

Title	ブタ心筋ミトコンドリアのアスパラギン酸アミノ基転移酵素の一次構造の決定：特にブロムシアンペプチドの単離と構造決定
Author(s)	榊原, 隆三
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32153
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)	榊原隆三
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4561 号
学位授与の日付	昭和 54 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医学研究科 薬理学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	ブタ心筋ミトコンドリアのアスパラギン酸アミノ基転移酵素の 一次構造の決定 ——特にプロムシアンペプチドの単離と構造決定——
論文審査委員	(主査) 教授 和田 博 (副査) 教授 吉田 博 教授 山野 俊雄

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

動物細胞には細胞内局在性を異にする 2 種類のアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (GOT) があり、一方は細胞質に (s-GOT)、他方はミトコンドリアに (m-GOT) 局在している。両アイソザイムは、類似の酵素反応を行うにもかかわらず、諸種の性質に差が見られ、とくに免疫化学的にまったく交叉反応を行わないことから、両者のたん白構造がかなり異っていると推測されてきた。それゆえに両者の一次構造を比較することにより反応機構や、両アイソザイムの起源に関して多くの情報を得られることが期待できる。

本研究は、m-GOT の全構造の決定と、Ovchinnikov らによって (1973 年) 明らかにされている s-GOT の一次構造との比較を目的とした。

本研究は数名の協同研究者によって完成されたが演者は特に、プロムシアンペプチドの単離と構造決定を行った。

〔方法ならびに成績〕

ブタ心筋より m-GOT を単一にまで純化精製し、それをカルボキシメル化したもの (CM-m-GOT) を構造決定の材料とした。

アミノ酸配列の決定は、おもに自動アミノ酸配列分析装置 (シーケンサー) による分析、手動エドマン分解、アミノ酸分析および酵素分解などの方法により決定した。

(1) CM-m-GOT の N 末端付近の一次構造の決定

シーケンサーを使用し、CM-m-GOT の N 末端より 52 残基のアミノ酸配列を決定した。

(2) CM-m-GOTのブロムシアン分解

CM-m-GOTをブロムシアン分解し, Sephadex G-75, Bio Gel P-4~10, Phosphocel-luloseなどにより, 13個のブロムシアンペプチドを回収しその構造を決定した。CM-m-GOTの全メチオニンを回収することができた。

(3) CM-m-GOTのトリプシン消化

CM-m-GOTをトリプシンで消化し, Sephadex G-50, DE52, AG50, 濾紙クロマトグラフィー, 高圧濾紙電気泳動により, 37トリプシンペプチド(326残基)を回収し, そのアミノ酸配列を決定した。

(4) m-GOTの全一次構造の決定

トリプシン, ブロムシアンペプチドの重ね合わせを行うことにより, ブタ心筋m-GOTの全一次構造を決定した(図)。残基数401(Trp 7, Lys 28, His 10, Arg 20, Asp 20, Asn 18, Thr 19, Ser 25, Glu 21, Gln 18, Pro 19, Gly 33, Ala 34, Cys 7, Val 27, Met 11, Ile 23, Leu 29, Tyr 13, Phe 19)である。

(5) s-GOTとの構造比較

m-GOTは, s-GOTと比べると11残基短かく, N末端付近に配列類似性の乏しいことが認めら

	10	20
Ser-Ser-Trp-Trp-Ala-His-Val-Glu-Met-Gly-Pro-Pro-Asp-Pro-Ile-Leu-Gly-Val-Thr-Glu-	30	40
Ala-Phe-Lys-Arg-Asp-Thr-Asn-Ser-Lys-Lys-Met-Asn-Leu-Gly-Val-Gly-Ala-Tyr-Arg-Asp-	50	60
Asp-Asp-Gly-Lys-Pro-Tyr-Val-Leu-Pro-Ser-Val-Arg-Lys-Ala-Glu-Ala-Gln-Ile-Ala-Ala-	70	80
Lys-Asn-Leu-Asp-Lys-Glu-Tyr-Leu-Pro-Ile-Gly-Gly-Leu-Ala-Glu-Phe-Cys-Lys-Ala-Ser-	90	100
Ala-Glu-Leu-Ala-Leu-Gly-Glu-Asn-Asn-Glu-Val-Leu-Lys-Ser-Gly-Arg-Tyr-Val-Thr-Val-	110	120
Gln-Thr-Ile-Ser-Gly-Thr-Gly-Ala-Leu-Arg-Ile-Gly-Ala-Asn-Phe-Leu-Gln-Arg-Phe-Phe-	130	140
Lys-Phe-Ser-Arg-Asp-Val-Phe-Leu-Pro-Lys-Pro-Ser-Trp-Gly-Asn-His-Thr-Pro-Ile-Phe-	150	160
Arg-Asp-Ala-Gly-Met-Gln-Leu-His-Ser-Tyr-Arg-Tyr-Tyr-Asp-Pro-Lys-Thr-Cys-Gly-Phe-	170	180
Asp-Phe-Thr-Gly-Ala-Leu-Glu-Asp-Ile-Ser-Lys-Ile-Pro-Ala-Gln-Ser-Val-Ile-Leu-Leu-	190	200
His-Ala-Cys-Ala-His-Asn-Pro-Thr-Gly-Val-Asp-Pro-Arg-Pro-Glu-Gln-Trp-Lys-Glu-Met-	210	220
Ala-Thr-Leu-Val-Lys-Lys-Asn-Asn-Leu-Phe-Ala-Phe-Phe-Asp-Met-Ala-Tyr-Gln-Gly-Phe-	230	240
Ala-Ser-Gly-Asp-Gly-Asn-Lys-Asp-Ala-Trp-Ala-Val-Arg-His-Phe-Ile-Glu-Gln-Gly-Ile-	250	260
Asn-Val-Cys-Leu-Cys-Gln-Ser-Tyr-Ala-Lys-Asn-Met-Gly-Leu-Tyr-Gly-Glu-Arg-Val-Gly-	270	280
Ala-Phe-Thr-Val-Val-Cys-Lys-Asp-Ala-Glu-Glu-Ala-Lys-Arg-Val-Glu-Ser-Gln-Leu-Lys-	290	300
Ile-Leu-Ile-Arg-Pro-Met-Tyr-Ser-Asn-Pro-Pro-Val-Asn-Gly-Ala-Arg-Ile-Ala-Ser-Thr-	310	320
Ile-Leu-Thr-Ser-Pro-Asp-Leu-Arg-Gln-Gln-Trp-Leu-Gln-Glu-Val-Lys-Gly-Met-Ala-Asp-	330	340
Arg-Ile-Ile-Ser-Met-Arg-Thr-Gln-Leu-Val-Ser-Asn-Leu-Lys-Lys-Glu-Gly-Ser-Ser-His-	350	360
Asn-Trp-Gln-His-Ile-Val-Asp-Gln-Ile-Gly-Met-Phe-Cys-Phe-Thr-Gly-Ile-Lys-Pro-Glu-	370	380
Gln-Val-Glu-Arg-Leu-Thr-Lys-Glu-Phe-Ser-Ile-Tyr-Met-Thr-Lys-Asp-Gly-Arg-Ile-Ser-	390	400
Val-Ala-Gly-Val-Thr-Ser-Gly-Asn-Val-Gly-Tyr-Leu-Ala-His-Ala-Ile-His-Gln-Val-Thr-		
Lys		

られるが, 全体としてほぼ50%の同一配列が存在する。

極性, 非極性残基あるいは酸性, 塩基性残基の分布状態にはs-GOTとの間に大きな差はなく, 両アイソザイムを特徴づけている構造は見出せなかったが, いくつかのアミノ酸含量に著しい差が見られ(リジン, アルギニン, スレオニン, メチオニン, ロイシン), 特に各アイソザイムの酸性残基総数(s-GOT 47, m-GOT 41), 塩基性残基総数(s-GOT 53, m-GOT 58)の差(s-GO

T 6, m-GOT 17)に 両アイソザイムの等電点の大きな違い(生理的条件下でs-GOTはAnionic, m-GOTはCationic)に寄与していると考えられる。

[総括]

ブタ心筋m-GOTの全一次構造の決定を行い, 細胞内で局在部位を異にするアイソザイムであるs-GOTと構造比較を行った結果, 約半数の同一配列があり, 両者が共通の祖先遺伝子から由来するものであることが示唆された。

本研究により、m-GOT が構造決定されたことで、GOT アイソザイムの諸種の性質の差が何に基づくか詳細に研究することが可能となった。

論文の審査結果の要旨

アスパラギン酸アミノ基転移酵素 [L-Aspartate : 2-Oxoglutarate Aminotransferase (EC 2.6.1.1), GOT と略] は、生物界に広く分布し、生理的に重要な役割を演じている。動物細胞においては、細胞内局在性の異なる二種類の GOT アイソザイムがあり、一方は細胞質に (s-GOT と略)、他方は、ミトコンドリアに (m-GOT と略) 局在し、両者は、諸種の性質に著しい差が見られる。

本研究は、これらの差異を蛋白化学的に追求する目的で、ブタ心筋の m-GOT の一次構造の決定を行ったもので、著者は、プロムシアンペプチドの単離精製、構造決定を行い、その配列順序を決定し、全構造の決定を行った。

その結果 Ovchinnikov らが決定したブタ心筋の s-GOT との同一配列は、50%あり、両者が共通の祖先遺伝子から由来するものであることが示唆された。

本研究により、m-GOT の全一次構造が決定されたことは、GOT アイソザイムの諸性質の差をさらに詳しく解明するのに大きな情報を与えるものとして価値があると考えられる。