



Title	ラット肝臓リンゴ酸酵素の結晶化とその性質
Author(s)	沼田, 憲男
Citation	大阪大学, 1975, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31461
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

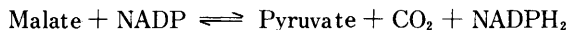
【 6 】

氏 名・(本籍)	沼 田 憲 男
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 3 4 1 8 号
学位授与の日付	昭 和 50 年 6 月 9 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	ラット肝臓リンゴ酸酵素の結晶化とその性質
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 神 前 五 郎
	(副査) 教 授 坂 本 幸 哉 教 授 和 田 博

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

リンゴ酸酵素 (Malic Enzyme, ME と略記) は次の反応を可逆的に触媒する酵素である。



この酵素は脂肪酸合成が盛んな時に活性増加が認められることから、生理的意味は脂肪酸合成に必要な NADPH₂ を供給することであると考えられているが、我々の研究グループは pyruvate から malate を産生し、ミトコンドリアによる citrate の産生を盛んにして、脂肪酸合成の材料である acetyl CoA を供給することであると考えている。酵素を精製し、その性質を研究することは、このような生理的意味を明らかにする手段として重要である。

〔方法ならびに成績〕

動物は Sprague-Dawley 系ラット (200~250g) を用いた。ME 活性は、25℃, 100mM Tris- HCl 緩衝液 (pH7.4), 5 mM MgCl₂, 1.5mM malate, 0.5mM NADP を含む反応液で NADPH₂ の産生を 340nm の吸光度の変化で測定した。

酵素の精製は、ラット (約70匹) を3日間絶食させ、甲状腺末を1%含有する高糖質食を3日間投与して、ME が誘導形成された状態の肝臓 (約700g) を材料とした。これを等量の 0.25M sucrose, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 2mM mercaptoethanol を含む溶液で homogenize し、10,000×g, 20分間遠沈して上清をとり、Mg acetate を0.1Mになるように加え、酢酸で pH を5.5として、50℃, 1分間熱処理した後、60~70%の硫酸画分を得た。これを 20mM EDTA, 2mM mercaptoethanol 溶液に溶解し、同じ溶液を用いて Sephadex G-200 で chromatography を行い、ME 活性画分をとり、23~43% ethanol

画分を得た。これを DEAE-cellulose chromatography (吸着: 30mM Tris-HCl, 2mM mercaptoethanol pH7.7, 溶出: 5 mM $MgCl_2$ の添加) で精製して比活性が一定の部分を集めて、蛋白濃度を 2 mg/ml 以上に濃縮して放置すると四角板状の結晶が析出する。比活性は 20μ moles/min/mg, 収量は 24% であった。この結晶酵素は低濃度 (30~50mM) 塩類溶液中では難溶性であり、塩濃度をあげる (250~500mM) ことによって溶解した。結晶酵素の suspension (4 mg/ml) に 9 倍容の飽和硫安溶液を漸次加えて、溶解させるとともに塩析沈でんさせ、適当量の溶液に溶解 (2 mg/ml) し、30mM Tris-HCl (pH 7.7), 2mM mercaptoethanol, 5mM $MgCl_2$ に対して透析すると再結晶を得ることができる。この際、 $MgCl_2$ をぬくと結晶しないが、mercaptoethanol をぬいても結晶する。再結晶酵素も一次結晶酵素と同じ形、同じ比活性をもっていた。3.2% Ampholine (pH 3-10) を含む 4% polyacrylamide gel 内での電気泳動後、蛋白染色、活性染色ともに単一の band を示し、等電点は 6.3 である。SH 試薬である mercaptoethanol は ME の精製に安定化剤として用いられているが、かえって ME を不安定にすることも報告されている。この矛盾は Mg^{++} の有無によるもので、 Mg^{++} の存在しない場合に、mercaptoethanol によって不安定になる。生理的な SH 試薬である glutathione についても同様の結果が得られた。ME は脂肪酸合成に関与することが示唆されているが、脂肪酸は Mg^{++} の存在下で ME を不活性化する。この影響は生理的な遊離脂肪酸濃度の範囲内で認められ、しかも濃度に依存している。 Mg^{++} が存在しない場合は、脂肪酸は ME を安定化する。この結果は、脂肪酸の作用が単なる detergent としてではなく、ME に対して特異的なものであることを示している。蛋白質濃度が高い場合 (0.5~1 mg/ml), 精製酵素は安定である。稀薄溶液では、ME は徐々に失活する。助酵素である NADP, NADPH₂ はともに稀薄溶液における ME の失活を保護するが、両者の間に差異を認めない。基質である malate, pyruvate はどちらも ME を失活から保護しない。1% 牛血清 albumin を加えておくと ME の失活は少なく、助酵素による保護作用は認められなくなる。また malate は ME の失活を促進する。

〔総括〕

- 1) 精製法を改良して、ラットの肝臓から、助酵素を含まないリンゴ酸酵素の結晶を収量良く得ることができた。この結晶には Mg^{++} が必要である。結晶酵素は四角板状であり、isoelectric focusing で単一の band を示し、等電点は 6.3 であった。
- 2) Glutathione, mercaptoethanol は Mg^{++} が存在しない場合に精製リンゴ酸酵素を不安定にする。
- 3) 脂肪酸は生理的濃度の範囲で、 Mg^{++} が存在する場合はリンゴ酸酵素を不安定にし、 Mg^{++} が存在しない場合は逆に安定化する。
- 4) 助酵素は稀薄溶液でのリンゴ酸酵素を失活から保護するが、基質は malate, pyruvate とともに保護作用が認められなかった。
- 5) Albumin の存在下では、リンゴ酸酵素の失活は少なく、助酵素による保護作用は認められない。また malate は失活を促進する。
- 6) 以上の結果リンゴ酸酵素は、脂肪酸、 Mg^{++} 、glutathione、助酵素、基質などの相対的濃度によって調節をうけていることが考えられる。

論文の審査結果の要旨

リンゴ酸酵素は脂肪酸合成に関与することが知られているが、その詳細については議論があり、まだ明らかではない。この研究はリンゴ酸酵素の生理的意味を明らかにする手段として、ラットの肝臓からこの酵素を精製、結晶化し、その性質をしらべたものである。リンゴ酸酵素は、1967年 Hsu, Lardy によってハトの肝臓から結晶化されているが、他の動物についてまだ結晶化されていない。またハト肝臓からの結晶酵素は助酵素 NADP^+ を含んだものであるが、この研究による結晶は助酵素を含まないという点でも特徴がある。さらに精製酵素の試験管内での安定性に対する影響から、glutathione, 基質 (malate, pyruvate), 助酵素 (NADP^+ , NADPH), Mg^{++} , 脂肪酸などによってこの酵素の細胞内レベルが調節されている可能性を示した。従ってこの研究は独創的かつ発展性に富んだものであり、学位論文として充分価値あるものと認める。