



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | ヒト胎盤膜結合性アリルアミダーゼの単離精製とその諸性質                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Author(s)    | 伊藤, 武俊                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Citation     | 大阪大学, 1979, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/32518">https://hdl.handle.net/11094/32518</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"&gt;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">&lt;/a&gt;</a> 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

|             |                                                      |
|-------------|------------------------------------------------------|
| 氏 名・(本籍)    | 伊 藤 武 俊                                              |
| 学 位 の 種 類   | 医 学 博 士                                              |
| 学 位 記 番 号   | 第 4 6 4 5 号                                          |
| 学位授与の日付     | 昭 和 54 年 4 月 27 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 | ヒト胎盤膜結合性アリルアミダーゼの単離精製とその諸性質                          |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査)<br>教 授 山 村 雄 一<br>(副査)<br>教 授 和 田 博 教 授 藤 井 節 郎 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

我々はヒト小腸, 肺, 腎, 肝および胎盤より細胞膜に結合したアリルアミダーゼを部分精製し, それらが耐熱性, 電気泳動度および SDS による阻害態度を異にする臓器固有の膜結合性アリルアミダーゼである事を報告した。

その後腎癌細胞あるいは同患者血清や腹水中に, 胎盤由来の膜結合性アリルアミダーゼによく似た性質を有する新しい型の膜結合性アリルアミダーゼが出現するのを発見した。

ヒト腎, 肝膜結合性アリルアミダーゼは既に単離精製されているが, 胎盤からの単離精製の報告はない。そこで本研究では, 1) まずヒト胎盤から膜結合性アリルアミダーゼを単離精製し, その酵素蛋白としての諸性質を明らかにする。2) 抗胎盤膜結合性アリルアミダーゼ抗体を作製して, 癌細胞および各臓器由来の膜結合性アリルアミダーゼとの間の免疫学的検討を行う事を目的とした。

#### 〔方法ならびに成績〕

##### 1) ヒト胎盤膜結合性アリルアミダーゼの精製

ヒト胎盤組織より Wachsmuth 等の方法で膜分画を得た。

膜分画に  $50\mu\text{g}/\text{mg}$  蛋白相当のトリプシンを加え, 室温で 3 時間反応させ本酵素を膜より遊離させた。

続いて DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー ( $0 \rightarrow 0.3^M$  食塩直線濃度勾配法), コンカナヴァリン・A カラムクロマトグラフィー ( $0.1^M$  マンノースによる活性部分の溶出), ハイドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィー ( $1 \rightarrow 200^mM$  リン酸緩衝液 PH 7.0, 直線濃度勾配法), 最後にセファデックス

クス・G200ゲル濾過法にて精製した。

本法により本酵素は約 500倍に精製され、最終回収率は22%であった。比活性は $60\mu\text{mole}/\text{mg}/\text{min}$ で、1 kgのヒト胎盤組織より約3.4mgの本酵素が得られた。

精製した本酵素はポリアクリルアミドゲル電気泳動およびSDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動で一本のバンド、超遠沈法で対称型の一本のピーク、免疫電気泳動で一本の沈降線を示したことから、均一な酵素蛋白である事が証明できた。

## 2) 酵素蛋白としての諸性質

本酵素の分子量はセファデックスG-200ゲル濾過法および超遠沈法でそれぞれ240000および193000であった。SDSポリアクリルアミド電気泳動法によると125000となり、本酵素が同一2量体である事が判明した。

超遠沈法で得られた沈降恒数は9.5s, 等電点は4℃でPH:4.2であった。

本酵素はグルタミン酸、アスパラギン酸、ロイシンを比較的多く含み、システイン、メチオニンをほとんど含まない糖蛋白で、オルシノール法による糖含量は18.2%であった。

本酵素は熱には比較的安定であったが、70℃、20分では完全に失活し、凍結によっても速やかに失活した。またPH5.5から9.5の間では比較的安定であったが、PH3.0では37℃、30分で完全に失活した。

本酵素の至適PHは7.25であった。また本酵素は $1^{\text{mM}}$ のコバルトイオンの存在により、約160%の活性上昇が認められた。

Lineweaver-Burk法により求めたミカエリス定数は $8.7 \times 10^{-5}\text{M}$ 、最大反応速度はコバルトイオンの非存在下では $71\mu\text{mole}/\text{mg}/\text{min}$ 、存在下では $136\mu\text{mole}/\text{mg}/\text{min}$ であった。

本酵素は $2.5^{\text{mM}}$ のチロシン、 $5^{\text{mM}}$ のフェニルアラニン、メチオニンで80%以上の阻害が認められた。また蛋白分解酵素阻害剤である8-ハイドロキシキノリン、2-3-ジメルカプトプロパノールにより著明な阻害を受けたが、N-エチルマレイマイド、ナトリウムテトラチオネイトには阻害効果なく、EDTAではその中間の影響が認められた。

## 3) 免疫学的検討

本酵素でウサギを免疫し、抗・胎盤膜結合性アリルアミダーゼ抗体を作製した。本抗体と腎癌細胞および各臓器由来の膜結合性アリルアミダーゼとの間で、中和抗体価の検討と、免疫二重拡散を行った。

本抗体は前記のいずれの膜結合性アリルアミダーゼをも同じ程度に中和し、免疫二重拡散法にても沈降線の完全な融合が認められた。

## 〔総括〕

ヒト胎盤より膜結合性アリルアミダーゼを単離精製し、その生化学的、酵素学的諸性質を検討した。その結果、本酵素はBehal等がヒト肝および腎より精製した膜結合性アリルアミダーゼとよく似た性質を有する事を認めた。

ウサギに本酵素に対する抗体を作製し、腎癌細胞、小腸、肺、腎、肝および胎盤由来の膜結合性アリルアミダーゼとの間の免疫学的検討を行った。その結果、上記各臓器個有の膜結合性アリルアミダーゼは抗原決定基に関しては同じである事を明らかにした。

### 論文の審査結果の要旨

本論文では、ヒト胎盤より初めて膜結合性アリルアミダーゼを単離精製し、その酵素蛋白としての生化学的・免疫学的諸性質を明らかにした。さらに本酵素に対する抗体を作製し、腎、肝、肺、小腸胎盤および腎癌細胞より精製した膜結合性アリルアミダーゼとの間の免疫学的検討を行って、抗原性は同じである事を証明した。