



Title	ウシ肝臓のD-エリスルコース還元酵素の精製とその諸性質に関する研究
Author(s)	谷本, 剛
Citation	大阪大学, 1975, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31476
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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

【2】

氏 名・(本籍)	谷 本 剛
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	第 3 4 5 8 号
学位授与の日付	昭和 50 年 9 月 30 日
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	ウシ肝臓の D-エリスルコース還元酵素の精製と その諸性質に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 上原喜八郎 (副査) 教授 青沼 繁 教授 岩田平太郎 教授 近藤 雅臣

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

高等動物の体内における単糖類の代謝に関する研究は古くからおこなわれている。とりわけ、トリオース、ペントース、ヘキソースについては生化学的、酵素化学的に注目すべき多くの研究結果がすでに得られている。ところが、テトロースの代謝については、わずかに、Uehara らがウサギ筋肉中に D-エリスルコースの D-エリスルコースへの異性化を促進する酵素 (D-erythrose isomerase [EC 5, 3, 1, 2]) の存在することを示唆し、Batt らが D-エリスルコースをラットの腹腔内に注射すると炭酸ガス、肝グリコーゲン、尿中テトリートルなどに代謝されることを認め、また Touster らが入尿中に、Williams らがウシ尿膜液中に比較的多量のエリスリトールの存在していることを見い出しているにすぎず、ほとんど研究されていない。しかし、これらの数少ない実験結果は、テトロースの生体内での運命の一つを示唆しており、またテトロースが糖の代謝過程における中間体として何らかの役割を演じていることを推察させ、近年注目されてきている。

ところで、1963年 Uehara らはウシ肝臓のホモジネートを D-テトロースである D-エリスルコース、あるいは D-スレオースに作用させるとこれらの D-テトロースの還元力が減少することを認め、その反応生成物としてそれらに相当する糖酸と糖アルコールを検出している。このことはウシ肝臓中に D-テトロースの代謝を促進する酵素の存在することを示唆しており、著者はこの実験結果に基いて、D-テトロースの代謝を促進する酵素の本体とその性状を明らかにする目的で本研究に着手した。

本研究において、著者はウシ肝臓中に D-エリスルコースの還元を促進する酵素 (以下 D-エリスルコース還元酵素と称する) が存在することを見い出し、本酵素を均一な結晶酵素として単離すること

に成功した。また、精製した本酵素の諸性質について詳細に検討し、いくつかの興味ある性質を見出した。

本 論

(1) ウシ肝臓 D-エリスルコース還元酵素の精製と結晶化

ウシ肝臓のアセトン乾燥粉末の抽出液から、アルミナ C_γゲル処理、アセトン分画をおこなったのち、セファデックス G-200ゲル濾過、ジエチルアミノエチルセルロースカラムクロマトグラフィー、ハイドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーをおこなって、D-エリスルコース還元酵素を精製単離し、これをさらに硫酸溶液による塩析法によって結晶化し、針状晶を得た。この酵素標品はディスク電気泳動的、超遠心分離的に均一なものであった。

(2) D-エリスルコース還元酵素の酵素化学的性質

本酵素は還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) あるいは還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェイト (NADPH) のいずれをも水素供与体として D-エリスルコースの還元を特異的に促進し、エリスリトールを生成した。本酵素が NADH と NADPH の両者を利用し得ることは二種類の酵素の存在によっても考えられるが、i) 本酵素はディスク電気泳動的、超遠心分離的に均一な結晶酵素であること、ii) NADH を用いたときの活性と NADPH を用いたときの活性の比が精製の各段階においてほぼ一定であること、iii) 各種クロマトグラフィーにおいて、NADH を用いたときの活性と NADPH を用いたときの活性が一致して認められること、などから両水素供与体の利用は単一酵素によるものであると考えられる。

本酵素の反応至適 pH は NADH を水素供与体としたときには pH 6.25 であり、NADPH を水素供与体としたときは pH 5.85 であった。また酵素の基質に対する親和性を検べると、D-エリスルコースに対するミハエリス定数 (K_m) は水素供与体に NADH を用いたとき $1.2 \times 10^{-4} M$ であり、NADPH を用いたときは $0.97 \times 10^{-4} M$ であり、いずれの水素供与体を用いてもほぼ同じであった。一方、水素供与体に対する K_m は NADH で $2.2 \times 10^{-4} M$ であり、NADPH で $6.8 \times 10^{-6} M$ であり、酵素に対する親和性は NADPH の方が NADH よりもはるかに大きかった。

本酵素の安定性は温度に大きく影響され、25~30℃で最も安定であったが、温度の低下にともなって不安定となり、特に12℃以下でその失活は著しくなった。

(3) D-エリスルコース還元酵素の物理化学的性質

本酵素の1%溶液の280nmにおける吸光係数 ($E_{1\%}^{1cm}$, 280nm) は6.07であった。本酵素のアミノ酸組成を検べると、トリプトファン4、リジン28、ヒスチジン11、アルギニン52、アスパラギン酸79、スレオニン58、セリン56、グルタミン酸68、プロリン20、グリシン80、アラニン107、システイン4、バリン112、メチオニン24、イソロイシン31、ロイシン88、チロシン7、フェニールアラニン22であり、本酵素の1分子あたりのアミノ酸残基数は851であった。本酵素はトリプトファン、チロシンの含有量が少ないタンパク質であることが明らかとなり、吸光係数 ($E_{1\%}^{1cm}$, 280nm) が比較的小さい理由も理解することができた。また、等電点はアンフォラインカラムで検べると6.75であった。本酵素の分子量はゲル濾過法および沈降平衡法で求めると約90,000であり、ドデシル硫酸ナトリウム含有ディ

スク電気泳動法で求めた分子量は約22,000であった。このことから本酵素は約22,000の同じ大きさの分子量をもつ4個のサブユニットから構成されていることが推察された。

(4) D-エリスルロース還元酵素の低温における失活とその保護

本酵素の安定性は温度に著しく影響され、低温になるほど不安定となり、失活が著しくなった。100mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 中に9.5 μ gの本酵素を含む酵素液を0℃に保つと7.5時間後に85%の、23.5時間後では約90%の活性が失われるが、21℃に保ったときには23.5時間後においても約20%の失活しか認められなかった。ところで本酵素のこのような低温における失活は塩濃度、pH、あるいは酵素濃度などにも大きく影響され、塩濃度の増加あるいは酵素濃度の減少によって低温における失活は促進され、またpHは8.5でその低温における失活は最も遅いが、それ以外のpHではpHの低下あるいは上昇とともに低温における失活は促進された。

本酵素の低温における失活は〔5〕で述べるようにニコチンアミドアデニジヌクレオチドフォスフェイト (NADP⁺) によって完全に保護された。しかし、NADP⁺と一部構造の類似した化合物、たとえばニコチンアミドアデニジヌクレオチド (NAD⁺)、アデノシン 5'-トリフォスフェイト (ATP)、アデノシン 5'-ジフォスフェイト (ADP)、アデノシン 5'-モノフォスフェイト (5'-AMP)、アデノシン 3'-モノフォスフェイト (3'-AMP)、アデノシン 2'-モノフォスフェイト (2'-AMP)、アデノシン 3', 5'-モノフォスフェイト (cyclic AMP)、ニコチンアミド モノヌクレオチド (NMN)、アデノシン、ニコチンアミドなどにはまったく保護効果は認められなかった。本酵素が低温において失活している途中でNADP⁺を添加しても、その保護効果は認められ、NADP⁺を添加したときの活性が維持された。また酵素濃度の約30倍の濃度で完全な保護効果を示した。

本酵素の低温における失活にともなう分子量の変化をゲル濾過法で検べると、低温失活していない酵素では分子量約90,000に相当する分画に単一のピークとして溶出してくるが、低温において失活した酵素では分子量約40,000および約20,000に相当する分画にも溶出ピークが認められた。このことから本酵素の低温における失活はサブユニットへの解離をとまなっているのではないかと考えられた。

(5) D-エリスルロース還元酵素の低温における失活を保護する因子の単離と同定

本酵素の精製操作にはセファデックスG-200を用いたゲル濾過がふくまれているが、この操作をおこなうと本酵素は低温で著しく不安定になる。すなわち、セファデックスG-200でゲル濾過をおこなう前の標品 (分画Ⅲ) は0℃に保っても失活しなかったが、ゲル濾過をおこなった後の標品 (分画Ⅳ) は著しく失活した。また、分画Ⅲを80℃で5分間加熱処理して得た上清を分画Ⅳに添加しておけばその低温における失活は認められなくなった。このことから分画Ⅲの中には本酵素の低温における失活を保護する耐熱性で低分子量性の因子 (以下保護因子と称する) が存在することが考えられた。

そこで保護因子の単離を試み、分画Ⅲから加熱処理、ダウエックス1×2 (ギ酸型) カラムクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィーをおこなって精製単離した。

単離した保護因子は紫外吸収スペクトル、ペーパークロマトグラフィー、濾紙電気泳動、構成々分比、グルコース 6-リン酸脱水素酵素に対する補酵素活性の測定などによってNADP⁺であると同定した。

結 論

ウシ肝臓から D-エリスルコース還元酵素をディスク電気泳動的、超遠心分離的に均一な結晶酵素として単離することに成功した。

本酵素は NADH あるいは NADPH を水素供与体として D-エリスルコースを特異的に還元し、エリスリトールを生成する酵素であることが明らかとなった。

本酵素はトリプトファン、チロシンの含有量が少なく、pH6.75の等電点をもつ中性タンパク質であった。またその分子量は約90,000であり、約22,000の同じ大きさの分子量をもつ4個のサブユニットから構成されていた。

本酵素は低温に保つと著しく失活した。この低温における失活は塩濃度、pH、酵素濃度などに著しく影響された。またこの低温における失活はサブユニットへの解離をともなっていると考えた。

本酵素の低温における失活は低濃度の NADP^+ によって完全に保護されることが明らかとなったが、 NADP^+ と構造的に関係の深い NAD^+ 、ATP、ADP、AMP、NMN、アデノシン、ニコチンアミドなどにはその保護効果はまったく認められなかった。

論文の審査結果の要旨

人尿にはかなり多量のエリスリトールが排泄されているが、その生成過程は全く不明であった。谷本は D-エリスルコースが還元されエリスリトールが生成する反応を促進する酵素 (D-エリスルコース還元酵素) が牛の肝臓中に含まれていることを発見しヒトの体内におけるエリスリトールの生成過程を示唆することができた。なお、谷本はこの酵素を精製し、結晶状に得ることに成功し、さらにこの酵素の興味ある二・三の性状を明らかにすることができた。

論文の内容は上述のようなものであり、学位論文として十分に価値のあるものである。