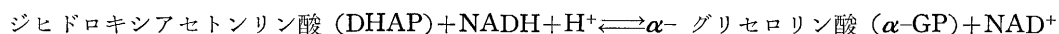


氏 名	野 津 克 忠 の つ よし ただ
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	薬 博 第 110 号
学位授与の日付	昭 和 48 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学位論文題目	ネズミの α -グリセロリン酸脱水素酵素に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 富 田 謙 吉 教 授 山 科 郁 男 教 授 高 木 博 司

論 文 内 容 の 要 旨

α -グリセロリン酸脱水素酵素 (L-glycerol-3-phosphate : NAD oxidoreductase, E. C. 1. 1. 1. 8) (α -GPDH) は 1937 年 von Euler らによってネズミの筋肉から発見され、次の反応を触媒する酵素である。



α -GPDH は、広く生物界に分布しており、中でも昆虫の飛翼筋や哺乳動物の肝臓、腎臓、脂肪組織、骨格筋などで、活性が高く、かつ、殆んど細胞内可溶性画分に局在している。一方 α -GP を酸化する酵素 α -グリセロリン酸酸化酵素 [L-glycerol-3-phosphate (acceptor) oxidoreductase, EC 11995] (α -GPO) はミトコンドリア内膜に存在し、ネズミの肝臓では甲状腺ホルモンによって著明に誘導されることが知られている。ところが最近、十分洗浄したネズミの肝臓のミトコンドリアにも NAD 依存性の α -GPDH の活性が認められ、しかもこれが、ミトコンドリア α -GPO と同じく甲状腺ホルモンの効果を受けることが富田らによって明らかにされたがその詳細な検討はなされていなかった。

ところで、 α -GPDH の生理的機能に関しては主に次の二つが考えられている。

① 解糖反応の結果、細胞質中に生じる余剰の NADH を NAD に再酸化する機構として、可溶性画分の α -GPDH とミトコンドリア画分の α -GPO とが共役して、 α -GP サイクルを形成する。

② 脂質合成のために必要である α -GP を供給する。

そこで著者は、

① ネズミの肝臓の可溶性画分とミトコンドリア画分の両 α -GPDH の異同と、ミトコンドリア α -GPDH の活性に及ぼす甲状腺ホルモンの影響を検討し、その生理的意義とを明らかにすること。

② Glycerolkinase の活性が殆どない副睪丸脂肪組織の可溶性画分の α -GPDH の酵素化学的、生理化学的、免疫化学的性質を肝臓の α -GPDH と比較検討して、その異同を明らかにすること。

③ 副睪丸脂肪細胞の脂肪分解作用に対する甲状腺ホルモンの影響を検討して、その作用機構を明らかにすること。

を目的として実験を行い、次の結果を得た。

1] (1) α -GPDH の精製 150 匹のネズミの肝臓 (1270 g) の上清より硫酸分画, DEAE-cellulose, Sephadex G-150, Hydroxylapatite, DEAE-Sephadex A-50 の4種類のカラムクロマトにより, 粗抽出液から約 600 倍に精製し, 比活性 258 の標品を, 収率 3.4% で得た。本酵素は Hg^{++} , PCHB により強く阻害されるので, 活性の発現には, SH 基が必須である。又熱変性に対して, NADH 及び α -GP が保護効果を持つ。

(2) 15 匹のネズミの肝臓からミトコンドリアを分離し, その抽出液より硫酸分画, DEAE-cellulose, Sephadex G-100 の2種類のカラムクロマトにより, 出発物質から 30 倍に部分精製し, 比活性 2.0 の標品を収率 35% で得た。

(3) 上清とミトコンドリア抽出液から精製した両標品は, 基質特異性, 分子量, K_m 値, 至適 pH が各々等しく, 又, ディスク電気泳動による活性のバンドが同じ相対移動度を示すこと, そして, β -GP を基質にしない。NADPH は NADH の代用とならないこと, DEAE-cellulose クロマトで活性のピークが同一の濃度で溶出されること, から, 本質的には, 恐らく同一の酵素であろうと思われる。

(4) ミトコンドリア α -GPDH と甲状腺ホルモン ミトコンドリア抽出液中に NAD 依存性の α -GPDH の存在を再確認し, 可溶性画分の α -GPDH とは異なり, これがミトコンドリア α -GPO と同様に甲状腺ホルモンの効果を受けることを確かめた。すなわち, 甲状腺摘出 (Tx) によって蛋白及び組織重量当りの両活性が正常の 50~60% に低下するが, Tx したネズミに甲状腺ホルモンを投与すると, 注射後 3~4 日で活性が 150~200% に増加し, しかもその経時的活性の変化が, ミトコンドリア α -GPO の活性の変化と並行しており, しかも, 組織重量当りの活性では殆んど常に α -GPDH が, α -GPO より高いことが明らかになった。

2] (1) 副睾丸脂肪組織の可溶性画分の α -GPDH 精製と性質 副睾丸脂肪組織 (20.5 g) の上清より, DEAE-cellulose, Sephadex G-150, Hydroxylapatite のクロマトにより, 出発物質より, 約 40 倍に部分精製し, 比活性 57.3 の標品を収率 15% で得た。これは分子量, K_m 値, S 値, ディスク電気泳動移動度は肝臓の上清の酵素と同一であるが, DEAE-cellulose カラムクロマトの挙動, SH 試薬による安定化, NADH の K_m 値, 精製過程におけるディスク電気泳動の挙動は異なる。

(2) 組織による異同, 生理的状态の影響 ネズミの各組織の上清では肝臓 (L), 骨格筋 (S), 脂肪組織 (A) で, α -GPDH の活性が強く, ディスク電気泳動の活性像も L, S, A の主に 3 つの型に分けられ, S は L と A の中間型を示す。L の上清酵素と異なり A の α -GPDH は食餌条件の変化によって, 活性の変動が認められる。すなわち, 脂肪分解が高まっている時には低く, 逆に脂肪合成が高まっている時には, 高い。しかし, 甲状腺ホルモンによる効果は, 殆んど認められない。又, ネズミの年齢にかかわらず, 肝臓の α -GPDH の活性は殆ど変化しないのに対し, A 酵素は離乳期中に活性が高まり L の約 5 倍となり生後 80 日位から徐々に下がってくる。このように A 酵素の活性が変化する時, ディスク電気泳動の活性像も変化する。すなわち, 離乳期以前の若いネズミの A 酵素は L 型であるのにそれ以後の成熟したネズミのそれは, A 型となる。又, 絶食や甲状腺ホルモンの投与によって, A 型は L 型に変化し, 再摂食や投与の中止によって, A 型に戻る。A 型と L 型の変換は, NADH, メルカプトエタノール,

EDTA の添加によっても生じる。なおL酵素ではこのようなディスク電気泳動の活性像の変化は認められない。

(3) 免疫化学的検討　ネズミ肝臓の上清の α -GPDH に対するウサギの抗体をつくり、各組織の上清や肝臓のミトコンドリア抽出液の α -GPDH と抗原抗体反応を行うと、いずれも沈降物を生じ、活性が消失する。オクテロニー二重拡散法によると、各組織の上清には、主、副二本の沈降線が、肝臓のミトコンドリア抽出液には、上清の主と一致する一本の沈降線が、それぞれ認められ、上清には、アイソザイムが存在するものと思われる。絶食や甲状腺ホルモンを投与したネズミでも、二本の沈降線が認められるが、正常と異なり、二つの沈降線の濃さは、同程度である。又、甲状腺ホルモンを投与した肝臓のミトコンドリア抽出液中には、正常と異なり、上清の主、副の二本に一致する沈降線が認められる。

3) 脂肪分解に対する甲状腺ホルモンの影響

(1) Sepharose 4B に直接、又、アームをつけ、これに、トリヨードサイロニンを結合させたものの二つを合成したが、トリヨードサイロニンそれ自身とは異なり、いずれも脂肪分解促進作用を示さなかった。

(2) 絶食したネズミの副睾丸脂肪細胞ではトリヨードサイロニンによって脂肪分解が促進される時に、ピルビン酸が、相乗的に働く。この時、 ^{14}C ピルビン酸は、糖新生に向い途中 DHAP から α -GP を経て、トリグリセリドへ入る系と、TCA サイクルに向い acetyl CoA から脂肪酸へ入る系と、TCA サイクルに入り、 CO_2 に変化する系の主に3つの系があり、 α -GP 系の関与する度合いが大きい。

以上の①～③の結果より、

ネズミの各組織の上清には、免疫化学的に異なる二種類の酵素が存在し、肝臓のミトコンドリア抽出液には、このうちの一つが存在し、甲状腺ホルモンの効果を受け、 α -GPO と α -GP サイクルを形成される可能が証明された。一方脂肪組織にも肝臓の上清と同一の酵素が存在するが、肝臓と異なり、生理的变化に伴い活性が変動することが明らかになり、臓器が異なれば、酵素蛋白自体は同一でも、その挙動に違いがあることが証明された。最後に甲状腺ホルモンは細胞内へ作用して、その効果を発現するという推定ができた。

論文審査の結果の要旨

α -グリセロリン酸脱水素酵素 (α GPDH) は、 $\alpha\text{GP} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{ジヒドロキシアセトン} - \text{P (DHAP)} + \text{NADH} + \text{H}^+$ なる反応を触媒し、昆虫の飛翼筋を始め生物界に広く分布し、細胞の可溶性画分に局在している。その生理的役割については、①ミトコンドリアの α -GP 酸化酵素 (α GPO) とグリセロリン酸サイクルを形成して細胞質における NADH の再酸化に関与、②脂質合成に必要な α GP の供給とが考えられている。しかし高等動物における α GP サイクルの生理的意義の有無、及びその制御機構については不明の点が多い。富田等は α GPDH が、ラット肝臓のミトコンドリアにも存在し、且つその活性が甲状腺ホルモンの影響を受けることを見出した。野津はこの点に注目して、ラット肝臓上清の α GPDH の酵素化学的諸性質とホルモン等による制御機構を検討し次の結果を得た。(1)ラット肝臓のミトコンドリア

アを Schnaitman らのジギトニン法を用いて再分画すると、その α GPDH 活性は外膜にゆるく結合していた。(2)ラット肝臓上清の α GPDH の精製法を工夫し、比活性 258 u./mg, Disc 電気泳動的に略々単一の標品を約 3% の収量で得ることが出来た。(3)この精製法を応用してミトコンドリア凍結融解抽出液より α GPDH を精製し、上清の酵素と酵素化学的諸性質を比較検討した。両者は極めて類似していて本質的には同一酵素であることを確めた。(4)ミトコンドリアの α GPDH の比活性は甲状腺摘出ラットでは、正常値の約 60% に低下し、これにトリヨードチロニン ($L-T_3$) を $250 \mu g/100 g$ 体重一回投与すると 24 時間以内に比活性の有意な上昇が認められた。その後の α GPDH 比活性の経時的变化は常に α GPO のそれと平行していた。また、この間の 2GPDH の活性 (u/g 肝臓) は常に α GPO の活性を遙かに越えていた。従って細胞質に多量に存在する α GPDH 全体ではなくて、その一部がミトコンドリア外膜に附着して、 α GPO と能率的なユニットを作りグリセロリン酸サイクルを形成し、且つ甲状腺ホルモンによって特異的な活性の制御をうけている可能性が強い。野津は更に脂肪組織における α GPDH の役割について基礎的検討を行ない、(1)脂肪組織の α GPDH は脂肪細胞由来である。(2)粗抽出液の Disc 電気泳動における α GPDH の活性バンド分布像は肝臓のそれと大いに異なり、且つ動物の栄養状態、年齢等によって強く左右される。(3)その α GPDH 活性は肝上清の精製酵素に対するウサギ抗血清によって中和される。(4)部分精製酵素の諸性質は肝上清の酵素のそれに類似するが、NADH に対する K'_m は二つある等の知見を得た。以上の諸結果は、高等動物における α GPDH の役割の解釈に関して寄与する所が多い。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。