血球中の NADP を定量した結果は全 NADP :  $126 \pm 5.1 \mu\text{moles/gHb}$ , NADP :  $79 \pm 6.6 \mu\text{moles/gHb}$ , NADPH :  $47 \pm 9.2 \mu\text{moles/gHb}$  であった。家兎赤血球を *in vitro* 37°C で孵置した場合6時間後より NADP 量は減少し、特に NADPH 量の減少が著明であった。この成績から従来いわれている ATP レベルのみならず、NADPH レベルもまた赤血球の viability および integrity の維持を規定する重要な細胞内因子になり得ることが推論できた。

〔総括〕

微量の NADP 定量のために Fd-NADP reductase と G-6-PDH の組合せによる共軛循環酵素法を利用した新しい定量法を考案した。本定量法は第1に定量のための酵素反応操作が一段階ですむこと、第2に最終生成物を直接分光学的に測定できること、第3に使用する2つの酵素は NADP に対して特異性が高いこと、第4に安定度の高い酵素標品が高純度で比較的容易に得られることなど酵素的微量定量のための多くの好条件をみたしていた。この故に従来測定が困難であった赤血球 NADP 量の測定を可能にした。また本定量法は微量の生体組織の検査材料等に利用できる可能性があると同時に細胞生物学の領域にも貢献するものと期待される。

## 論文の審査結果の要旨

著者は生理的条件下での赤血球崩壊の機序に関する研究の一環として pentose phosphate pathway (PPP) の意義について検討し、NADPH 量の低下が赤血球崩壊の1つの要因であろうと推論した。しかし赤血球内の NADP, NADPH 量は極めて微量であるため、いまだ正確な定量成績は報告されていない。

本研究ではホウレンソウ葉より得られる ferredoxin-NADP reductase が NADPH-NAD transhydrogenase 活性をもつことに着目し、この反応系と G-6-PDH 反応系を共軛循環させることにより、微量の NADP の測定を可能にした。本法により赤血球 NADPH 量の測定を行ない、その成績は著者の推論を支持するものであった。

本定量法は酵素的微量定量法のための多くの好条件をみたしており、今後広く活用できるものとする。