

Title	アデニロコハク酸合成酵素の分子多様性に関する研究 (精製, 特徴及び変換機構)
Author(s)	松田, 義宏
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32720
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 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)	松 田 義 宏
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 5 1 9 2 号
学位授与の日付	昭 和 56 年 3 月 25 日
学位授与の要件	理学研究科 生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	アデニロコハク酸合成酵素の分子多様性に関する研究 (精製, 特徴及び変換機構)
論文審査委員	(主査) 教授 中川 八郎 (副査) 教授 藤井 節郎 教授 堀尾 武一

論 文 内 容 の 要 旨

Adenylosuccinate synthetase (AdSS)は、アデニンヌクレオチド生合成経路上の律速酵素の一つであると同時に、プリンヌクレオチドサイクルの構成酵素としてアンモニア産生や解糖の調節に対しても重要な役割を果たしていると考えられる。我々は、これまでに、ラットの本酵素には、L (肝)型とM (筋肉)型の2種のアイソザイムが存在することを示し、かつ、それらの活性制御に関する性質の相違から、L型酵素が核酸合成に寄与し、M型酵素はプリンヌクレオチドサイクルの構成酵素として機能するという機能分担を示唆する実験成績を得てきた。

M型酵素については、当研究室の小川らによって、ラット骨格筋より精製・結晶化がすでになされているので、本研究において、吉田肉腫腹水ガン細胞よりL型酵素を精製し、これら2種のアイソザイムを比較し、調節機構の特徴を含む両者の性質の異同性を明らかにした。また、L型酵素の精製過程で、本酵素がある種の因子の作用を受けて、等電点の異なる3種の分子形態を取り得ることを見出したので、その変換機構についても検討し、興味ある知見を得た。

ラット腹腔内で増殖させた吉田肉腫腹水ガン細胞を超音波破碎し、その可溶性画分から、硫酸分画とDE-52及びUltrogel AcA34のカラムクロマトグラフィー、更に、AdSSの特異的阻害剤として働く抗生物質の一種であるHadacidinをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーを用いてL型酵素をゲル電気泳動的に均一な標品として得た。本酵素の分子量は102,000で、分子量47,000の等価なサブユニットから成ることが沈降平衡法より推定された。等電点は5.9。活性の至適pHは6.8~7.0。活性発現には、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 等の2価金属を要求する。IMP、アスパラギン酸、GTPに対する K_m 値はそれぞれ、0.41mM、0.98mM、0.07mMであった。また、本酵素は、AMP、

GMP等のヌクレオチドによりフィードバック阻害を受ける。解糖中間体のFDPや抗生物質のHadacidinでも強く活性が抑えられる。更に、 Hg^{2+} やPCMBによってSH基が修飾を受けると活性を失なう。

一方、本酵素は、細胞粗抽出液中においては、精製標品と異なった性質を示すことを明らかにした。すなわち、等電点が5.0であり、IMP、アスパラギン酸、GTPに対する K_m 値は、それぞれ0.10 mM, 0.87 mM, 0.03 mMで、精製酵素よりも基質に対する親和性が高い。

L型 AdSSの精製過程における等電点変換はDE-52カラムクロマトグラフィーの段階で起こるが、これは、酵素分子から等電点変換因子(ICF)が分離されるためであることも明らかにした。更に、この因子の再添加によってAdSSは容易に元の等電点(5.0)を示すようになることから、この等電点の変化はICFの作用の有無に依存して生じる可逆的な現象であることを示した。

ICFの諸性質を精製 AdSS に対する等電点変換活性を指標として検討した結果、ICFは透析を受けず、また、熱処理(100℃, 30分)に安定であった。1 N KOH存在下の加温(37℃, 20時間)にはほとんど影響を受けなかったが、1 N 過塩素酸の添加により、一部分、可逆的な変性・沈澱を示した。プロテアーゼやRNaseは有意な効果を及ぼさなかった。しかし、DNaseが明らかな活性減少をひき起こした。これらの知見は、ICFがDNA様の性質をもつことを示している。高速液体クロマトグラフィーを利用したゲル濾過によってICFの分子量を調べたところ、分子量6~8万の画分の他、広い範囲にその活性が認められ、ICF分子が均一な大きさのものではないことが示唆された。

ICF活性は、細胞質画分のみでなく、核画分にも見出され、やはりDNAに類似の性質を示した。市販の仔牛胸腺DNAも同様の等電点変換活性を示したが、ICFに比べると1~2桁高いDNA濃度を必要とした。この知見は、ICF分子に何らかの特異性があることを示唆する。正常組織のL型 AdSSにも同様の分子多様性が観察された。以上の知見を踏まえて、これらの相互変換を本酵素の活性制御との関係について考察を加えた。

論文の審査結果の要旨

分子多様性を示す酵素タンパク質は多いが、それら相互間の構造的関係、それぞれの機能分担、活性制御機構に関する知見は乏しい。

本研究はプリンヌクレオチド合成経路上の一つの律速酵素であると同時に、プリンヌクレオチドサイクルの一員として解糖、アンモニア産生とかかわりをもつアデニロコハク酸合成酵素に大別してL型(肝型)とM型(筋肉型)の二種のアイソザイムが存在することを証明し、それぞれについても以下のような実験成績を提出した。すなわち、先ず吉田肉腫細胞から当該酵素の均一化精製に成功した。その精製酵素はラット肝のL型と同種の酵素(pI 5.9, L_3 型と呼ぶ)であるが、粗抽出液中ではある種の因子と結合して、等電点の異なる分子種(pI 5.0, L_1 型)として存在することを明かにするとともに、その因子がDNA様物質であることも証明した。更に、M, L_1 , L_3 の3種について酵素化

学的諸性質を詳細に調べ、M型がアンモニア産生、解糖の調節に関与し、L型はプリンヌクレオチド合成の調節に関与することを示唆する実験成績を提出した。また、L₁とL₃の相互変換は上記因子の存在下に可逆的に変換するが、L₃はL₁と比較するとAMPによるフィードバック阻害を受けにくいことを証明し、細胞増殖に有利であることを示唆した。

以上の如く、アデニロコハク酸合成酵素の分子多様性の存在意義に関するこの研究報告はこの領域の研究の発展に寄与するとともに、癌細胞の増殖機構の解析に手がかりを与えるものであって、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認められる。