



DEACETYLATION OF ACETYLPUTRESCINE IN RAT TISSUE

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 熊澤, 武志 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1409

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	医博論第 1 3 2 号	学位授与年月日	平成 4 年 1 2 月 1 8 日
氏 名	熊 澤 武 志		
論文題目	DEACETYLATION OF ACETYLPUTRESCINE IN RAT TISSUE (ラット組織中のアセチルプトレシンの酵素的脱アセチル化反応)		

医学博士 熊澤武志

論文題目

DEACETYLATION OF ACETYLPUTRESCINE IN RAT TISSUES

(ラット組織中のアセチルプトレシンの酵素的脱アセチル化反応)

論文の内容の要旨

哺乳類のポリアミン代謝系における脱アセチル化酵素として N^8 -アセチルスベルミジンよりアセチル基を離脱させるアセチルスベルミジン脱アセチル化酵素が1987年に報告されている。しかし、アセチルプトレシンの脱アセチル化反応とその反応を司る酵素の存在については未だ報告されていない。本研究では、アセチルプトレシンの酵素的脱アセチル化反応をラット組織を用いて検討した。

【方法】

本実験で用いたラット各臓器は、雄ウィスターラット（体重200～250 g）から摘出した。また、酵素反応の基質として用いる[アセチル- 1^{14}C]アセチルプトレシン、[プトレシン-1、4- ^{14}C]アセチルプトレシン及び[アセチル- 1^{14}C]アセチルスベルミジンを化学合成した。酵素反応はリン酸緩衝液中で放射性気質を用いて37℃で加温した。アセチル基を ^{14}C でラベルしたアセチルプトレシンとアセチルスベルミジンを基質として用いた実験では、反応後生成する放射性酢酸を酢酸エチルで抽出し、その一部を放射能測定に供した。また、反応生成物が酢酸であることを確認するため、Conway 拡散セルを用いて NaOH 液による遊離酢酸のトラップを試みた。プトレシン側を ^{14}C でラベルしたアセチルプトレシンを基質として用いた実験では、反応後遊離した放射性プトレシンを薄層クロマトグラフィーで展開し分離検出した。酵素の細胞内分布及び精製は常法によって行った。

【結果】

ラット組織において、アセチルプトレシン脱アセチル化反応の活性は肝臓で最も高かったので、この反応を司る酵素本体の検討を肝臓を用いて行った。

アセチルプトレシン脱アセチル化反応によって生成する酢酸とプトレシンを、それぞれ Conway 拡散セルと薄層クロマトグラフィーで確認することが出来た。また、本活性は加温時間及び酵素量の増加に応じてほぼ直線性に増加し、 K_m は $74.5 \mu\text{M}$ 、至適 pH は 8.3～8.6 であった。この結果からアセチルプトレシンの脱アセチル化反応は酵素的な反応であることが確認された。

アセチルプトレシン脱アセチル化反応の種々の阻害剤による影響を肝臓ホモジネートを用いて検討したところ、p-chloromercuribenzoic acid と CuCl_2 によってその反応がほぼ完全に阻害された。この阻害効果は N^8 -アセチルスベルミジン脱アセチル化反応においても同様の結果であった。さらに、種々のアミン誘導体による競合阻害効果を検討したところアセチルプトレシン脱アセチル化反応においては、 N^8 -アセチルスベルミジン、アセチルカダベリンの順に高い阻害効果が認められた。また N^8 -アセチルスベルミジン脱アセチル化反応においては、アセチルプトレシン、アセチルカダベリンの順に高い阻害効果が認められた。

アセチルプトレシン脱アセチル化反応は、ホモジネート中に存在する活性の93%が可溶性分画に回収され、核、ミトコンドリア及びミクロソーム分画の活性は、いずれも3%以下であった。この結果は N^8 -アセチルスベルミジン脱アセチル化反応とほぼ同様であり、前者は後者の2～4分の1の活性であった。

アセチルプトレシン脱アセチル化酵素及びアセチルスベルミジン脱アセチル化酵素はラット肝臓ホモジネート、硫酸分画、DEAE-セルロースカラム、AcA-34及び Sephacry 1 S-300 ゲルろ過カラムによる部分精

製によって分離できず、その分子量は両者とも約25～29万と推定された。

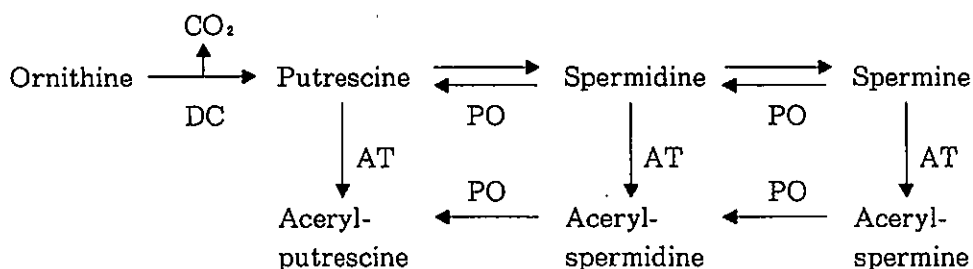
【考察】

プトレシンの生成経路としては、オルニチン脱炭酸酵素によってオルニチンから、また、ポリアミン酸化酵素によって N¹-アセチルスperlミジンからの2種類の代謝系だけが知られていた。しかし、今回の結果から、アセチルプトレシンの酵素的脱アセチル化反応による新しいプトレシン生成経路の存在が確認された。また、アセチルプトレシン脱アセチル化反応と N⁸-アセチルスperlミジン脱アセチル化反応とを比較した結果、阻害剤、アミン誘導体による競合阻害効果、細胞内分布、酵素の精製及び分子量などの類似性から、アセチルプトレシンは、アセチルスperlミジン脱アセチル化酵素によって脱アセチル化されるものと結論づけられた。

論文審査の結果の要旨

代表的なポリアミンであるプトレシン、スperlミジン、スperlミンは、前立腺、脾臓、顎下腺、がん組織等分泌活性や蛋白合成、核酸合成の盛んな組織に多く含まれており、生理作用として、転写促進作用、翻訳活性化作用等が注目を集めている。

これらポリアミンは、オルニチンカルボキシラーゼによるオルニチンからプトレシンへの脱炭酸、および引き続く S-アデノシルメチオニン由来のプロピルアミン基の逐次添加により新規合成される。一方、異化過程では、主としてポリアミンオキシダーゼとアセチルトランスフェラーゼにより代謝され、アセチルプトレシン、アセチルスperlミジン等として尿へ排泄されることとが知られている（図参照）。特にアセチルプトレシンは尿への排泄が多く尿中ポリアミンの約50%を占めると言われている。



主論文に記載された研究の骨子は、アセチルプトレシンから脱アセチル反応によりプトレシンと酢酸を生成するラット肝臓の酵素を部分精製し、基本的性質を明らかにしたことであり、その意義は、本酵素がポリアミンのサルベージ生合成反応を触媒しているという可能性を指摘したことである。

アセチルポリアミンの脱アセチル化反応を触媒する酵素としては、1978年に Libby によって、アセチルスperlミジンデアセチラーゼがラット肝臓から部分精製されているが、この酵素はアセチルプトレシンに作用しないとされていた。しかし、申請者の研究では、アセチルプトレシンデアセチラーゼの部分精製の全過程を通してアセチルスperlミジンデアセチラーゼ活性も同一の挙動を示した。肝臓ホモジネートの両酵素活性は各種阻害剤により同様の影響を受け、種々のポリアミン誘導体による競合阻害実験の結果も両活性が同一酵素に由来することを示唆するものであった。今回申請者が部分精製した酵素はアセチルスperlミジンデアミラーゼである可能性が高いが、たとえそうであっても、この酵素がアセチルプトレシンを基質にすることを明らかにした意義は大きいとされた。

また、申請者は以上の内容の研究の外に、N'-[^{14}C]アセチルスベルミジンを基質とするポリアミンオキシダーゼの高感度アッセイ法を開発し、副論文として提出されたので、論文審査委員会ではこの研究結果も合わせて報告された。

主論文および副論文に記載された研究内容と関連して以下の質問がなされた。

- (1) 正常細胞とがん細胞でのポリアミンアセチル化活性やアセチルポリアミン脱アセチル活性の質的あるいは量的な異同について。
- (2) アセチルプトレシン脱アセチル活性測定のための反応液中にモノアミンオキシダーゼ阻害剤を加えた理由。
- (3) SH試薬としてよく用いられている β -メルカプトエタノールとジチオスレイトールの作用面での違いについて。
- (4) 1978年に Libby が部分精製したアセチルスベルミジンアセチラーゼと今回部分精製されたデアセチラーゼが同一酵素とすると、Libby の実験結果と今回の実験結果の相違の考えられる理由。
- (5) アセチルプトレシン脱アセチル活性の生理的意義。

これらの質問に加えて、アセチルプトレシンデアセチラーゼとアセチルスベルミジンデアセチラーゼの異同についての申請者の実験が適切であるか否かについての議論が行われた。

申請者のこれらの質問に対する解答および議論における応答は概ね適切であった。

以上により、本研究は博士（医学）の学位授与に値すると審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 市 山 新

副査 教授 菅 野 剛 史 副査 教授 中 野 稔

副査 教授 藤 瀬 裕 副査 教授 藤 田 道 也