

Title	B型ヌクレオシドジフォスターゼに関する研究
Author(s)	佐野, 慎一郎
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/35963
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

【2】

氏名・(本籍)	佐野慎一郎
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 7863 号
学位授与の日付	昭和62年9月30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	B型ヌクレオシドジフォスファターゼに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 中川 八郎 (副査) 教授 堀尾 武一 教授 田川 邦夫

論文内容の要旨

ヌクレオシドジフォスファターゼ (NDPase) は, GDP, IDP, UDPなどの末端のリン酸の解離を触媒する酵素である。肝臓では, NDPaseは主に小胞体 (ER) に存在し, アルカリ性条件下にはチアミンピロフォスファターゼ (TPPase) 活性をも示すと報告されている。しかし, 活性染色法を用いた組織化学によって, TPPase活性は一般にゴルジ装置に局在することが示されている。また, 脳では, TPPase活性は神経細胞に高く, NDPase活性はグリア細胞に高いことが報告されている。そこで, 私は, ラット脳についてNDPaseとTPPaseが同一の酵素か否かを検討し, 2種のNDPaseの存在を見出した。すなわち, 一方 (L型NDPase) は, 肝ミクロゾームのNDPaseと類似の性質を示し, 他方 (B型NDPase) は, 中性で強いTPPase活性を示した。ことに後者は主として神経細胞に存在すると考えられたので, 本研究では, B型NDPaseの性質, 細胞内分布を明らかにし, その生理的役割の考察を試みた。

B型NDPaseをラット脳の膜画分から0.25% Triton X-100で可溶化し, DE-52, Con A-Sepharose, Bio-Gel HT, Blue-Sepharose CL-6B, Chelating Sepharose 6B, Ultrogel AcA44およびTSK gel G3000SWのカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。精製酵素は, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において一本のバンドを示し, 分子量は, 75Kであった。本酵素は, NDPの他にチアミンピロリン酸 (TPP) を基質とし, Mn^{2+} 存在下においてTPPに対してNDPに対する活性の約2倍の活性を示した。Km値は, TPP, GDP, IDP, UDPに対して, それぞれ, 0.66, 0.40, 0.54, 1.06mMであった。本酵素は, 肝ミクロゾームNDPaseを活性化するATP, ピリドキサル5'-リン酸 (PLP) によって拮抗阻害を受けた。ATP, ADP, PLPのKi値は, それぞれ, 2.3, 1.0,

0.59mMであった。また、TPase活性の至適pHは、 Mn^{2+} 存在下において7.4であった。

次に、ラット脳におけるB型酵素の細胞内分布と生後経時変化をゴルジ装置の指標酵素であるガラクトシルトランスフェラーゼと比較しながら検討した。ショ糖密度勾配遠心分画法により、B型酵素はガラクトシルトランスフェラーゼと同一の画分に活性極大を示した。また、B型NDaseとガラクトシルトランスフェラーゼは、生後5-9日間に最大活性を示し、それぞれ8週令の2.4倍および3.9倍であった。これらの結果は、B型NDaseがラット脳のゴルジ装置において糖鎖合成に関与する可能性を示唆している。

ついで、肝ゴルジ装置のTPaseと脳のB型NDaseとの異同性を明らかにするために、ラット肝よりゴルジ装置を調製し、等電点電気泳動法によって酵素を分離し、同ゲル上の活性染色によりその性質を分析した。その結果、pI 4.6のミクロソームのNDase以外に、TPaseに対して強い活性を持つ6本のバンドがpI 5.4-6.3の間に見出された。ゲル上において、それぞれのバンドの基質特異性を調べたところ、いずれもTPase、GDP、IDP、UDP、CDPに対して強い活性を示した。これらの諸性質から、肝ゴルジ装置のTPaseは脳のB型NDaseと極めて類似することが明らかになった。しかし、肝ゴルジ装置のTPaseには脳B型NDaseの示す9本のバンドの内、アルカリ側等電点の3本のバンドが欠失していた。一方、DE-52カラムクロマトグラフィーによりゴルジ装置のNDaseを分離し、基質特異性、活性の至適pH、ATPによる阻害などについて検討したところ、脳B型NDaseと同様の性質を示した。これらの事実は、両酵素が、糖鎖構造などの修飾は異なるが、同一の酵素である可能性を示唆する。

以上の結果より、B型NDaseは、ゴルジ装置において糖転移酵素の生成したその阻害物質であるNDPを分解し、糖ヌクレオチドとの逆向輸送系を介してゴルジ装置の外側へ輸送されるヌクレオシドリン酸(NMP)を生成させることにより、糖鎖合成を促進する生理的役割を持つと推定した。

論文の審査結果の要旨

チアミノピロフォスファターゼ(TPase)はチアミノピロリン酸の神経作用に関与する可能性が高い。また、同酵素は肝では、ゴルジ装置の指標酵素として利用されてきた。しかし、ヌクレオシドジフォスファターゼ(NDase)との関係が示唆されながら異同性に関する明らかな証拠は提出されていない。

本論文は、ラット脳に2種のNDaseが存在することを見出したが、当初はそのうちの1種が脳に特有であると考えたためB型と命名し、他種は肝の酵素と類似性をもつためL型と命名した。両者共不安定であったが精製に成功し、B型はTPaseと同一であり、ATPによって阻害を受けるのに対し、L型はアルカリ側で僅かにTPase活性を示すに過ぎず、また、ATPによって活性化されるなど両者の酵素的性質が全く異なることを明らかにした。

更に、肝のゴルジ装置のNDaseはB型、ミクロソームのNDaseはL型であることを明らかにし、

従来のミクロソームのNDPaseがTPPaseであるとする説を完全に否定した。

更に、ラット脳のB型酵素（TPPase）とゴルジ装置の指標酵素であるガラクトシルトランフェラーゼの細胞分布と生後の経時的活性変化とを比較し、その平行性から本酵素が糖鎖合成に関与する可能性を示した。

以上の研究は糖鎖合成の調節機構のみならずチアミピロリン酸の神経作用解明への道を拓くものであり、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。