

Title	ラット肝可溶性画分Acetyl-CoA hydrolaseの分子構造に及ぼす低温およびヌクレオチドの影響
Author(s)	中西, 洋子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33082
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	なか 中	にし 西	よう 洋	こ 子
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	5404	号	
学位授与の日付	昭和56年8月1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	ラット肝可溶性画分 Acetyl-CoA hydrolase の分子構造に 及ぼす低温およびヌクレオチドの影響			
論文審査委員	(主査) 教授 坂本 幸哉			
	(副査) 教授 萩原 文二 教授 山野 俊雄			

論文内容の要旨

[目的]

IsohashiとUtterはATPで活性化されるAcetyl-CoA hydrolase活性をラット肝可溶性画分に見出した。本酵素は非常に高活性を示すにもかかわらず今まで発見を免れていたのは、本酵素は丸ごとの肝臓や粗抽出液のレベルでも、低温下で急速に失活するCold labile enzymeであったために、等張緩衝液で低温下で操作する通常の処理法では活性が認められなかったと考えられる。このような特殊な酵素であるのでPrass等^{1,2}は常温、ATP存在下で精製し、分子量、 k_m 値、基質特異性等について報告した〔R. L. Prass, F. Isohashi, and M. F. Utter: Fed. Proc., 36, 761, (1977)¹, J. B. C., 255, 5215, (1980)²〕。

この酵素はATP, ADPの添加により活性が大きく調節されているので、私は本酵素分子に対するNucleotideの影響に興味を持ち、ATPを使用しない精製法を新しく開発し、単一化に成功した。この精製酵素標品について、本酵素の二大特性であるNucleotide、低温の影響を分子レベルで解析した。
[方法ならびに成績]

I. ラット肝可溶性画分Acetyl-CoA hydrolaseの精製

絶食ラット肝より可溶性画分(105,000×g, 30分間)を調整し、さらにHydroxylapatite処理、硫酸画分、熱処理、DEAE-Sephadexカラムクロマトグラフィー、CM-Sephadexカラムクロマトグラフィーの5つの操作を行ない、電気泳動的に単一にまで精製した。本法により、350gのラット肝から372 μ mol/分/mg蛋白(蛋白測定はFolin法、活性測定温度は25℃)の比活性を持つ酵素1.69mgを得た。収率は約13%であった。

II. 精製酵素標品の分子量

SDS-Polyacrylamide gel電気泳動でサブユニット分子量を求めると63,000であった。またゲル濾過により分子量を求めると135,000となり、先き程のサブユニット分子量から推定すると本精製酵素標品は二量体で存在することが考えられる。この値は既報²のATP含有精製酵素(240,000, 四量体)の $\frac{1}{2}$ であった。そこでATPを添加して本二量体酵素を四量体酵素に再構成することを試みた。

III. Nucleotideの酵素分子量に及ぼす影響

ATPを添加して濃縮透析を行いゲル濾過(ATP添加緩衝液で平衡化)法で分子量を検定すると242,000となり、本酵素は四量体に会合した。同様の操作をADP存在下で行なうと230,000となり、やはり四量体化した。しかしAMP存在下では分子量145,000の二量体のままであった。ATP処理前の二量体酵素のAcetyl-CoAに対する K_m 値(140 μ M)はATP処理四量体化により60 μ Mと低下した。しかし酵素蛋白当りの両者の活性には差異は認められなかった。

IV. 精製酵素の低温失活性

本精製二量体酵素(4mg/ml)を1mg/mlのBSAを含む緩衝液で300倍に稀釈して0~37 $^{\circ}$ Cの各温度でincubateすると、温度の低下と共に失活が促進された。10 $^{\circ}$ C, 8 $^{\circ}$ C, 5 $^{\circ}$ C, 0 $^{\circ}$ Cの $t_{1/2}$ はそれぞれ40分, 9分, 3.4分, 3.0分であった。

V. 低温下酵素分子の会合状態

蔗糖密度勾配遠心法で低温下の酵素分子の会合状態を解析すると、4 $^{\circ}$ Cでは酵素蛋白ピークはBSA(MW.67,000)沈降位置近辺に見られ、活性は消失していた。この結果より、本酵素は低温下では単量体に解離して存在し、この解離が低温失活の一原因であると考えられる。

VI. 各種Nucleotideの低温失活に及ぼす影響

各種Nucleotide(2mM)を含んだ緩衝液で酵素(4mg/ml)を300倍に稀釈して8 $^{\circ}$ C, 又は0 $^{\circ}$ Cで10分間および30分間incubateし、残存活性を測定した。

ATP>ITP, UTP>ADP>GTP, CTP, TTP>AMPの順にある程度、低温失活に対する保護能力を示すことがわかった。

VII. ATP処理四量体酵素の低温下会合状態

蔗糖密度勾配遠心により4 $^{\circ}$ C, ATP存在下の本酵素分子の会合状態を解析すると、20時間後にはほとんど単量体に移行し活性が消失していた。VIの結果とあわせて判断すると、ATPの低温失活減弱能力は短時間低温処理では認められるが、長時間では単量体化、失活し、四量体がどのような経過をたどって単量体になるか、今回判定出来なかった。

[総括]

- 1) ラット肝可溶性画分に存在するAcetyl-CoA hydrolaseを新しく開発した方法で精製し、電気泳動的にほぼ単一にした。
- 2) 本精製標品は一種類のサブユニットより構成され、サブユニット分子量は63,000, ゲル濾過より求めた分子量は135,000であり、二量体として存在した。

- 3) 本二量体酵素はATP, ADPにより四量体に会合したが, AMPでは二量体のままであった。
- 4) 酵素蛋白当り, サブユニット当りの活性は二量体酵素とATP処理四量体酵素間に差が認められなかったが, Acetyl-CoAに対する k_m 値はATP処理四量体酵素で約 $\frac{1}{2}$ に低下した。
- 5) 精製酵素の低温失活速度は温度依存性で温度が低い程失活が促進された。
- 6) 低温下で本酵素は解離して単量体として存在した。これが低温失活の一原因と考えられる。
- 7) 各種Nucleotideは本酵素の低温失活をある程度減弱させた。特にATPの減弱効果は他のNucleotideに比し強力であった。
- 8) 長時間(20時間)の低温処理に対しては, ATPの減弱効果が認められず, 単量体化, 失活した。

論文の審査結果の要旨

ラット肝可溶性画分Acetyl-CoA hydrolaseは低温下で失活し, ATPで活性化され, ADPで阻害されることが知られている。そこで本論文はこの酵素の二大特性である低温及びヌクレオチドの影響下での分子の解離会合状態について検討した。まずこの酵素の新しい独自の精製法を開発し, 単一化に成功している。この方法で得た精製酵素はATP存在下で得た酵素(四量体)とは異なり二量体として存在することを明らかにした。この二量体酵素にATP, ADPを添加し, 濃縮透析することにより酵素は四量体化する。ATPによる四量体化は基質に対する親和性上昇を伴うことを明らかにした。一方精製二量体酵素及びATP再構成四量体酵素を低温条件下に置くと単量体に解離し, 活性が消失する現象を認め, この単量体化が低温下における本酵素失活の原因であることを明らかにした。さらにATP等のヌクレオチドはこの二量体酵素の低温失活減弱効果を有することも報告している。この論文は酵素の分子構造学的研究のみならず生理作用解明やこのような極度の低温失活現象を伴う未知の酵素の発見に大きく貢献することが期待出来, 独創的な研究として高く評価される。