



Title	肝臓の酵素活性に及ぼすRhodamine sarcomaの影響 : 特にsarcomaからの影響因子の精製と性状について
Author(s)	松尾, 雄志
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30391
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)	まつ 松	お 尾	ゆう 雄	し 志
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	2092	号	
学位授与の日付	昭和45年6月16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	肝臓の酵素活性に及ぼすRhodamine sarcomaの影響 ——特にsarcomaからの影響因子の精製と性状について——			
論文審査委員	(主査) 教授	須田 正己		
	(副査) 教授	萩原 文二	教授	殿村 雄治
			助教授	堀尾 武一

論文内容の要旨

Rhodamine sarcomaを移植したラットを用い肝臓酵素とsarcoma中に存在しin vivoでマウスの肝臓酵素に影響を及ぼす物質の精製、性状を調べた。

1) 肝臓には遊離型と結合型のカタラーゼがあることが知られている。結合型カタラーゼは0.03%ないしはそれ以上の濃度のTritonX-100を添加することにより可溶化される。肝カタラーゼ活性は0.3% TritonX-100のある(“+Triton”)なし(“+None”)にかかわらず、sarcomaの成長につれて著しく減少した。“+Triton”/“+None”の比は殆んどの場合担ガンにより高い値を示した。これらのことから、遊離型カタラーゼの方が結合型よりも、sarcomaの成長につれて早く減少することが明らかとなった。

2) トリプトファンピロラーゼ活性は担ガンにより、多くの場合減少し、グルコース-6-リン酸脱水素酵素活性は倍近く増加する場合もあるが、変化しない場合が多い。チトクローム酸化酵素活性はsarcomaの成長程度に関係なく一定の値を示した。

3) Rhodamine sarcomaのhomogenateを106,000 g、1時間遠心して得られる沈澱分画(顆粒分画)はマウス皮下に注射すると、肝臓酵素のレベルを変化させた。カタラーゼ、トリプトファンピロラーゼ活性は減少し、グルコース-6-リン酸脱水素酵素は増加した。しかしチトクローム酸化酵素活性は殆んど変化を受けなかった。上清分画を注射しても、このような変化は認められなかった。正常ラットの肝臓及び筋肉から調製した顆粒分画を注射すると、筋肉からの顆粒分画はマウスの肝カタラーゼ活性を低下させたが、肝臓からの顆粒分画は肝カタラーゼ活性を低下させなかった。sarcoma組織からの顆粒分画の方が筋肉の顆粒分画よりも約10倍高い肝カタラーゼ低下作用を示し、このことから有効物質の含量は筋肉にもかなり高いことが明らかとなった。

4) 肝カタラーゼ低下物質をsarcomaの顆粒分画から抽出することは困難であった。有効物質は顆粒分画を沸とう水中1時間熱処理しても、肝カタラーゼ低下作用は失われないが、可溶化することはできなかった。この顆粒分画はトリプトファンピロラーゼ活性低下作用も示すが、この活性は熱処理により完全に失活した。in vivoで肝臓酵素に影響を及ぼす物質は顆粒分画をアセトンに続いてクロロホルム-メタノール(2-1)で処理すると、水溶化された。水溶化した有効物質をSephadex G-25でmolecular sieveすると、excluded fractionは肝カタラーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素活性に影響を及ぼすが、diffused fractionはそれらに影響を及ぼさなかった。diffused fractionの中で、無機塩よりも遅れて分画される物質は肝トリプトファンピロラーゼ活性低下作用を示した。前者の活性は非常に不安定で1週間以内で完全に失われた。

excluded fractionを以後“crude sample”と呼ぶことにする。

5) Sephadex G-75あるいはG-200を用いたmolecular sieve fractionationにおいて、crude sampleをexcludedとdiffusedの分画に分け、肝カタラーゼ低下作用を調べたところ、両者共活性を示した。このことはcrude sample中には分子sizeの異なる2種ないしはそれ以上の種類の有効物質が存在することを示している。crude sampleをpH 4にすると、沈澱が生ずる。その沈澱(pH 4-PPT)、上清(pH 4-SUPE)共に肝カタラーゼ低下作用を示した。Ampholine carrier ampholyteを用いた等電点分画法により、pH 4-SUPE中の物質を等電点(pI)を異にする7つのグループに分けた：pI 3.39~3.43, 3.44~3.90, 4.05~4.60, 4.82~5.31, 5.45~6.75, 7.19~8.76, 8.82~9.48, pI 7.19~8.76のグループ以外は全て肝カタラーゼ低下作用を示し、pH 4-SUPEがpI値を異にする種々の有効物質を含むことが明らかとなった。pH 4-処理と、等電点分画する間に、crude sample中の非透析性物質が著しく透析性物質に変化し、totalの肝カタラーゼ低下活性は減少した。

6) crude sample中にタンパク質加水分解酵素が存在することが明らかとなった。その酵素は種々の物質と結合しているかの様に思われた。酵素はcrude sampleをSephadex G-200でmolecular sieveして得られる全ての分画に含まれていた(後述)。crude sampleをpH 7.0, で30°-incubateすると、肝カタラーゼ低下物質は低分子化し、肝カタラーゼ低下活性は減少した。全てではないが、低分子化のある部分は混在する酵素によって触媒されており、他の部分は、非酵素的なmolecular complexの解離に原因しているように思われた。crude sample中のタンパク質分解酵素の約75%はpH 4-SUPEに分画され、残りはpH 4-PPTに分画された。molecular sieve fractionationにより、pH 4-PPTを4つの分画に区別した：F-1 (mol. wt. $\geq$ 200,000)、F-2 (average mol. wt. $\sim$ 70,000)、F-3 (average mol. wt. $\sim$ 12,000)、F-4 (mol. wt. $\leq$ 5,000)。F-4以外は全て肝カタラーゼ低下作用を示した。pH 4-PPTをpH 7.0, 30°でincubateすると、F-1はF-2及びF-3に、最終的にはF-4に低分子化した。7) pH 4-PPTをpH 4.0の下で70°15分間熱処理した後、molecular sieveして4つの分画に分けた(F-1, F-2, F-3, F-4)。F-4以外は肝カタラーゼ低下作用を示した。F-1, F-2, F-3はpH 7.0, 30°でincubateしてももはや安定で低分子化しない。70°, 15分の熱処理をくり返すと、F-3はもはや分子sizeの上に変化を起さないけれども、F-1, F-2はF-2, F-3とF-4及びF-3とF-4に夫々小分子化した。F-1, F-2の小分子化の際に生じたF-4は小分子DNAから成っておりポリペプチド(アミノ酸)ではない。こうして得られたF-3は殆んどhomogeneousである。ディスク電気泳動において、存在する大

部分の物質は単一のzoneを示した。F-3の分子量は約12,000で約80%のproteinと約20%のDNAから成っている。F-1, F-2, F-3のpI値はほぼ4であった。

タンパク質分解酵素の存在下、F-3は部分的に、種々のpI値の、しかも活性を示す物質にdigestされるものと思われる。部分的にdigestされた生成物は透析すると、吸収スペクトルの上においてDNAの存在を全く示さないで、F-3のpolypeptide部分が肝カタラーゼ低下作用を示すように思われる。

論文の審査結果の要旨

肝catalaseは担ガンなどの原因によって、その全活性が低下することが知られている。ガン組織の抽出物を正常動物へ注射すると、肝catalase活性が低下することを発見し、中原、福岡(1949)はこの因子をtoxohormoneとよんだ。

松尾雄志君の研究内容は主として次の4項に大別できる。

- 1) 担ガンによる肝catalaseの量的および質的変動の解析
- 2) 肝catalaseをin vivoで変動させる物質(CIF: Catalase-Influencing Factor)の精製とその性状の研究
- 3) CIFの細胞内分布の研究
- 4) 担ガンによって質的変動をする他の肝酵素の検索

ラットの背部皮下へRhodamine sarcomaを移植すると、そのガンの成長につれて肝catalase全活性の低下は質的に異なる2種の現象に区別された。すなわち、その低下は、ガン成長中期までは酸性に等電点(pI)をもつcatalase isozymes(酸性catalase)の著しい減少と中性catalaseの増加の和によっておこり、中期以後では酸性catalaseと中性catalaseの両者が著しく減少することによっておこる。ガン組織から精製したCIF(下述)を正常動物へ注射することによっておこる肝catalaseの変動は担ガン中期までの変動に酷似する。検索した他の肝酵素のうちでglucose-6-phosphate dehydrogenaseは、担ガンによって、全活性での変化は一般に見られないけれども、そのpI 5.2-isozymeの著しい減少とpI 5.9-isozyme著しい増加がおこることを見出した。このようなisozymeレベルでの増加と減少は、担ガン中期までの肝catalaseの場合と内様に、ガン組織から抽出した物質を正常動物へ注射することによってもおこる。したがって、このisozymesの減少と増加は同じ要因によって惹起される可能性が考えられ、このようなisozyme patternの変化をseesaw changeとよんだ。

上述の肝catalase影響因子(CIF)は肝臓では検出できないけれども、筋肉にはガン組織の約10%量存在する。ガン細胞の顆粒を分画して、CIFの分布をしらべると、CIFは核に局在していることが分かった。

ガン組織ホモゼネートから集めた顆粒分画をアセトンとクロロホルムの混液で洗滌して脂質、リン脂質を除去すると、結合CIFは容易に水溶化されるのであるが、抽出液中に共存するproteaseによつてCIFが加水分解され失活する。有機溶媒で処理する前に顆粒分画を70° 5分間処理するとproteaseが失活するので、このように予め熱処理した顆粒分画を用いるとCIFは安定な状態で抽出される。活性

測定に非常に手間のかかる物質の精製に適するように組立てた精製方法によって、CIFの精製を試みた。精製CIFは電気泳動的には単一で、分子量約1万（分子篩法）、pI約4（等電点分画法）、タンパク質（～80%）とDNA（～20%）から成る。肝glucose-6-phosphate dehydrogenaseのisozymeを変化させる活性はCIFの粗標品にはみられないけれども、精製CIFにはみられない。

CIFが細胞核に局在していること、担ガン中期までと同様なisozyme patternの変化をCIFが惹き起こすこと、CIFを精製してその性状をしらべたこと、の三点によって、肝酵素の質的変動の機構に関する新しい知見と解析方法をもたらしたものであり、したがって、松尾雄志君の業績は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。