

Title	ニワトリ肝臓のミトコンドリアおよび可溶性分画中のアルデヒド還元酵素に関する研究
Author(s)	河野, 武幸
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33863
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 2 】

氏名・(本籍)	河 野 武 幸
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 6 4 3 3 号
学位授与の日付	昭 和 59 年 3 月 24 日
学位授与の要件	薬学研究科 応用薬学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ニワトリ肝臓のミトコンドリアおよび可溶性分画中のアルデヒド還元酵素に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 近 藤 雅 臣 (副査) 教 授 鎌 田 皎 教 授 岩 田 平 太 郎 教 授 青 沼 繁

論 文 内 容 の 要 旨

アルデヒド還元酵素 (EC 1. 1. 1. 2, 以下 AL.R. と略す) は, 薬物などの異物カルボニル化合物や代謝過程より生じた生体内カルボニル化合物の代謝に関与する酵素である。細胞内において, AL.R. の大部分は可溶性分画に分布していることは既に知られているが, AL.R. はモノアミン代謝にも関与していると言われ, ミトコンドリアにも AL.R. が分布しているか否かについては重要な課題であった。そこで, 著者らはニワトリ肝臓を用いて AL.R. の細胞内局在性を検討した。その結果, AL.R. が可溶性分画のみならずミトコンドリアにも分布することを初めて明らかにすることができた。さらに, このミトコンドリアの AL.R. を精製すると共に可溶性分画の AL.R. の精製をも試み, それらの諸性質を調べることにより相互間の異同について検討を加えた。

先ず, 分画遠心法を用いて AL.R. の細胞内局在性を検討した。AL.R. 活性の大部分 (81%) は可溶性分画に回収されたが, 約11%の活性が粗ミトコンドリア分画にも検出された。しかしながら, この粗ミトコンドリア分画には可溶性分画のマーカー酵素である乳酸脱水素酵素の活性が約5%検出されたことから, 可溶性分画の AL.R. が粗ミトコンドリアに吸着していることが考えられた。そこで, 粗ミトコンドリアを各種カチオンにて洗浄し, 静電的結合を介して粗ミトコンドリアに結合している可溶性分画の酵素を脱着させた。その結果, 乳酸脱水素酵素は脱着したが, 目的の AL.R. はほとんど脱着せず, このことから粗ミトコンドリアに固有の AL.R. の存在が示された。次に, ショ糖密度勾配遠心法にて粗ミトコンドリアをリゾーム, ミトコンドリアおよびパーオキシゾームに分別した。約75%の AL.R. の活性はミトコンドリアに回収され, 粗ミトコンドリア分画の AL.R. は主としてミトコンドリアに分布していることが示唆された。

さらに、AL.R.のミトコンドリア内局在性を検討したところ、AL.R.はジギトニンのような比較的弱い界面活性剤による処理や低張下リン酸ナトリウムによって誘起されるミトコンドリアの膨潤化によっても膜から遊離し得るような結合を介して膜と結合していることが示された。

次に、ミトコンドリア分画のAL.R.の実態を明確にし、かつミトコンドリアに特徴的なAL.R.であるか否かを調べる目的で、まずミトコンドリア分画からAL.R.の精製を試みた。各種クロマトグラフィーを用いて精製を進めたところ、クロマトグラフィー上で分離できる2種類のAL.R.（ミトコンドリアアルデヒド還元酵素IおよびII、以下M.AL.R. IおよびIIと略す）が得られ、それらは出発材料であるミトコンドリアからそれぞれ1,600倍および1,100倍に精製された。両酵素の諸性質を調べたところ、M.AL.R. IおよびIIは、それぞれ一般的に可溶性分画に認められるHigh-Km AL.R.およびLow-Km AL.R.と類似した酵素であることが示唆され、両酵素間には次のような差が認められた。すなわち、M.AL.R. Iは基質に対するKm値が高く、芳香族アルデヒドや糖アルデヒド（三炭糖や四炭糖）のみならずグルクロン酸やコハク酸セミアルデヒドをも良い基質とし、バルプロン酸によって阻害されるAL.R.であり、分子量は29,000、等電点は7.0であった。M.AL.R. IIは基質に対するKm値が低く、M.AL.R. Iとは異なりグルクロン酸やコハク酸セミアルデヒドは基質とせず、バルプロン酸によっても阻害されないAL.R.であり、分子量は31,000、等電点は7.7であった。しかしながら、免疫学的性質には差は認められず、二重拡散法にて検討した結果、両酵素とも主としてニワトリ腎臓可溶性分画のLow-Km AL.R.に対するIgGと沈降線を形成し、わずかにHigh-Km AL.R.に対するIgGとも反応した。このことから、両酵素は同一タンパク質より構成されている可能性が示された。

さらに、ミトコンドリア分画のAL.R.との異同を検討する目的で可溶性分画のAL.R.の精製を試みた。その結果、可溶性分画にはクロマトグラフィー上で分離できる6種類のAL.R.（F₁-1、F₁-2、F₂-1、F₂-2、F₃およびF₄）が含まれていた。まず、それらの諸性質を調べ可溶性分画のAL.R.間の異同を検討した。4種類のAL.R.（F₁-1、F₁-2、F₂-1およびF₂-2）はLow-Km AL.R.に分類され、それらはKm値の差よりF₁-1およびF₂-1、F₁-2およびF₂-2の2群に分類された。また、F₃およびF₄はHigh-Km AL.R.に分類された。6種類のAL.R.の分子量はおおむね30,000であり、4種類のLow-Km AL.R.はニワトリ腎臓可溶性分画のLow-Km AL.R.に対するIgGとのみ沈降線を形成し、2種類のHigh-Km AL.R.は、High-Km AL.R.に対するIgGとのみ反応した。F₁-1およびF₂-1の等電点には差は認められなかったが、F₁-2およびF₂-2の等電点はそれぞれ7.1および8.0でありこの両者の間には差が認められた。また、F₄の等電点は測定できなかったためF₃との差は明らかではないが、少なくとも、イオン交換クロマトグラフィー上での挙動が有意に異なっていたことから両酵素の電気的性質には差があるものと思われた。以上のことから、F₁-1およびF₂-1は同一酵素である可能性が高く、F₁-2およびF₂-2、F₃およびF₄は、それぞれに電気的性質は異なっているが、同一もしくは極めて近似したタンパク質より構成されている酵素であると思われた。

最後に、以上のような結果を踏まえ、ミトコンドリアと可溶性分画のAL.R.の異同について考察した。M.AL.R. Iの酵素化学的性質はF₃およびF₄と、また、M.AL.R. IIはF₁-2およびF₂-2と類似していた。等電点の比較からM.AL.R. IIはF₁-2とは異なることが示されたが、他のAL.R.の間には顕著な

差は認められず、分子量もおおむね近似していた。しかしながら、免疫学的性質には有意な差が認められた。すなわち、F₃およびF₄はHigh-Km AL.R.に対するIgGとのみ、F₁₋₂およびF₂₋₂はLow-Km AL.R.に対するIgGとのみ沈降線を形成したのに対し、M.AL.R. IおよびIIは両IgGと反応した。

論文の審査結果の要旨

ニワトリ肝臓中に可溶性分画のみならずミトコンドリア分画にもアルデヒド還元酵素が存在することを明らかにし、しかもミトコンドリア膜に結合した状態で2種類の酵素が存在することを証明した。また、この結合酵素と可溶性分画に存在する酵素とは物理化学的、免疫化学的に異なるものであることを明らかにした。これらの成果はアルデヒド還元酵素研究に新たな進展をもたらすもので薬学博士を授与するに値するものと判定した。