

Title	後成的修飾機構によるLDHアイソザイムサブバンド形成
Author(s)	山村, 研一
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32117
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

氏名・(本籍)	山 村 研 一
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 4 2 3 9 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 内科系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	後成的修飾機構による LDH アイソザイムサブバンド形成
論文審査委員	(主委) 教 授 宮 井 潔 (副査) 教 授 中 川 八 郎 教 授 熊 原 雄 一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

生体の各組織における特異的な代謝パターンの存在は、遺伝子の選択的発現の結果である。この遺伝子の選択的発現は、蛋白質の合成過程のみならず修飾過程及び崩壊過程などあらゆるレベルでの調節によってもたらされる。最近になって、伝令 RNA を鋳型として翻訳され、DNA の塩基配列を反映しているペプチドが、産生されたのち何らかの機序により修飾を受ける過程（後成的修飾 epigenetic modification あるいは post-transcriptional modification）に重大な関心がはらわれるようになってきた。実際、こういった後成的修飾により生成された蛋白質の構造と機能が変化していることが、ヘモグロビンなどについてすでに明らかにされている。この後成的修飾が、酵素蛋白質についておこり、これが生体内で何らかの生理的役割を有しているかについて LDH をモデルとして研究を行った。

〔方法ならびに成績〕

1. 微量垂直式電気泳動装置を荻田の方法に準じて作製し、電気泳動を行った。
2. 電気泳動法ならびに泳動条件：支持体としては 7% ポリアクリルアミドゲルを用いた。ゲル緩衝液は、0.1875 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 8.8) を用い、電極用緩衝液には、12.5 mM トリス・グリシン緩衝液 (pH 8.3) を用いた。酵素活性の染色には、NAD 30 mg, Nitroblue Tetrazolium (NBT) 18 mg, Phenazin Methosulfate (PMS) 2 mg, 40% Na-DL-Lactate 5 ml, 0.5 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 8.8) 5 ml, 蒸留水 40 ml の組成の反応液を用いた。

マウスの各組織の抽出液に含まれている LDH 活性を上記方法により分離検出すると、5 つの LDH アイソザイム主成分について各組織に特異的な泳動分離像が得られる。最も速く泳動される主成分 LDH

1を除く、他の4つの各主成分LDH泳動帯にそれぞれ多くのSubbandが存在することを認めた。これらSubbandの数は、肝臓・心筋などではLDH 2主成分の位置に2本、LDH 3主成分の位置に3本、LDH 4主成分の位置に4本、LDH 5主成分の位置に5本それぞれ存在することが認められた。即ちLDH活性は5つの主成分を含めて合計15本の活性泳動帯に分離検出されることになる。これはLDHのAサブユニットに少なくとも2種類存在することを暗示している。さらに腎には、以上のAサブユニットは異なったAサブユニットの存在が認められたので、Aサブユニットには少なくとも3種類存在することが確認されたことになる。これらのAサブユニットを易動度の速い順にA¹、A²、A³と表記することにした。これら3種類のAサブユニット間の関係を検討するために種々の実験を行った結果、SH化合物によってAサブユニットの相互変換のおこることが確認された。即ち組織抽出液にβ-メルカプトエタノールを加えることにより、A¹はA³に、A²はA³に変換される。また生体内に生理的に存在するグルタチオンによってA²→A¹→A³に変換される。さらにシステインを加えるとA¹→A²→A³に変換される。

3. LDH 5分画（主としてA¹サブユニットより成る四量体を含む）をBlue-dextran Sepharose Column chromatographyを用いて分取精製した。このLDH 5分画（A₁⁵）とこの分画を5 mM β-メルカプトエタノールで処理しA³サブユニットに変換させたもの（A₃⁵）について、ピルビン酸あるいは乳酸に対するKm値を測定比較したが、両者間に差異は認められなかった。しかし、A₃⁵はA₁⁵より明らかに熱安定性が增大していることが認められた。

4. 同様の方法で精製したLDH 3分画（B₂A₂³を主として含む）をグルタチオンで処理していくと、LDH 3は消失しLDH 4（主としてB₁A₃³を含む）あるいはLDH 5（主としてB₀A₂³やB₀A₁A₃³を含む）などのアイソザイムが生じた。この事は高濃度のグルタチオンによって、LDHアイソザイムの再構成がおこったことを暗示している。

〔総括〕

1. マウスLDHアイソザイムを構成するサブバンドが、グルタチオンやシステインなどの還元物質により生ずること、即ち遺伝的なものでなく、後成的修飾機構により生じることを明らかにした。

2. 後成的修飾をうけたLDHは、酵素化学的性質は変化しないが、熱安定性は増大することを明らかにした。

3. 各組織におけるLDHアイソザイムパターンが、単に各サブユニットの産生量のみによって決定されるのではなく、ペプチド産生後におこる後成的修飾によっても制御される可能性の存在することを暗示した。

論文の審査結果の要旨

ヒトを含めた、哺乳動物の組織や臓器にLDHアイソザイムのサブバンドが存在することは以前から知られていたが、構成するサブユニットについての報告はなかった。本論文の目的はこれらのサブ

バンドが、重複遺伝子によるか、あるいは、後成的な修飾によるサブユニットによって構成されているかどうかを明らかにすることにあつた。

研究の結果、サブバンドは、還元型グルタチオン、システイン、過酸化水素などの関与する修飾機構によって生成されることを明らかにし、その生理的存在意義についても論じている。

本研究は、アイソザイムサブユニットの形成が後成的修飾によって生じることを、論理的な方法で明らかにしたもので、博士論文としてすぐれたものである。