

氏 名	平 田 雅 春 ひら た まさ はる
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 46 号
学位授与の日付	昭 和 42 年 1 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	3',5'環状モノヌクレオチド合成酵素に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 富 田 謙 吉 教 授 高 木 博 司 教 授 山 科 郁 男

論 文 内 容 の 要 旨

1957年 Sutherland 等はグリコーゲン代謝の調節に熱に安定な未知の低分子物質が関与している事を発見し、これを動物の組織中より抽出精製した。この物質は Lipkin 等の協力で構造が決定され、通称 3',5'環状 AMP と呼ばれるようになったが、その後の研究から 3',5'環状 AMP の産生がエピネフリンによって調節されている事が証明され、更に A.C.T.H., バソプレシン等のホルモンとも密接な関係のある事が判明した。即ち内分泌されたホルモンは先ず 3',5'環状 AMP を合成する酵素系 (アデニールサイクラーゼ) の存在する細胞部位に到達、これを刺戟して 3',5'環状 AMP の産生を促し、生じた 3',5'環状 AMP が酵素の活性化、或は膜透過性の高揚等の作用を通じて生理的機能を発現するものと一般に考えられている。この様に 3',5'環状 AMP の多岐にわたる機能が究明されているにも拘らず、その生合成のメカニズムの解明が遅々として進まぬ主たる原因はアデニールサイクラーゼが動物の細胞顆粒部分に存在し、その可溶化と精製が極めて困難な為であった。1963年に至り大腸菌にも、3',5'環状 AMP が存在する事が証明され、又岡林等も DL-アラニン を N 源として培養した土壤菌 *Brevibacterium liquefaciens* が培地に大量の 3',5'環状 AMP を放出する事を報告し、3',5'環状 AMP が自然界に広く分布する事が明らかとなった。

著者は 3',5'環状 AMP 生合成の機構を解明する為に、*B. liquefaciens* を材料に選び ATP から 3',5'環状 AMP を合成する酵素を可溶化、精製する事に成功し、更にこの反応にはコファクターとして Mg^{2+} の他にピルビン酸が必要である事を発見した。ここに得た酵素標品はヌクレオシドトリリン酸のうち ATP 及び dATP から各々 3',5'環状 AMP, 3',5'環状 dAMP を合成する能力を有し、この際等モルのピロリン酸を副生する事が明らかとなった。又この反応に於てピルビン酸が必須であるにも拘らず、それが反応に伴って消費されない事は興味ある事実と考えられる。

I. ピルビン酸によるアデニールサイクラーゼの活性化

B. liquefaciens を DL-アラニン、グルコース、 $MgSO_4$ 、リン酸緩衝液で構成する液体培地で振盪培

養し、得られた菌を超音波破碎しその抽出液から酵素を精製した。実験には $105,000 \times g$, 60分間遠心した上澄をストレプトマイシンによる除核酸処理, 並びに硫酸分画を行った酵素標品を主として用いた。酵素活性の測定は一定時間内に $ATP-^{14}C$ から生成する 3', 5' 環状 $AMP-^{14}C$ をペーパークロマトグラフィーで分離定量して行ったが, 酵素精製の初期段階で, この反応に Mg^{2+} の他に熱に不安定な低分子物質が必須である事が判明した。この物質の諸性質からケト酸の可能性が推測され, 事実添加実験の結果からピルビン酸が有効である事が明らかとなった。

ピルビン酸の他に α -ケト酪酸が同程度の活性化を, 又オキザル酢酸は30%有効であったが, ピルビン酸の代謝に関連する化合物例えばフォスフォエノールピルビン酸, アセチルリン酸, アラニン, 乳酸, α -ケトグルタル酸, ピリジンスクレオチド等はいずれも不活性であった。尚ピルビン酸は 3', 5' 環状 AMP の合成に伴っては消費されない。

3', 5' 環状 AMP の同定は次の様にして行った。ATP から酵素的に合成した 3', 5' 環状 AMP を Dowex カラムクロマトグラフィーにより分離精製して結晶を得, この紫外吸収, 赤外線スペクトラム及びペーパークロマトグラフィー, 渾紙電気泳動での挙動を夫々純品のそれと比較したところ両者は完全に一致した。又兎の脳から精製した 3', 5' 環状フォスフォジエステラーゼで処理すると AMP を生ずる事を確認した。

II. 3', 5' 環状 dAMP の酵素的合成

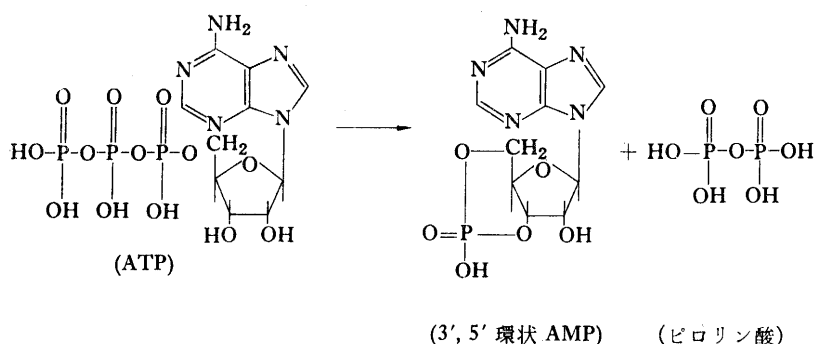
DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィー等を使用して酵素精製を更に進め, 得られた標品を用い基質特異性を調べたところ, GTP, ITP, UTP, CTP, TTP, dGTP, dUTP, dCTP はいずれもこの酵素の基質と成り得ないが, dATP からは 3', 5' 環状 dAMP を生成する事が明らかとなった。この場合の反応速度は ATP を基質とした時の速度とほぼ等しく, 又反応に際し等モルのピロリン酸を副生するが, ピルビン酸の消費は認められない。3', 5' 環状 dAMP は紫外吸収, ペーパークロマトグラフィーに於ける挙動が化学的に合成した純品と一致した。又酵素的に順次分解して生じた dAMP 及び d adenosine を夫々同定した。この様な 3', 5' 環状 AMP の酵素的合成の証明は自然界にこれが存在する可能性を示唆するものと思われる。

III. 3', 5' 環状モノスクレオチド合成酵素の精製とその調節機構について

除核酸処理, 硫酸分画, C_r ゲル処理, DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィー等によって精製した酵素標品は 3', 5' 環状 AMP 合成反応機構を究明する為に障害となる酵素群 (ATP アーゼ, 3', 5' 環状フォスフォジエステラーゼ, ピロフォスファターゼ等) がほぼ除かれている。この標品を用いて再度コファクターの要求性を調べたところ, ピルビン酸, α -ケト酪酸のみが有効であった。この酵素反応の直接の基質が ATP であるか否かを調べる為に $ATP-^{14}C$, $ADP-^{14}C$, 或は $AMP-^{14}C$ を基質として用い, 夫々から生じる 3', 5' 環状 AMP の量を測定したところ, $ADP-^{14}C$ 及び $AMP-^{14}C$ からの生成はほとんど認められず, 従って ATP が第一段階で ADP , 或は AMP に分解され, 次いでそれ等が 3', 5' 環状 AMP になるという可能性は一応否定された。次に ATP を基質として酵素反応を行わせた後, ATP, 3', 5' 環状 AMP を各々カラムクロマトグラフィーにて分離, 定量し副生するピロリン酸をも定量したところ, 3', 5' 環状 AMP とピロリン酸は等モル生じている事が明らかとなった。この際, 共存

するピルビン酸の量にほとんど変化が無い事を再確認した。また低分子物質による酵素反応の活性化には基質の k_m を変化させる例が多いのでその点についても検討を加えた。

ATP に対する見掛けの k_m は約 $1.5 \times 10^{-3} m$ であり、ピルビン酸に対する見掛けの k_m は約 $2 \times 10^{-3} m$ であるが、これ等の値はピルビン酸或いは ATP の濃度が変化しても相互にあまり大きな影響は与えない。更に蔗糖密度勾配遠心法で検討した結果この酵素は約 4S のタンパク質である事が判明したが、ピルビン酸が共存してもこの値に大きな変化は観察されなかった。以上の様に反応の化学量論を確立するとともに、ピルビン酸のコファクターとしての性格を一層明瞭にする事が出来た。



論文審査の結果の要旨

Cyclic AMP は、1957年の Rall, Sutherland, Berthet の研究以来、ホルモン作用の媒介者として、種々なる大切な生体反応に関与していることが明かになって来た。しかし、その生合成に関する研究は、Adenyl Cyclase の動物組織よりの抽出可溶化が困難なため発展していなかった。著者は、(1)動物組織の代りに、土壌菌 *Brevibacterium liquefaciens* の菌体より Adenyl Cyclase を分離して、凡そ100倍程度精製することに成功した。(2)酵素活性の測定法を改良し、従来の Phosphorylase を用いる間接法の代りに、ATP-8- ^{14}C を用いて、直接 cyclic AMP を測定する方法を工夫して精度を高めた。(3)その結果酵素の精製の進展につれて、ある低分子の因子が酵素活性に関与していることがわかり、之がピルビン酸等の α -ケト酸であることを証明した。ピルビン酸は反応の前後において増減がなく、直接反応にあづかっていない。之は本研究中、特に注目すべき興味ある発見である。

この酵素は直接エピネフリンで活性化されず、又、ホルモンをもたない微生物における cyclic AMP の意義は今後の問題であるが、本研究は、生体における cyclic AMP の生合成研究のいと口をつけたものであり、今後開発されるべき多数の興味ある問題を内蔵しており、生化学上の重要な成果である。

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定する。