



## Pyridoxal5'-Phosphate Binding of a Recombinant Rat Serine : Pyruvate/Alanine : Glyoxylate Aminotransferase

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 石川, 邦子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1049">http://hdl.handle.net/10271/1049</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 196号	学位授与年月日	平成 8年 3月26日
氏名	石川邦子		
論文題目	Pyridoxal 5'-Phosphate Binding of a Recombinant Rat Serine : Pyruvate / Alanine : Glyoxylate Aminotransferase (組換え体ラットセリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ基転移酵素へのピリドキサル5'-リン酸補酵素の結合)		

博士(医学) 石川 邦子

論文題目

Pyridoxal 5'-Phosphate Binding of a Recombinant Rat Serine : Pyruvate / Alanine : Glyoxylate Aminotransferase

(組換え体ラットセリン：ピルビン酸/アラニン：グリオキシル酸アミノ基転移酵素へのピリドキサル5'リン酸補酵素の結合)

論文の内容の要旨

一般に、アミノ基転移酵素はピリドキサル5'リン酸 (PLP) を補酵素として特定のリジン (Lys) 残基に Schiff 塩基で結合し、活性中心を形成している。セリン：ピルビン酸/アラニン：グリオキシル酸アミノ基転移酵素 (SPT/AGT) は第4群アミノ基転移酵素に属し、種特異的にペルオキシゾームあるいはペルオキシゾームとミトコンドリアの両方に局在する。ペルオキシゾームの酵素の主な役割は、蓚酸の直接の前駆体であるグリオキシル酸の代謝で、この酵素の障害から原発性高蓚酸尿症1型を生ずる。以前我々が経験した症例では Ser205→Pro の点変異を持つ変異 SPT/AGT がエネルギー依存性分解を受けることが認められた。この Ser205は PLP 結合 Lys の極く近傍にあると推定されたので、本研究では SPT/AGT の PLP 結合 Lys 残基を同定するとともにその結合様式を検討した。

〔方法〕 ヒトとラットの SPT/AGT の演繹アミノ酸配列は高い相同性 (79.3%) を持つので、ラット SPT/AGT cDNA の全長を含む pRspt<sub>10</sub>由来の SPT<sub>10</sub> (Mr44.4K のサブユニットからなるホモ二量体) を精製して使用した。精製酵素および ~0.5ML-Ser と ~1 M リン酸カリ緩衝液 (pH6) を用いて PLP を解離したアポ酵素を調製し、各々について吸収特性と PLP 結合数を測定した。両酵素を NaBH<sub>4</sub>還元、次いでピリジルエチル化した後 BrCN で切断、SDS/PAGE を行い、ウエスタンブロットで得られたペプチドについてアミノ酸配列を比較した。

〔結果および考察〕 精製酵素は278nm, ~330nm, ~420nm に吸収極大を持ち、サブユニット当たり 0.56-0.69の PLP を結合していた。アポ酵素は278nmと~330nm に吸収極大を示し、結合 PLP を持たず、その活性は PLP 添加に依存した。アポ酵素への PLP 添加時の結合は緩徐で、特に PLP が低濃度の時には37°Cで5時間以上を要した。PLP に対する K<sub>d</sub> は5時間の値を用いた Scatchard プロット解析で約0.1μMと計算された。アポ酵素に PLP を添加後、溶液中の PLP を再除去した再構築酵素はサブユニット当たり0.73-0.79の PLP 結合数で、精製酵素と比較して、比活性と A<sub>~420</sub>/A<sub>278</sub>はそれぞれ36%、23%増加し、A<sub>~330</sub>/A<sub>278</sub>は22%減少していた。BrCN 切断後の SDS/PAGE で Mr が約20K 以上のペプチド断片はほぼ同量の対になるバンドとして泳動され、このうち22K と23K の断片は、アミノ酸配列決定において22K 断片にのみ Lys209が検出されたこと以外は同一のペプチドであった。23K 断片の Lys209に PLP が共有結合していると推定された。アポ酵素や NaBH<sub>4</sub>処理を行わない精製酵素では22K バンドのみを認めた。精製酵素の NaBH<sub>4</sub>還元でも44K と45K の対のバンドが確認され、NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>を用いると45K バンドのみに<sup>3</sup>H が取込まれた。以上より、SPT<sub>10</sub>の PLP 結合 Lys 残基は Lys209であり、サブユニット当たり1個の PLP を結合し得るが、~330nm の吸収極大を持つ物質の存在のために PLP と Schiff 塩基を形成していないサブユニットが約半数弱もあると推定された。対照として、サブユニット当たり1個の PLP を持つ、ブタ心筋細胞質アスパラギン酸アミノ基転移酵素と *Bacillus stearothermophilus* D-アミノ酸アミノ基転移酵素の NaBH<sub>4</sub>還元を行ったが、SDS/PAGE において、NaBH<sub>4</sub>未処理の標品より移動度が多少遅い1本のバンドとして挙動した。

## 論文審査の結果の要旨

肝臓のセリン代謝のヒドロキシビルビン酸経路に関与するセリン：ビルビン酸アミノ基転移酵素 (SPT) とアラニン：グリオキシル酸アミノ基転移酵素 1 型 (AGT-1) は同一酵素である。本酵素の動物肝での局在は動物種によって異なっている。すなわちヒト、サル、ウサギ、モルモットなどではペルオキシゾーム、イヌやネコでは大部分がミトコンドリアに局在する。ラットではミトコンドリアとペルオキシゾームの両方に局在する。この違いは肉食性と草食性に関係があるらしい。すなわち生体に有害な蔞酸の前駆体であるグリオキシル酸の前駆物質が植物に多量に含まれており、草食動物の SPT/AGT は主にペルオキシゾームに局在して、グリオキシル酸を迅速に代謝し、無毒化するというものである。事実、原発性高蔞酸尿症 1 型は肝ペルオキシゾーム SPT/AGT の欠損によるもので、蔞酸やグリコール酸の過剰蓄積や排泄増加を来し、不溶性の蔞酸カルシウムが腎や全身に沈着し、最終的に重篤な腎不全を招来することが知られている。

以上のように SPT/AGT の生理的意義が大きいにも関わらず、本酵素の補酵素であるピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) の結合状態に関しては報告が乏しい。本研究において、申請者は SPT/AGT の PLP の結合部位を特定すると同時にその結合様式を検討した。

酵素源としては、ラット肝 SPT/AGT cDNA のほぼ全長を含むプラスミド pRspt10 を大腸菌 DH 1 株に組み入れ、培養して発現させた。20-30g の菌体を破碎、熱処理、P-セルロースカラム等で約 10 倍精製するとほぼ純品の酵素 (SPT<sub>10</sub>) を得ることができた。

本酵素をゲル濾過カラムクロマトグラフィーや SDS/PAGE で分子量を検討したところ、約 80K で、44K のサブユニットの二量体であることが分かった。各吸収スペクトルから、精製ホロ酵素はサブユニット当たり、0.56-0.69 個の PLP を含有していた。アポ酵素を調製後、PLP を添加した再構築酵素もサブユニット当たり 0.73-0.79 個であり PLP と Schiff 塩基を形成していないサブユニットが約半数弱あることが判明した。

ホロ酵素、アポ酵素両者を NaBH<sub>4</sub>還元、ついでピリジルエチル化後 BrCN で切断し、SDS/PAGE で分画したところ、ホロ酵素では 22K と 23K の対になったバンドを認め、アポ酵素では 22K バンドしか認めなかった。これらの 22K と 23K のバンド蛋白のアミノ酸配列を決定したところ、Lys209 が 22K 蛋白に検出されたが 23K では検出されなかった。それ以外は全く同一の配列であった。ホロ酵素、アポ酵素を NaBH<sub>4</sub>還元のみ行い、切断せずにそのまま SDS/PAGE にかけてところ、ホロ酵素では 44K と 45K の対になったバンドが出現し、アポ酵素では 44K のバンドのみが認められた。ホロ酵素の NaBH<sub>4</sub>還元を行う際、放射性の NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>を用いて<sup>3</sup>H の取り込みを調べたところ、44K バンドには取り込まれず、45K バンドのみに放射活性を認めた。これは 45K の PLP 部位が NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>で還元されたことを示唆するものである。

以上より、今回の実験結果として、① SPT<sub>10</sub> は同一の 44K の蛋白の二量体として存在し、補酵素である PLP は通常サブユニットの約半数に Schiff 塩基で結合した状態で存在する。② PLP の結合部位は N 末端より 209 番目の Lys である。これらの新知見は評価に値するものとされた。

審査の過程において、委員会は本論文の研究関連領域について次のような質問を行った。

- 1) SPT/AGT の PLP 結合部位に関する報告は本研究が最初かどうか
- 2) ヒト由来 SPT/AGT の cDNA を使わずにラット酵素 SPT<sub>10</sub> を用いた理由について
- 3) セリンを加えて PLP をはずすメカニズムについて
- 4) Scatchard plot が PLP と本酵素との結合解析に利用できるか否か

- 5) BrCN による酵素蛋白の切断部位について
  - 6) 22K と23K の違いが PLP によるものか、もしそうならば何故1000Da の差が出るのか
  - 7) SPT と AGT 各活性の強さについて
  - 8) ラット肝 SPT/AGT 酵素に糖鎖は存在するか
  - 9) SPT<sub>10</sub> の精製段階で PLP の濃度を上げれば Schiff 塩基結合をした PLP の数が増加するか否か
- これらの質問に対し申請者の解答はおおむね適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 鈴木 修  
副査 教授 菅野 剛史 副査 教授 藤田 道也  
副査 助教授 小田 敏明 副査 講師 中村 浩淑