

|         |   |
|---------|---|
| 氏名      | 福 島 雅 典<br>ふくしま まさのり  |
| 学位の種類   | 医 学 博 士   |
| 学位記番号   | 論 医 博 第 808 号   |
| 学位授与の日付 | 昭 和 54 年 7 月 23 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  | Immunochemical Studies on Induction of Rat Liver<br>Mitochondrial Serine : Pyruvate Aminotransferase<br>by Glucagon<br>(グルカゴンによるラット肝ミトコンドリアのセリン：ピルビン酸アミノ転移酵素の誘導に関する免疫化学的研究) |
| 論文調査委員  | (主 査)<br>教 授 沼 正 作 教 授 早 石 修 教 授 佐 野 晴 洋  |

### 論 文 内 容 の 要 旨

セリンアミノ転移酵素 (EC 2.6.1.51) は、セリンのアミノ基をピルビン酸に転移し、ヒドロキシピルビン酸とアラニンを生成する反応を触媒する酵素で、ラットにおいては肝・顆粒画分に存在している。本酵素の生理的役割として、セリンからの糖新生への関与が推定されている (Lardy, *et al.* 1969)。本酵素は哺乳ラット肝において比較的高い活性を認めるが、成熟ラット肝では活性は低く、グルカゴン投与によって活性が著しく増大することが知られている (Rowell, *et al.* 1967, 1973)。グルカゴンあるいはジブチリル-cAMP 投与による本酵素活性の上昇は、シクロヘキシミド、アクチノマイシンDで阻害されることが示されている (Hoshino, *et al.* 1974)。本研究の目的はセリンアミノ転移酵素の肝細胞内局在を明確にし、本酵素を単一蛋白にまで精製し、さらに特異的な抗体を調製し、それを用いて本酵素のグルカゴンによる誘導機構を明らかにすることである。

セリンアミノ転移酵素活性は標品中の本活性により、セリンより生じたヒドロキシピルビン酸を NADH, D-グリセリン酸脱水素酵素 (EC1.1.1.26) を用いて定量測定する、ラットにグルカゴン (0.25mg/100gr) を投与すると、本酵素活性は、肝において比較的ゆっくりと上昇し、約12時間後には7-10倍に達する。グルカゴン投与ラット肝をコラゲナーゼで還流し、実質細胞と非実質細胞に分離すると、本酵素活性は、前者にのみ存在し、グルカゴンによる酵素活性の上昇は肝実質細胞において起こることが明らかとなった。グルカゴン投与ラット肝における本酵素活性はミトコンドリア画分に55-70%回収され、ミトコンドリアをジギトニン処理し、外膜と内膜-マトリックスに分画すると、後者にほとんど回収された。低張処理、凍結融解により容易に可溶化されることから本酵素はミトコンドリア-マトリックスに局在することが明らかとなった。グルカゴン投与ラット肝よりミトコンドリアを調製し、低張下に超音波処理後、遠心、上清に抽出された本酵素を硫酸分画、DEAE セルロース、ヒドロキシアパタイト、セファデックス G-150 のステップによって、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上ほぼ単一蛋白にまで精製した。本酵素は、分子量約40,000のサブユニットよりなる二量体である。本標品を Freund's のアジュバントと共にウサギ

皮下に注射し、本酵素に特異的抗体を調製した。免疫二重拡散、免疫電気泳動により、本抗体は肝又は、ミトコンドリア抽出物および精製酵素標品と単一の融合せる沈降線を形成した。本抗体を用いてグルカゴン投与、非投与ラット肝のホモジェネート、およびミトコンドリアにおける酵素量を免疫適定法により測定した。その結果一定量の抗体によって沈降する酵素活性は一定であり、グルカゴンによる活性上昇は、酵素量の増大に基づくことが明らかになった。次に  $^3\text{H}$ -ロイシンを用いて単位時間内に本酵素にとりこまれる放射能をグルカゴン投与、非投与ラットについて、比較した結果、抗体によって沈降する放射能は前者において約10倍高いことが明らかとなった。免疫沈降物を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析すると、放射能のピークは同時に泳動した精製酵素の位置に一致していた。酵素の半減期は  $^3\text{H}$ -ロイシンでパルスラベルしたラットより20時間毎に肝をとり出して肝抽出物を調製し、抗体により沈降する放射能を測定した結果、約30時間という長い時間であることが判明した。以上の実験的事実はラット肝ミトコンドリアのセリンアミノ転移酵素はグルカゴン投与によって酵素活性が上昇するが、その本態は酵素量の増大であり、その機構はグルカゴンにより、本酵素タンパクの生合成が促進し、ミトコンドリアマトリックスに酵素が蓄積することにあることを示している。

#### 論文審査の結果の要旨

セリンアミノ転移酵素は、ラット肝臓において、グルカゴン投与により誘導され、約12時間後に7~10倍に達する。この時肝臓をコラゲナーゼで還流し、実質細胞と非実質細胞に分離すると、酵素活性は前者にのみ存在する。更に細胞分画を行なうと、本酵素活性の55~70%はミトコンドリア画分に回収され、主としてマトリックスに存在することが証明された。ミトコンドリアから単一蛋白にまで精製された酵素標本は分子量約4万のサブユニットからなる二量体である。本酵素標品を用いて作った特異的抗体を用い、グルカゴンによる活性上昇は、酵素量の増大によることを証明した。また、 $^3\text{H}$ ロイシンを用いたパルスラベル法によりグルカゴンによる活性上昇は主として酵素蛋白の生合成の促進によることが証明された。

以上の研究は、グルカゴンによるセリンアミノ転移酵素の誘導の機構に関し、多くの新知見をもたらし、ホルモン作用の解明に寄与するところが多い。

よって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。