

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	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32518
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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)	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) 教授 山村 雄一 (副査) 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→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→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^{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^{mM} のチロシン、 5^{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-ヒドロキシキノリン、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シルアミダーゼとの間の免疫学的検討を行った。その結果、上記各臓器固有の膜結合性アシ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シ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シ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。