

氏 名	岡 山 博 人 おか やま ひろ と
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医 博 第 491 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 1 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 生 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Purification and Properties of Poly (Adenosine Diphosphate Ribose) Synthetase (ポリ ADP リボース合成酵素の精製と性質)

論文調査委員 (主査) 教 授 沼 正 作 教 授 村 地 孝 教 授 早 石 修

論 文 内 容 の 要 旨

ポリ ADP リボース合成酵素は、広く有核細胞の核に存在し酸化還元の助酵素 NAD を基質にしてヒストン及び非ヒストン蛋白質に結合した ADP リボースのポリマーを合成する酵素である。種々の実験事実から、この核酸様のポリマーはこれらの蛋白質の修飾を通して、DNA の合成、分解、ヒストンの機能、更には細胞分化にも及ぶ種々のクロマチン機能の調節に関与していることが示唆されている。本酵素は、ラット肝臓、仔牛胸腺等から、部分精製され、再構成の実験から DNA 及びヒストンにより著明に活性化を受けることが知られている。従来からヒストンによるこの活性化は、主に ADP リボシル化のアクセプターとして作用するためと考えられてきた。

最近我々は、従来から精製が困難とされてきた本酵素をラット肝細胞核より約5000倍に精製し、ヒストンによる活性化の機構を検討した結果、精製酵素系においては、ヒストンはアクセプターではなく、もっぱら酵素の K_m 及び V_{max} を変化させるアロステリックな活性化因子として作用するという結論を得た。

本酵素は、湿重量 10g のラット肝細胞核から、クロマチン調製、0.6MKCl抽出、ヒドロキシルアパタイトカラム分画、45%~75%硫酸沈澱、セファデックスG-150 及びホスホセルロースカラム分画の各ステップを経て、約15%の収率で5500倍に精製された。最終カラムより溶出された酵素は、蛋白質のパターンとよく一致し、SDSゲル電気泳動の結果、分子量 5-6万の位置に2本の薄いバンドと1本の主バンドが認められることから純粋に近いと判断され、DNA、ヒストン及びポリ ADPリボース分解活性等の夾雑物質や夾雑活性はいずれも認められなかった。

精製酵素は以前報告された部分精製酵素と類似の性質を持ち、活性の発現に天然又は人工合成のDNAを必要とし、ヒストンを共に加えると、更に3-5倍の活性上昇を示した。ヒストンによる活性化はいずれのヒストン画分にも一様に認められ、DNAとの重量比1:1~1:2で最大の効果が見られた。この際、もしこれらのヒストンが従来より考えられていた様にアクセプターとして働いて酵素の活性化を行

っているのであれば最大限合成されるポリマーの鎖数、即ちアクセプター部位の数は、ヒストンを加えることにより増大するはずである。しかし、実際合成されたポリマーの鎖数及び鎖長を蛇毒ホスホジエステラーゼを用いて調べた結果、平均鎖長はヒストンの添加により約3倍増大したものの、鎖数は全く同じであった。更にヒストンの存在下で ADP リボシル化を行い酸不溶性反応産物を SDS ゲル電気泳動を用いて分析したが、いずれのヒストン画分にも ADP リボシル化を示す放射活性の取込みは認められなかった。他方、酵素の反応速度論的解析から、ヒストンの存在下では、NADに対する酵素の K_m は $80\mu M$ から $25\mu M$ へ減少し、最大反応速度は約2倍に増大することが判明した。

以上の結果から精製酵素に対しては、ヒストンはアクセプターとしてではなく、アロステリックな活性化因子として作用することが明らかになった。単離核でヒストンが ADP リボシル化を受けるという事実と考え合わせるとヒストンはアクセプター並びに活性化因子としての二重の働きをもってポリ ADP リボース合成に関与していると考えられる。さらに精製酵素系でヒストンの ADP リボシル化が見られないことから、ヒストンの ADP リボシル化に必要な酵素ないし因子が他に存在する可能性も示唆された。

論文審査の結果の要旨

ポリ ADP リボース合成酵素は、ひろく有核細胞の核に存在し、助酵素 NAD を基質として、ヒストンおよび非ヒストンたん白質に結合した ADP リボースのポリマーを合成する酵素である。著者は従来から精製が困難とされていた本酵素をラットの肝細胞のクロマチンから溶出し、約5000倍精製する事に成功した。さらに精製酵素標品を用いた反応速度論的解析から、精製酵素系ではヒストンはアクセプターとなり得ず、酵素の K_m と V_{max} を変化させるアロステリック活性化因子として作用する事を見出した。

以上の研究は本反応におけるヒストンの役割の解明に貢献し、クロマチンの修飾反応として重要視されているポリ ADP リボース合成酵素の研究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。