

Title	ラット肝のIMP dehydrogenaseの精製とその調節的性質
Author(s)	志村, 研太郎
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33775
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)	し 志	むら 村	けん 研	た 太	ろう 郎
学位の種類	医	学	博	士	
学位記番号	第	6279	号		
学位授与の日付	昭和59年	1月	9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	ラット肝のIMP dehydrogenase の精製とその調節的性質				
論文審査委員	(主査)				
	教授	中川	八郎		
	(副査)				
	教授	田川	邦夫	教授	藤井 節郎

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

Inosine monophosphate (IMP) dehydrogenase は、プリンヌクレオチド代謝の分岐点の酵素であり、グアニンヌクレオチド合成を律速する重要な位置をしめる。また、本酵素は、再生肝、悪性腫瘍などの増殖の旺盛な組織において高い活性を示す事から、細胞増殖における代謝調節上の意義が注目されている。

従来より、多くの研究者によって多くの材料について、本酵素の精製が試みられてきたが、現在に至るまで高度の精製には成功していない。この原因は、粗酵素抽出液に存在する xanthine oxidase を始めとする酵素群が活性測定を障害することと、本酵素が可溶性画分に存在するにもかかわらず複合体を形成し、沈降する性質を有する点にある。

本研究は、これらの難点を解決し、正確な活性測定法を確立するとともに、本酵素のラット肝からの高度精製を試み、さらに、その調節的性質を明らかにすることを目的としておこなわれた。

(方法ならびに結果)

ラット肝を試料とし、IMP dehydrogenase の活性測定法を検討した。従来の測定法では粗抽出液に含まれる 5' nucleotidase, purine nucleotide phosphorylase および xanthine oxidase によって IMP を基質として大量の尿酸が生成されることを高速液体クロマトグラフィーによって明らかとし、このことにより分光光学的な方法あるいは radioisotope 法によっても粗抽出液では正確な活性測定が不可能と判断された。そこで xanthine oxidase の特異的阻害剤である allopurinol を反応系に添加することにより、尿酸生成を完全に抑制することを可能とし、正常肝の如き低い活性の測定には allopuri-

nol を添加した radioisotope 法が適当であると結論された。

細胞分画法による検討から IMP dehydrogenase は可溶性画分に分布することが確認されたが、同時に長時間の超遠心により沈降する性質を有することを明らかとした。しかもこの沈降性は、吉田肉腫腹水細胞由来の本酵素（正常肝の約65倍の比活性を有す）により顕著であり、再生肝では部分肝切除後48-72時間に上昇する活性の大部分が沈澱画分に存在することを明らかにした。これらの事実より、本酵素の複合体形成が、増殖細胞における代謝調節の上で何らかの意義を有するものと解釈された。

そこでこの複合体形成の機構を解析すべく、沈澱画分活性の各種化合物による可溶化を試みたところ、尿素、KSCN, dimethyl sulfoxide, glycerol などの疎水性結合を低下せしめる化合物と、KCl, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ が有効であったことから、この複合体の形成にはイオン結合と疎水性結合が関与していることが示唆された。また、しよ糖密度勾配遠心法による検討から1M KCl, 0.8 M guanidine-HCl が $S_{20, w}$ を低下せしめる効果を有することが明らかとなったが、各々の抽出物の S 値の不一致からも、この複合体の形成が2種の結合様式により成立していることが示唆され、今後結合対の同定が、本酵素の調節機構を解明するための重要な課題と考えられた。

以上の如き、本酵素の蛋白化学的な特異性を考慮して、ラット肝からの精製純化を試みた。すなわち、粗抽出液より硫酸分画、りん酸カルシウムゲルセルロース、ウルトラゲルACA34、ブルーセファロースCL6B、DE52セルロース、セファロースCL6Bの各カラムクロマトグラフィーを行ない、約4,500倍にまで精製することに成功した。電気泳動的に単一バンドにまで純化し得なかったが、従来報告（25-174倍）に比較して極めて高度に精製されたものと結論できる。

なお、ラット肝の精製酵素の諸性質は、吉田肉腫腹水細胞由来のそれと極めて類似していた。

(総括)

1. xanthine oxidase の特異的阻害剤である allopurinol の添加により、肝組織粗抽出液についても radioisotope 法を用いて IMP dehydrogenase 活性を正確に測定する反応系を確立した。
2. IMP dehydrogenase は、長時間の超遠心によって沈降する性格を有するが、あくまでも可溶性画分に含まれる酵素であり、沈降性は主としてイオン結合、疎水性結合による高分子複合体の形成による事を明らかにした。
3. 上記の複合体の形成は、悪性腫瘍、再生肝といった増殖細胞に、より著明であり、本酵素の代謝調節との何らかの関連が示唆された。
4. ラット肝より6段階の過程によって、約4,500倍までの精製に成功し、その諸性質が吉田肉腫腹水細胞由来のそれと極めて近似していることを明らかとした。

論文の審査結果の要旨

本研究は、従来酵素学的諸性質の明らかでなかった IMP dehydrogenase について、種々の干渉酵素の存在する粗抽出液にも適用可能な新しい活性測定法を確立して本酵素の調節機構の解析に使用し、

本酵素が細胞質構成成分と高分子複合体を形成して沈降しやすいこと、その沈降性が細胞増殖ときわめて密接な関係にある事を明らかにした。

以上の知見をもとに本酵素の精製をはばんできた沈降性を防止する方策を構じ、4,500倍という従来にない純度にまで精製することに成功した。

これらの研究成果はRNA、DNA合成の構成成分としてのみならず、ホルモン受容体の調節上きわめて重要な作用をもつGTPの主合成経路の調節機構解明への道を拓くものであり、学位論文としても十分価値あるものと認める。