

Title	Application of Goldsolreaction to Enzymological Studies
Author(s)	額田, 忠篤
Citation	大阪大学, 1963, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46128">https://hdl.handle.net/11094/46128</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【 27 】

氏名・(本籍)	額 田 忠 篤 ぬか だ ただ あつ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 368 号
学位授与の日付	昭 和 38 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 生 理 系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Application of Goldsolreaction to Enzymological Studies
論文審査委員	(主 査) (副 査) 教 授 今 泉 礼 治 教 授 久 保 秀 雄 教 授 萩 原 文 二

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

金ゾルは負に荷電しているので、少量の正イオンを加える事により、中和され、凝結して落ちる疎水膠質である。この金ゾル中、比較的安定にして且つ鋭敏な金ゾル RV はその保護物質と、陽イオンとの相互関係に於いて、桃色から桃紫、紫、紫青、青、淡青、無色とその色調を変化せしめる。この金ゾル反応を酵素反応に応用せんとした。

〔 方 法 〕

金ゾル RV を食塩水並びに緩衝液から保護出来る最小にして充分な酵素蛋白にて保護し、その酵素反応を成立せしめ、それぞれの対称に対する色調の変化を観察した。

〔 成 績 〕

1. Acetylcholinesterase への応用

この金ゾルは、赤血球より純化された Acetylcholinesterase によって Na イオンの attack から保護される。

この保護された medium へ、PH7.7の Veronal Buffer, Ach を添加し、その medium を 0°C に保つ時、その色調は変化しないけれども、37°C で incubate すると著明な色調の変化を来たす、酵素を 50°C 30分で失活せしめて、同様 incubate しても色調の変化を来たさないし、色調変化時の終末産物によっても、この変化を来たさない。又この反応は基質特異性を示す。即ちゾル粒子を覆って、ゾルを保護していた酵素が、酵素基質結合体形成により、ゾル粒子を覆うことが出来なくなり、Na イオンによりゾル粒子が中和され、凝集するものと考えられる。更に Cholinesterase 阻害剤の実験では、Eserine は Acetylcholinesterase のゾル粒子の保護力には変化を与えず、高濃度の Thiamine はその保護力を減弱せしめた。この事は、この二者の酵素への阻害機構の相異を暗示する。

2. Lactic dehydrogenase への応用

同じく Lactic dehydrogenase も金ゾルを保護する作用を有し、補酵素 DPN 基質 乳酸の添加で、medium (PH8.6) の色調の変化は著明であった。勿論 0°C ではこの反応は起らなかったし 60, °C, 30 分で失活せしめた酵素でも medium の、変化は見られなかった。この場合、乳酸のみでは変化なく、DPN のみの添加では色調の変化を来たした。これは補酵素と酵素との複合体形成により、酵素蛋白のゾル粒子に対する保護力が減弱するからであろうと考えられる。

### 3. Tyrosinase への応用

Tyrosinase で金ゾルを保護し、無酸素状態にて基質を作用させた時、金ゾル medium の色調は変化する。即ち無酸素状態に於いても酸素基質結合体形成が行なわれるだろうことを暗示する。この場合 Tyrosine 基質の場合は、Adrenaline 基質の場合よりも、その色調の変化に時間的な遅れをとるが、一定時間後には、はるかに著明な金ゾルの色調の変化が認められた。この時間的なズレと、色調変化の度合の差異は、基質との結合体形成機構の差異を物語るものであろう。Tyrosinase を 50°C, 30 分間 incubate して失活せしめると最早や金ゾルを保護する作用がなくなる。Tyrosinase の失活が酵素反応の過程で起ると言われるが、失活の原因を酵素蛋白部の変性と考えるならば、うなずける現象と言えよう。

### 4. Monoamine oxidase への応用

Monoamine oxidase (MAO) はラットの肝ミトコンドリア顆粒を、0.5% ヒヨール酸ソーダを含む 0.1 M 磷酸緩衝液 pH7.0 で suspend し、10000× g 60 分遠沈後、沈渣を更に上記の後で洗って同じく遠沈後、その上清を集め、上清 100 ml に対し 14.2 g の硫酸を加え、その滲液 100 ml に対し 13.2 g の硫酸を加えた沈渣を 0.1 M 磷酸緩衝液 PH7.0 で suspend して 20 時間 0°C で透析したものを 酵素材料とした。この MAO preparation で Tyramine, 3-Hydroxytyramine, Noradrenaline, Adrenaline の Michaelis 値を測定し、次にこの MAO で金ゾルを保護し、Na イオン存在下無酸素状態にて、これらの基質を添加すると、Michaelis 値の小さいもの程著明な金ゾル medium の色調の変化を来たし、Michaelis 値と金ゾルの medium の色調の変化は逆比例するを認めた。

#### 〔総括〕

酵素反応における酵素基質結合体形成を、簡単な金ゾル反応という新しい方法で、その medium の色調の変化により知り得るであろう事を Acetylcholinesterase, Lactic dehydrogenase, Tyrosinase, MAO による data から推察し、Lactic dehydrogenase と DPN との複合体形成時も同様であることを知った。この反応を応用して、Cholinesterase に対する Eserine と Vitamine B<sub>1</sub> の阻害機構の相異や、Tyrosinase の失活が蛋白部の変性であろうことを明らかにした。又この金ゾル反応は Tyrosinase の二重活性と、それに対する基質が monohydroxy の場合の induction period に一致した curve を画いた。又別にラットのミトコンドリア顆粒より soluble MAO を prepare することに成功した。

## 論文の審査結果の要旨

1920年 Zsigmondy により金ゾルの調整及び物理化学的研究が詳細に行なわれ、その後 Lange により脳脊髄液の病的蛋白質の分類に応用され、Lange の金ゾル反応として有名であるが、その原理は未だ未解決である。著者はこれを酵素反応に応用し、金ゾルに対して保護的に働く酵素蛋白と凝固的に働く中性塩

との System に基質を作用せしめて、酵素反応を成立せしめた時 Medium の色調の変化するを認め、この金ゾル Medium の色調の変化が酵素活性に比例し、Michaelis 値と逆比例する事を観察し、酵素と基質との親和性を知る Indicator として用い得る可能性を始めて明らかにしたのは興味深い。現在の所、酵素と基質との複合体形成の親和性を知る方法として確立されたものはなく、Michaelis 値から推察するか、複合体形成時の吸収スペクトルの変化から酵素蛋白の構造的変化を推察する等、酵素化学者により色々の努力がなされているが、今ここに酵素反応に於ける酵素活性、酵素と基質との親和性、酵素に対する阻害機構、酵素の失活に関する研究の一つの Indicator として用い得るかも知れないこの金ゾル反応という新しい方法は、面白い試みである。今後膠質化学的、酵素学的追求が必要であると共に、生化学的生理学、薬理学に应用することが出来るかも知れない。