

氏名	齊 藤 光 實 さいとうてるみ
学位の種類	薬学博士
学位記番号	薬博第89号
学位授与の日付	昭和47年7月24日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科薬学専攻
学位論文題目	ラットの MALIC ENZYME に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 富田謙吉 教授 山科郁男 教授 高木博司

### 論 文 内 容 の 要 旨

Malic enzyme は Ochoa らによって最初ハトの肝臓において見出され、その後、哺乳動物、軟体物動物、微生物など広く生物界に存在することが知られるようになった。その生理的な役割については、脂肪酸の生合成系に関与していると考えられているが、まだ充分明らかではない。筆者は malic enzyme の生理的役割を考える上の基礎資料として、主としてラットにおける malic enzyme の分布とその性質を検討した。

#### (1) 動物体内での分布

ラットと牛の各臓器における malic enzyme の分布を調べると、ラットの肝臓、脂肪組織、心臓の上清には、かなり強い活性があり、牛も肝臓をのぞいて同様であった。ラット、牛共、心臓と脳のミトコンドリア画分には malic enzyme 活性が認められた。

#### (2) 甲状腺ホルモンによる誘導酵素の精製と性質

ラット肝臓 malic enzyme は、甲状腺ホルモンや炭水化物の投与によって誘導されることが知られている。そこでまず乾燥甲状腺を2%含む食餌を与えたラット肝臓から malic enzyme の精製を行い、14%の収量で精製酵素を得た。その酵素化学的諸性質は正常ラットから部分精製した酵素とよく似ており甲状腺ホルモンによる malic enzyme の誘導は正常状態で存在している malic enzyme の do novo 合成によるもので、isoenzyme の誘導ではないと考えられる。さらに精製法の改良を行い、甲状腺ホルモンと同時にグルコースを65%含む食餌を与えたラットの肝臓から35%の収量で精製酵素を得た。これらの精製酵素はクロマト的、超遠心的、電気泳動的に均一で、ゲルろ過から求めた分子量は25万、超遠心分析からのS値は9.2Sであった。又 SH 阻害剤で強く活性が阻害されるので、SH 基が活性に関係していると思われる。アミノ酸分析の結果、S-S 結合はなく free SH 基が38~40個あることがわかった。アルカリ中で超遠心分析するとS値は2.7Sとさがり、subunit の存在を示めし、SDS polyacrylamide gel electrophoresis で subunit の分子量を求めると、66,000であった。従って4個の subunit から構成されている

と考えられる。この精製酵素の抗体を作り、免疫学的に肝臓上清酵素を検討したところ、肝臓上清には、食餌、ホルモンによって影響される酵素と、それに影響されず、心臓上清 malic enzyme と免疫学的に区別できない酵素の2つの isoenzyme の存在が示唆された。

### (3) ミトコンドリアに存在する malic enzyme

一方ミトコンドリアに存在する malic enzyme としてラットと牛心臓のミトコンドリア malic enzyme について若干の検討を行った。ラット心臓 malic enzyme は甲状腺ホルモン、炭水化物の投与によって、上清、顆粒酵素共、影響されない。ミトコンドリア酵素は、DEAE-cellulose, Sephadex における chromatography, malate に対する  $K_m$  値等において明確に上清酵素と区別された。又牛心臓ミトコンドリアに digitonin 法を適用し fractionation を行ったところ、malic enzyme は、inner membrane か或は matrix に比較的強く結合していることが示めされた。

### (4) Malic enzyme の non-Michaelis-Menten 型 kinetics

ラット肝臓上清酵素について、その kinetics を検討したところ、比較的 crude な酵素標品において異常な saturation curve をもち、malate の濃度約 1mM 付近に平坦部が生じることが見出された。Hill のプロットを行うと、malate 濃度が 1mM 以下ではその傾きな約 1 であるが、1mM 付近に屈折点をもち、それ以上の濃度では 2~25 の傾きをもつ。この現象は  $MgCl_2$  が通常の assay における 12.5mM から 5mM に下げたときにはみられなかったが、50mM と高濃度にしたときは観察された。又 aging 或は凍結融解によってこの平坦部はしだいに消失し、正常な Michaelis-Menten 型となった。この異常な kinetics は malate に対してのみみられ、そのモデル解析も行った。

## 論文審査の結果の要旨

Malic enzyme は、1947年 Ochoa らによってハト肝臓に見出され、 $malate + NADP \xrightleftharpoons[Mn^{2+}]{Mg^{2+}} pyruvate + NADPH + H^+ + CO_2$  の反応を触媒する。生理的役割については、NADPH を脂質合成系に供給するものと考えられているが十分には明らかではない。著者は、この点について、ラット及び牛における malic enzyme の臓器分布、誘導、誘導された酵素の諸性質を酵素学的、免疫学的に検討して次の結果を得た。

(1) 臓器分布 従来ラットについては断片的な報告しかなかったが、著者はこれを精査し、肝臓、や副睾丸脂肪組織など脂質生合成の盛んな組織では、malic enzyme 活性は殆んど可溶性画分にあり、心臓や脳ではかなりの部分がミトコンドリア顆粒に結合していることを明らかにした。

### (2) ラット肝臓 malic enzyme の精製

著者はラット肝臓の malic enzyme 活性は低く精製原料として不向きであるので、甲状腺ホルモン投与による誘導により比活性を高めたラットの肝臓を利用した。種々の手法を組合わせて、ハト肝臓の結晶酵素に匹敵する純度に精製して、正常ラットの酵素と比較した結果、物理化学的、酵素的、および免疫学的に両者とも諸性質が一致していた。従って誘導酵素は正常酵素の do nouo 合成による増大で、isoenzyme の増大によるものでないことも判明した。

(3) ラット肝臓上清における isoenzyme 存在の可能性 ラット肝臓上清の malic enzyme を精製して

これに対するウサギ抗血清を作り Ouchterlony 法により肝臓上清を検索した所、2種の malic enzyme が存在することが判明した。そのうち主要な方は、絶食により減少、食餌ホルモンによる誘導で増大し、その上、脂肪組織の酵素と一致した（脂肪組織型）。他方は、これらの条件によっては影響されず、且つ心臓上清に多く存在するものと一致していた（心臓型）。肝臓には両方の型の酵素が存在していることになる。なお、心臓ミトコンドリアの酵素は免疫学的に、その上清のものと全く異なっていた。

(4) 牛心臓 malic enzyme のミトコンドリア内分布 ジギトニン法を応用し、牛心臓ミトコンドリアを再画分した結果、malic enzyme はミトコンドリア内膜に、コハク酸脱水素酵素に匹敵する位強固に結合していることが判明した。心臓の malic enzyme は食餌、ホルモンの影響をうけないので、直接には脂質生成に関与しているとは考えられない。著者は、この他にも malic enzyme の Non-Michaelis Menten 型動力学型挙動も見出しており、その結果は、この酵素の生体における意義を推察する上に重要な貢献をなしたものといえる。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。