

Title	ウサギ肝ミクロゾームからのUDP-グルクロニルトランスフェラーゼの精製とその性質
Author(s)	湯浅, 亮
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31943
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

[25]

氏名・(本籍)	湯 浅 亮
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 4081 号
学位授与の日付	昭和52年10月5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	ウサギ肝ミクロゾームからのUDP-グルクロニルトランス フェラーゼの精製とその性質
論文審査委員	(主査) 教授 佐藤 了 (副査) 教授 倉橋 潔 教授 福井 俊郎

論 文 内 容 の 要 旨

肝ミクロゾームのUDP-グルクロニルトランスフェラーゼ(GTase)はグルクロン酸抱合を触媒する酵素として薬物代謝において重要な役割を果たしている。本研究においては、先ずp-ニトロフェノールを受容体とするこの酵素の新しい活性測定法を開発し、これを用いてウサギ肝ミクロゾームからこの酵素を高度に精製し、その分子的ならびに触媒的性質を検討した。

精製に先立ち、GTaseの安定化条件を明らかにし、その条件を精製に利用した。ミクロゾームから0.5%コール酸ナトリウムで可溶化したのち、 ω -アミノ-n-ヘキシルセファロース4B、DEAE-セルロース、およびヒドロキシルアパタイトのカラムクロマトグラフィーによりGTaseを約40%の純度に得ることができた。この標品はミクロゾームの電子伝達系の成分を含まず、また可視部に吸収を示す活性基をもっていない。さらに、GTaseは分子量約60,000のタンパク質であり、かなりの量の糖鎖をもつ糖タンパク質であるらしいことが明らかとなった。精製標品はホスファチジルコリン(PC)リポゾームと結合する能力をもっている。

GTaseはミクロゾーム小胞内で潜在性を示し、界面活性剤、音波などで膜を破壊したときのみ最大活性を示すことから、小胞膜内、おそらく膜の内表面に結合して存在していると考えられるが、事実部分精製したGTaseはトリプシンによって失活するがミクロゾームの活性は膜によって保護されており、トリプシンの攻撃を受けないことが示された。

高度に精製されたGTase標品はリン脂質含量がかなり低下しており、その活性はPCリポゾーム添加によっていちじるしく増大する。最大活性の50%を与えるPC濃度は0.04 mMと求められたが、この値はGTaseのp-ニトロフェノールおよびUDP-グルクロン酸に対するKm値(1.0 mMおよ

び2.2 mM) よりかなり低い。GTase の PC リポゾームへの結合反応が時間ならびに温度に依存する反応であるのに対して、GTase 活性に対する PC の効果は瞬間的に起こり、かつ温度に依存しない。PC 添加はまた酵素の熱に対する安定性を高める。これらのことから、リン脂質を失った GTase は不活性であるが、これに補助因子として微量のリン脂質(とくに PC) が与えられると、これと速やかに相互作用をすることによって活性を発揮するものと思われる。しかし、この相互作用の内容についてはまだ明らかでない。なお、オイゲノールは p- ニトロフェノールと拮抗して阻害する。

以上の知見を総合すると、GTase 分子は PC と結合するいわばアロステリック部位にあたる部分と、グルクロン酸供与体と受容体としてはたらく両基質を結合する部位とをもつものと考えられる。またこの分子には糖鎖の結合した親水性領域と膜結合に与かる疎水性領域が存在し、後者を介して小胞体膜の内表面に結合しているものと推定される。

以 上

論文の審査結果の要旨

UDP- グルクロニルトランスフェラーゼ(GT と略称する) は各種薬物のグルクロン酸抱合を触媒する酵素であり、薬物代謝においてきわめて重要な役割を果たしているが、それがミクロゾーム膜に強く結合しているために、その精製は困難であり、したがってその性質も不明の点が多かった。

湯浅君はまず p- ニトロフェノールを受容体とする GT の新しい活性測定法を開発し、これを用いてウサギ肝ミクロゾーム膜から GT を可溶化し、純度約40%にまで精製することに成功した。またその分子量が約6万であることを決定した。このようにして得られた GT 標品は糖タンパク質であり、ホスファチジルコリンのリポゾームに結合する能力を持っている。さらに、この GT 標品は最大活性を発現するためにリン脂質(ホスファチジルコリン)の添加を要求するが、これは GT がリン脂質リポゾームと結合するためというよりは、リン脂質のある種の cofactor とするためであると考えられる知見を得ている。リン脂質の添加はまた GT の熱安定性を増加させることを見出している。

湯浅君はさらに部分精製 GT 標品の UDP- グルクロン酸、p- ニトロフェノール、およびホスファチジルコリンに対する Km 値を決定し、かつこの標品が p- ニトロフェノールやオイゲノールへのグルクロン酸転移を活発に触媒するが、フェノールフタレインやビリルピンは受容体として弱い働きしかもたないことを明らかにしている。

最後に、部分精製 GT 標品がトリプシンによって容易に失活するのに対し、ミクロゾームの GT 活性がトリプシンによる失活を全く受けないことから、GT はミクロゾーム小胞膜の内腔に面した膜面に局在していることを結論した。

以上のように、湯浅君は従来困難とされていた GT の可溶化と部分精製に成功し、この重要な酵素の分子的性質について多くの新知見を得ている。したがって湯浅君の論文は理学博士の学位に十分に値するものと認められる。