OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	尿中β-アスパルチルアミノ酸の研究　第1報　その分離同定と人尿中の濃度について　第2報　その合成酵素について
Author(s)	田中, 哲徳
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32121
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

【8】

氏名・(本籍)	田中哲徳
学位の種類	医学博士
学位記番号	第4229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　生理系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**尿中β-アスパルチルアミノ酸の研究** **第1報　その分離同定と人尿中の濃度について** **第2報　その合成酵素について**
論文審査委員	(主査) 教授 垣内　史郎 (副査) 教授 坂本　幸哉　教授 和田　博

論文内容の要旨

〔目　的〕

尿中のアスパラギン酸には遊離型と結合型がある。結合型アスパラギン酸の約¼量はアスパラギンで説明できるが，残りの¾量については未知であった。1962年β-アスパルチルヒスチジンが，ついで翌年14種のβ-アスパルチルオリゴペプチドが尿中より分離同定され，結合型アスパラギン酸の未同定部分の解明に大きな手掛を与えたが，尿中のこれらのペプチドの定量はなされていない。

本研究は人尿の酸性アミノ酸分画を用いβ-アスパルチルアミノ酸の分離同定を行ない，さらにアミノ酸自動分析法を工夫して酸性β-アスパルチルアミノ酸の定量を行なって結合型アスパラギン酸の未同定部分を明らかにするとともに，これらのβ-アスパルチルアミノ酸の合成に関与する酵素を同定し，β-アスパルチルアミノ酸と生理的意義の解明への基礎的知見を提供することを目的とする。

〔方法ならびに成績〕

α-およびβ-アスパルチルアミノ酸ならびにα-およびγ-グルタルアミノ酸の合成：Z-アスパラギン酸あるいはZ-グルタミン酸の無水物とアミノ酸のエチルエステルを酢酸エチル溶液中で縮合させ，生成物を接触還元し，鹸化したのち生成したジペプチドをイオン交換クロマトグラフィーを用い精製した。

β-アスパルチルアミノ酸とγ-グルタミルアミノ酸の分離同定：120ℓの人尿（115gクレアチニン当量）からAmberlite IR 120, H^+型とDowex 1×8，酢酸型のカラムを用い酸性アミノ化合物分画を調製した。これをAmberlite IR 120のカラムでイオン交換クロマトグラフィーを行ない5つの分画に分け，各分画をさらにDowex 1×10のカラムでイオン交換クロマトグラフィーおよび高圧濾

紙電気泳動を用いて精製し，11個のニンヒドリン陽性物質をえた。これらの物質の同定は1）酸水解 2）DNP法によるN末端アミノ酸の決定　3）合成品との諸性質の比較により行なった。その結果β-Asp-Asp，Glu，-Ser，-Thr，-Gly，-Ala，AspN，-Metおよびγ-Glu-Gly，-Thr，-Valを同定した。

人尿中の酸性β-アスパルチルアミノ酸の定量：4mgクレアチニン当量の尿よりDowex 1×8樹脂を使用して調製した酸性アミノ酸分画を用いて定量した。0.8×50cmのSCX 1001カラムに通し，0.3Mクエン酸リチウム，pH 2.15，を用い，温度45℃，流速60mℓ/hの条件下でアミノ酸分析を行なった。正常人尿ではβ-Asp-Gly≫-Ala≧-Glu≧-Ser>-Asp>-Thrの順に濃度が高く，総量では小児>女>男の順に高かった。高カロリー輸液患者の尿にも女とほぼ同等量が排泄されていた。

β-アスパルチルアミノ酸合成酵素の精製とその性質：ラットの腎の0.1M Tris-HCl，pH9.0，の抽出液より，1）熱処理（55℃，5分間）　2）硫安分画（45—68%）　3）DEAEセルローズカラムクロマトグラフィーにより約11倍に部分精製した。精製酵素標品を用いβ-Asp-Serをβ-アスパルチル基の供与体に，グリシンを受容体にして反応の性質を検討した結果，反応は酵素量と反応時間に比例して進み，至適pHは9.0であることが判った。β-アスパルチル基の供与体としてはAspN≫β-Asp-Glu>-Asp>-Ser>-Thr>-Valの順によく，受容アミノ酸としてはGly≫Ala>Ser>Leu>Asp≧Thrの順によかった。またHis，Lys，Argも受容体となった。以上のことよりβ-アスパルチルアミノ酸合成酵素はアスパラギナーゼであると考えられた。事実酵素の精製段階でのアスパラギナーゼ活性とβ-アスパルチルアミノ酸合成活性の比活性の上昇はよく一致していた。

〔ま と め〕

1）人尿より8種のβ-アスパルチルアミノ酸と3種のγ-グルタミルアミノ酸を分離同定した。このうちβ-Asp-Asp，-Glu，-Metとγ-Glu-Gly，-Thrは人尿よりはじめて同定された。

2）人尿の酸性β-アスパルチルアミノ酸の定量を行ない，β-Asp-Gly≫-Ala≧-Glu≧-Ser>-Ser>-Thr の順に濃度が高いことを明らかにした。

3）β-アスパルチルアミノ酸合成酵素を部分精製し，その諸性質を検討した結果アスパラギナーゼであると考えられた。

4）この酵素反応のβ- アスパルチル基供与体としてはアスパラギンが最もよく，受容体としてのよさの順位は対応する尿中のβ- アスパルチルアミノ酸の相対濃度の順位とよく一致した。

論文の審査結果の要旨

本研究では，β- アスパルチルアミノ酸が生体内で，生理的に生成していることを，人尿より同上化合物（アスパラギン酸，グルタミン酸，セリン，トレオニン，グリシン，アラニン，アスパラギン，メチオニン等の残基をもつ）を分離して同定し，且つその生成酵素をラット腎より部分精製して性質をしらべることにより，明らかにしたものであって，アミノ酸或は蛋白質の代謝の生化学に，一つの新しい知見を与えるものである。論文において，方法論的基盤，実験結果の記述等に問題はなく，また結果の解釈も妥当と思われる。すなわち医学博士申請のための論文として適当と認められる。