

Title	尿中 $\beta$ -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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32121">https://hdl.handle.net/11094/32121</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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)	田 中 哲 徳
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 4 2 2 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 生理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	尿中 $\beta$ -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 $\frac{1}{4}$ 量はアスパラギンで説明できるが、残りの $\frac{3}{4}$ 量については未知であった。1962年 $\beta$ -アスパルチルヒスチジンが、ついで翌年14種の $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -アスパルチルアミノ酸の合成に関与する酵素を同定し、 $\beta$ -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〕

$\alpha$ -および $\beta$ -アスパルチルアミノ酸ならびに $\alpha$ -および $\gamma$ -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、鹼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。

$\beta$ -アスパルチルアミノ酸と $\gamma$ -グルタミルアミノ酸の分離同定：120 $l$ の人尿（115 $g$ クレアチニン当量）から Amberlite IR 120, H<sup>+</sup>型と Dowex 1 $\times$ 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 $\times$ 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  
 $\beta$ -Asp-Asp, Glu, -Ser, -Thr, -Gly, -Ala, AspN, -Metおよび $\gamma$ -Glu-Gly, -Thr, -Valを同定した。

人尿中の酸性 $\beta$ -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  
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°C, 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 $\beta$ -Asp-Gly $\gg$ -Ala $\geq$ -Glu $\geq$ -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。

$\beta$ -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°C, 5分間) 2) 硫酸分画(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 $\beta$ -Asp-Serを $\beta$ -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。 $\beta$ -アスパルチル基の供与体としてはAspN $\gg$   $\beta$ -  
Asp-Glu $>$ -Asp $>$ -Ser $>$ -Thr $>$ -Valの順によく、受容アミノ酸としてはGly $\gg$  Ala $>$  Ser $>$  Leu $>$   
Asp $\geq$  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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -アスパルチルアミノ酸と3種の $\gamma$ -グルタミルアミノ酸を分離同定した。こ  
のうち $\beta$ -Asp-Asp, -Glu, -Metと $\gamma$ -Glu-Gly, -Thrは人尿よりはじめて同定された。

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

3)  $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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、 $\beta$ -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。