

Title	ヒト心筋GOTアイソザイムに関する研究：ブタ酵素との構造比較
Author(s)	寺西, 啓容
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32351
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)	寺 西 啓 容
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4487 号
学位授与の日付	昭和54年2月23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	ヒト心筋GOTアイソザイムに関する研究 ——ブタ酵素との構造比較——
論文審査委員	(主査) 教授 山野 俊雄 (副査) 教授 坂本 幸哉 教授 和田 博

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

急性心筋硬塞および肝炎に於いて血清GOT活性が上昇することは周知の事実であるが、GOT (Glutamic Oxaloacetic Transaminase) には細胞上清分画 (s-GOT) とミトコンドリア局在 (m-GOT) のアイソザイムが存在することより、上記疾患時に於ける血中出现GOTのアイソザイムパターンを検索し、病態との関連を見出すことによって血清GOTアイソザイムの臨床診断的意義づけを可能ならしめるものと判断される。故に、簡易かつ正確なヒト血清GOTアイソザイムの分別測定法の開発が窮極的な目的であるが、それには先ずヒトGOTアイソザイムを各々単離し、それぞれの免疫化学的、酵素化学的諸性質に関する明確な知見が要求されるため本研究を行なった。

〔方法および成績〕

- 1) ブタ心筋GOTアイソザイムの精製法に準じて、ヒト心筋よりs-GOTおよびm-GOTをそれぞれ単離し、各アイソザイムの結晶化に成功した。
- 2) ポリアクリルアミドゲルプレートによる電気泳動の結果から、ヒト酵素とブタ酵素の相当するアイソザイム間の易動度の違いは、s-GOTに於いてやや認められたが、m-GOTに於いてはほとんど差は認められなかった。
- 3) 寒天ゲル内沈降反応に於いて両者はまったく交差反応を示さず、免疫化学的に別種のタンパク質と見做される。但し、相当するブタ心筋GOTアイソザイムとはそれぞれ部分共通抗原性を有し、定量沈降反応による沈殿形成量および抗原抗体反応による抗原活性の阻害反応に於いて異種動物間の抗原性の差違が明確に示された。

- 4) 超遠心沈降平衡法により、分子量は共に約95,000で二つのサブユニットからなるものと考えられる。
- 5) 酵素活性は、L-アスパラギン酸と α -ケトグルタル酸から生成するオキサロ酢酸をリンゴ酸脱水素酵素存在下にNADHの340nmにおける吸光度の減少として測定した。本法によって求めた各基質に対する k_m 値は、s-GOTに於いて、1.1mM (アスパラギン酸) および0.1mM (α -ケトグルタル酸) で、一方m-GOTは、0.21mM (アスパラギン酸) および0.67mM (α -ケトグルタル酸) であった。すなわち、s-GOTは α -ケトグルタル酸に、m-GOTはアスパラギン酸に親和性が高い。個々の k_m 値はブタ酵素のそれとはやや異なるが、この傾向はブタ酵素でも認められている。また、両酵素反応ともPing-Pong Bi-Bi mechanism で進行している。
- 6) アミノ酸自動分析機 (日立KLA-5型) を用いて求めたアミノ酸組成より、ヒトアイソザイムとブタアイソザイムとの違いはs-GOTに於いて著明であった。
- 7) アミノ酸Sequence Analyzer 47K (日本電子社製) でN末端アミノ酸配列を20番目迄決定した。ヒト酵素とブタ酵素との違いは、s-GOTに於いて認められず、m-GOTに於いてはN末端より5番目のアミノ酸残基Thr がブタ酵素でAla に置換されているのみであった。
- 8) カルボキシペプチダーゼAおよびBによって遊離するC末端部アミノ酸残基は、Gln (s-GOT) およびLys (m-GOT) で、ブタ酵素に於けるC末端アミノ酸残基と同一であった。
- 9) トリプシン消化によって得られた25個のアミノ酸残基よりなるピリドキサルりん酸結合周辺のペプチドのアミノ酸配列は、エドマン分解法により決定した。ヒトとブタの酵素間に於いてm-GOTはまったく同一のアミノ酸配列を示した。しかしながら、s-GOTに於いては本ペプチドのN末端より9番目のアミノ酸残基に置換が認められ、ヒト酵素のPhe がブタ酵素ではLeu であった。

[総括]

- 1) ヒト心筋よりs-GOT, m-GOTの両者を結晶状に単離した。
- 2) ヒト心筋各アイソザイムは共に分子量が95,000であった。
- 3) ヒト心筋s-GOT, m-GOTの結合ピリドキサルりん酸に由来する可視領域吸収スペクトルは、それぞれブタ心筋s-GOT, m-GOTのそれとほぼ同一であった。
- 4) ヒト心筋, ブタ心筋のs-GOT間の電気泳動度, 免疫化学的反応性およびアミノ酸組成に於いて差異を認めたが、m-GOT間では、これらの性質に於ける差異は、はるかに小さいことが明らかになり、両アイソザイムのうちm-GOTの進化に於いて、より高度のconservatismを示した。
- 5) 補酵素結合部位の25残基ならびにN末端20残基の一次構造は、ヒト, ブタの各アイソザイム間で同一あるいは1残基の置換があるのみで高度のhomologyを示した。
- 6) 以上の結果から、ヒト血清GOTアイソザイムの分別定量にブタ心筋GOTアイソザイムの抗体が有用であることが示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒト血清 GOT アイソザイムすなわちミトコンドリア画分 GOT および細胞可溶性画分 GOT の簡易かつ正確な分別法の開発をおこなうための基礎的研究としてヒト心筋よりの GOT アイソザイムを精製し、その物理化学的、免疫化学的およびタンパク化学的性質を明確にしたものである。特に免疫化学的な比較実験よりヒト血清 GOT アイソザイムの臨床診断用の分別定量として大量供給可能なブタ心筋 GOT アイソザイムの抗体が抗ヒト GOT アイソザイム抗体の代用として用いる実験的根拠を与えた。

本論文は血清 GOT アイソザイムの臨床的意義を検索する新しい臨床検査試薬の開発を容易ならしめる知見を与えるもので有用かつ価値の高いものであることを認める。