

氏 名	下 野 英 世
	しも の ひで よ
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医 博 第 300 号
学 位 授 与 の 日 付	昭 和 42 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 病 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Metabolism of Deoxyribonucleotides, Purification and Properties of Deoxythymidine Monophosphokinase of Calf Thymus
	(デオキシリボヌクレオチドの代謝仔牛胸腺のデオキシチミジンモノ フوسفォキナーゼの精製及び性質について)
論 文 調 査 委 員	(主 査) 教 授 東 昇 教 授 植 竹 久 雄 教 授 花 岡 正 男

論 文 内 容 の 要 旨

Koruberg らによってdeoxythymidine (Tdr) の DNA へのとりこみが, *in vitro* の系で示されて以来 deoxythymidylate (dTMP) kinase はDNA 合成の盛んな細胞ないしは組織にのみ存在する事が多くの研究者によって明らかにされ, DNA 合成の前駆体供給に重要な酵素とみなされてきた。しかし本酵素は非常に不安定で, Hiatt と Bojarski が Tdr 或いは dTMP によって安定化される事を1960年に報告してから, Bessman らによる bacteriophage 感染菌における研究以外には, 特に動物組織における本酵素の精製及びその性質の解明は残されたままであった。

一方京都大学ウイルス研究所化学部において, 仔牛胸腺における DNA 合成の前駆体供給に関与する酵素のうち deoxyribonucleotide monophosphokinase は各基質の塩基部分に特異的な4種の酵素に分画され, それらのうち dTMP kinase の活性が最も低いことが明らかにされていた。そこで著者は Tdr あるいは dTMP の共存下に各種の蛋白分画法を用いて本酵素の精製を試み, 最精製標品として粗抽出液に比し500倍以上の比活性の標品を得る事ができた。本酵素は粗標品を例外として, dTMP kinase 活性の他に dUMP kinase 活性を有し, すべての精製操作をつうじて両活性は同様に分布し, かつ両反応の基質は互いの反応を拮抗的に阻害した。このことから両反応は同一蛋白上共通の部位にその活性部位を有しているとみなされた。しかるに, すでに京都大学ウイルス研究所化学部から報告された如く粗酵素標品では dUMP kinase 活性が見出されなかった。これは生体内で dUTP が DNA にとりこまれない機構の一つとみられ, すでに論じられているような特異的な dUDP あるいは dUTP phosphatase の存在によるものとみられる他に, 本実験によって, dUMP の磷酸化が非常に起こりにくいという事も関係していると考えられた。すなわち本精製酵素は dUMP kinase 反応において dUMP に対し高い見かけの km 値 ($1.25 \times 10^{-4} M$) を示し, dTTP で著しい阻害をうけ, 更に一定の条件下では ATP と dATP のみしか磷酸供与体とならなかった。

これに対し, dTMP kinase 反応においては dTMP の見かけ, km 値 ($2.1 \times 10^{-5} M$) が低く, dTTP

による阻害はわずかであり、とくに燐酸供与体としては、dTTP を除くすべての nucleoside triphosphate が有効であることがみだされた。

さらに燐酸供与体としての ATP の反応動力学から本酵素の特徴的な性質が明らかにされた。すなわち ATP の濃度に対して反応の初速度をプロットすると、高濃度 dTMP を用いた場合は Michaelis-Menten の式にあう曲線が得られたが、低濃度 dTMP を用いると曲線は Sigmoid となった。dUMP を用いた場合はより著しい Sigmoid 曲線が得られた。外挿によって ATP に対する見かけの k_m を求めると、dTMP kinase 反応では $2 \times 10^{-4} M$ 、dUMP kinase 反応では $5 \times 10^{-3} M$ であった。つまり同じ ATP に対する酵素の親和性が、基質が dTMP であるか dUMP であるかによって著しい変化をうけることを示しており、このような変化は k_m の大きく異なる両基質がそれぞれ異なった程度に酵素に結合することによっておこるものとみなされる。

また Tdr, dTDP, dTTP は ATP が高濃度のところでは dTMP あるいは dUMP と拮抗的に作用して反応を阻害するが、ATP の低濃度のところでは、Tdr 以外のものは反応を促進し、上記の Sigmoid 曲線は消えて Michaelis 式の曲線に近づいた。従って燐酸供与体の低濃度のところでは dTTP, dTDP 及び dTMP は本酵素に結合して燐酸供与体に対する酵素の結合部位の親和性を高めて反応を促進させるものとみなされた。さらにこれら三者は Tdr にまさる強力な本酵素の安定化作用を有している。

以上のことから本酵素は、これらの “positive effector” によって、活性の調節される regulatory enzyme として、DNA 合成の前駆体のうち特に重要とみられる dTTP の供給に重要な関与をなすものと考えられる。

その他、dTMP kinase 反応及び dUMP kinase 反応における基本的な酵素学的諸性質すなわち諸条件下での本酵素の安定性、S 値、至適 pH、二価金属要求性、化学量論的關係等が明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

デオキシチミジル酸 (dTMP) キナーゼは、DNA 生合成の律速的制御に関与する重要な酵素であるが、その酵素学的研究にはほとんどみとめられなかった。

下野は、まずこの酵素を安定にかつ高度に精製する方法を開発した。その精製酵素標品を用いて、下野の明らかにした諸点は：1) 燐酸受容体は dTMP と dUMP だけである、2) dTMP を受容体とするとき、すべての nucleoside triphosphate が燐酸供与体となりうるが、dUMP を受容体とするときは、ATP と dATP だけが供与体となりうる、3) 反応動力学の解析から、本酵素は典型的なアロステリック酵素であり、燐酸供与体と受容体が、互いに他方に対する酵素の親和性を変化せしめる効果をもつ、4) その作用の度合いによって2)に述べた燐酸供与体特異性のスペクトラムが決定される、の4点に要約される。

以上のことから下野の研究は、DNA 前駆体の代謝の問題のみならず、酵素学の基本問題に対しても大きな寄与をなしたものである。

以上本論文は学問的に有益であって医学博士の学位論文として価値あるものと認める。