

氏名	阪口勝亮
	さかぐちよしあき
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第555号
学位授与の日付	昭和55年5月23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	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Synthesis and Coenzyme Activity of Water-Soluble, High-Molecular-Weight NAD <sup>+</sup> Derivatives Covalently Bound to Dextran T70 (デキストランT70に共有結合した水溶性高分子 NAD <sup>+</sup> 誘導体の合成と補酵素活性に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 内野治人 教授 糸川嘉則 教授 村地孝

## 論文内容の要旨

多数の脱水素酵素は NAD<sup>+</sup> を補酵素としており、それらの活性測定には、通常還元型 NADH の生成の分光またはケイ光光度的定量が用いられている。著者らは、生体成分の分析に試薬として固定化酵素を応用する研究の一環として、酵素と共に補酵素をも復利用する方法の開発を企てた。NAD<sup>+</sup> を分析の目的に繰り返し使用するためには、高分子に結合させた NAD<sup>+</sup> を用いる必要があり、かつ、その高分子 NAD<sup>+</sup> 誘導体は水溶性で、光学的分析に供しうる無色透明な溶液を与えるものであることが望ましい。著者は、デキストランT70を支持体として、これに NAD<sup>+</sup> を共有結合させた誘導体がこの目的に適していることを認め、数種誘導体を合成し、その化学的性質および補酵素活性について一連の研究を行った。

1. デキストラン結合 NAD<sup>+</sup> の合成。NAD<sup>+</sup> をそのアデニン環6位アミノ基を分岐点とし、適当な鎖長のスペーサを介して支持体デキストランと共有結合させた。すなわち、過ヨウ素酸酸化デキストランT70にオリゴグリシン(1量体ないし5量体)またはポリメチレンジアミン(メチレン数1ないし8)を結合させ、その先端に N<sup>ε</sup>-アミノエチルまたは N<sup>ε</sup>-カルボキシメチル NAD<sup>+</sup> を、それぞれ水溶性カルボジミド試薬を用いて縮合させた。ここに得られた誘導体は N<sup>ε</sup>-サクシニル NAD<sup>+</sup> を出発物質とする同種デキストラン結合誘導体に比して、pH9, 37°C または pH8, 室温における安定性において優れていることが知られた。ポリメチレンジアミンをスペーサとした誘導体(アルキル誘導体)は着色溶液を与える場合があるので、著者が今回新しく開発したオリゴグリシンをスペーサとした誘導体(グリシル誘導体)のほうが、分析に使用するのに適している。グリシル誘導体は乾燥デキストラン 1g 当り 5.0 ないし 13.9 μmol の NAD<sup>+</sup> を結合していて、NAD<sup>+</sup> 濃度として 0.1 mM 程度の水溶液を作製することが可能である。

2. デキストラン結合 NAD<sup>+</sup> の補酵素活性。ウサギ骨格筋乳酸脱水素(LDH)ほか数種の NAD<sup>+</sup> 依存性脱水素酵素をアポ酵素として、合成した誘導体の補酵素活性を測定し、その結果を遊離 NAD<sup>+</sup> の補酵素活性と比較した。アルキル誘導体の LDH に対する補酵素活性は、スペーサの骨格原子数が6個

の場合に最高値を示した。一方、グリシル誘導体の場合は、12-15原子数のスペーサを持つ化合物が最高の補酵素活性を与えた。ところが、同一のグリシル誘導体を用いても、アポ酵素の種類によって、その補酵素活性には著しい差異がみられた。例えば、スペーサ原子数12個の誘導体は、ウシ肝臓グルタミン酸脱水素酵素 (GluDH) に対しては12%の補酵素活性しか示さなかったが、ウサギ筋 LDH に対しては52%の活性を示した。このような差異は、アポ酵素の補酵素に対するミハエリス定数の差のみでは説明されないことが知られた。種々のスペーサのアポ酵素蛋白質に対する結合親和力の程度を、同種スペーサを固定化したアガロースゲルカラムクロマトグラフ法により検討したところ、アポ酵素とスペーサとの相互作用における疎水性因子の重要性を示唆する結果が得られた。トリグリシンをスペーサに含むデキストラン結合 NAD<sup>+</sup> は、固定化した LDH および GluDH に対しても有効な補酵素活性を示し、このものが酵素補酵素の両者をともに反復使用する自動分析のための試薬として有用であることが明らかにされた。

### 論文審査の結果の要旨

生体成分の分析に固定化酵素を試薬として応用する研究の一環として、酵素と共に補酵素 NAD の反復利用をも可能ならしめるため、高分子に結合した NAD を合成し、その補酵素活性につき一連の研究を行って次の成果を得た。

1. PH 安定性がよく、また光学的分析に供しうる無色透明な溶液を与えるデキストラン結合 NAD を合成した。特にトリグリシンをスペーサに含む誘導体が分析試薬として適していることを知った。
2. 合成した誘導体の乳酸脱水素酵素 (LDH) に対する補酵素活性はスペーサ骨格原子数により異なり、アポ酵素とスペーサとの疎水的相互作用が補酵素活性発現に重要な役割を演じていることを明らかにした。
3. デキストラン結合 NAD は固定化 LDH に対しても有効な補酵素活性を現わし、この系を用いた血清乳酸定量結果は、遊離 NAD と液性 LDH を用いた測定結果と良い相関を示した。

以上の結果は、従来使い捨てにされていた補酵素 NAD を高分子化して再利用するための基礎的知見を集積し、また病態検査学上有用な情報を提供したものであり、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。