

氏 名	田 中 孝 生
	た なか たか お
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	論 医 博 第 814 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	Purification and Properties of Long-Chain Acyl-Coenzyme-A Synthetase from Rat Liver (ラット肝臓より長鎖脂肪酸—CoA 合成酵素の精製およびその性質)

論文調査委員 (主 査) 教 授 佐 野 晴 洋 教 授 早 石 修 教 授 沼 正 作

論 文 内 容 の 要 旨

長鎖脂肪酸代謝経路の最初の反応である遊離長鎖脂肪酸の活性化は、長鎖脂肪酸 CoA 合成酵素により行なわれ、また、生成産物である長鎖脂肪酸 CoA 誘導体は、脂質代謝経路における中間物質および調節物質として、重要な位置を占めている。本酵素は、1953年、Kornberg と Pricer によるモルモット肝での発見に続いて広く生物一般にその存在が確認され、その重要性ゆえに数多くの研究が行なわれてきた。しかし、本酵素は膜結合性蛋白であるため、従来精製が困難とされており、精製例はわずかに当教室の保坂等による酵母 *Candida lipolytica* の例を除いて他に報告はない。動物組織での本酵素に関する研究は数多くあるが、すべて粗酵素標品を用いたものであり、その諸性質を明らかにするには、純化された標品を得る必要がある。今回著者は、ラット肝ミクロゾームおよびミトコンドリアの両者に存在することが知られている本酵素の純化を別個に試み、それぞれ成功し、それらの諸性質を明らかにした。

ラット肝ミクロゾーム画分およびミトコンドリア画分は、De Duve 等の方法に従い調製した。ミトコンドリア画分に見い出される本酵素活性は、ミクロゾーム画分のそれに比し極めて不安定で、20~30%ジメチルスルホキシド (DMSO) 存在の下で初めて安定化された。従ってミトコンドリア画分より本酵素を精製する際、常に25% DMSO を含む緩衝液を用い各操作を行った。両画分からの本酵素の精製方法は本質的に同じであった。各画分より本酵素を5 mM トライトンX100 で可溶化し、ブルーセファロース、ハイドロオキシアパタイトおよびホスホセルロースの各カラムクロマトグラフィーを行うことにより、ミクロゾーム画分からは84倍、ミトコンドリア画分からは125 倍に精製された標品が得られた。最終標品は、SDS ゲル電気泳動的にそれぞれ単一であること、N端分析にておのおの一種のアミノ酸しか示さなかったこと、および最終カラムクロマトグラフィーのパターンより純粋であることが判明した。

ミクロゾーム画分およびミトコンドリア画分より得た両精製標品は、炭素数10—20の飽和および不飽和脂肪酸を基質とし、 Mg^{++} 存在下にコエンザイムAおよびATPと共に反応量論的に長鎖脂肪酸 CoA, AMP および PPi を生成した。両精製標品は、パルミチン酸を基質とした場合、35℃で共に mg 蛋白当り26—

29国際単位の比活性を示し、この値は従来報告されているものより100倍以上高い値であった。

両標品は、基質としての長鎖脂肪酸やコエンザイム A に対する K_m が等しいこと、アシル基受容体およびヌクレオシド三リン酸に対する特異性が等しいこと、SDS スラブゲル電気泳動にて両標品ともまったく同一の泳動度を示すこと（既知の分子量マーカーを用い、その分子量は約 76000 と計測された）、共に N 端にアスパラギン（アスパラギン酸）が存在すること、アミノ酸組成がよく一致すること、至適 pH および温度安定性に差がないことなどより、両精製標品は互いに区別できず、同一の酵素であると判断した。

今回著者は、従来報告されているより 100 倍以上高い比活性を有する長鎖脂肪酸 CoA 合成酵素を、動物組織から精製することに初めて成功し、その諸性質を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

長鎖脂肪酸代謝の初発段階を触媒する長鎖脂肪酸 CoA 合成酵素は、ラット肝ではミクロゾーム及びミトコンドリアの両画分に存在する。本酵素に関する研究は数多くあるが、膜結合性酵素であるため精製が困難で、現在まで著者らが酵母 *Candida lipolytica* より精製した以外他に例はない。著者はラット肝ミクロゾーム及びミトコンドリアの両画分より本酵素を精製し、その諸性質を明らかにした。本酵素をトリトン X-100 で可溶化し、ブルーセファロース、ハイドロキシアパタイト、ホスホセルロースの各カラムクロマトグラフィーを行なって、従来の報告より 100 倍以上高い比活性を有する標品を得た。その均一性は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、N 端アミノ酸分析及び最終クロマトグラフィーのパターンより立証された。両画分よりの精製標品は、分子量、基質特異性、アミノ酸組成、N 端アミノ酸、安定性、至適 pH に関して、互いに区別し得なかった。

以上の研究は、膜結合性酵素である長鎖脂肪酸 CoA 合成酵素を動物組織より初めて均一に精製し、その諸性質を明らかにしたものである。

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。