

(17)

氏名(生年月日)	山 口 知 子 ヤマ グチ トモ コ
本 籍	
学位の種類	医学博士
学位授与番号	乙第108号
学位授与の日付	昭和45年11月20日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	<b>Inhibition of Glutamic Dehydrogenase by Bilirubin</b> (ビリルビンによるグルタミン酸脱水素酵素の阻害)
論文審査委員	(主査)教授 松村 義寛 (副査)教授 三神 美和, 教授 千谷 七郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 研究目的

高次構造をとる酵素には、酵素の活性部位に結合する酵素の調節因子とは別に、いわゆるアロステリックな調節機構があるという Monod らの仮説を裏付ける事実が近年多くの酵素で実証されてきたが、アロステリックな調節因子として現在までに見出されてきたのは阻害因子であれ、賦活因子であれ、多くはある種のアミノ酸や ATP, CTP または NADH など酵素反応の cofactor であるとか、その他ホルモンなどが報告されているが、生体内でこれら低分子化合物が代謝調節に少なからず関与している事は興味深い。著者はビリルビンがグルタミン酸脱水素酵素を阻害することを見出したので、その阻害機序を明らかにする目的で以下の実験を試みた。

#### 研究方法

市販結晶ウシ肝グルタミン酸脱水素酵素を用い、ビリルビンのうち遊離型およびアルブミン結合型ビリルビンは市販品を、またグルクロン酸抱合型ビリルビンは Watson らの方法に従ってイヌの胆汁から調製したものを Hyflo-Super-Cel に吸着させ、水で溶出させて使用した。酵素活性は NAD を補酵素として日立自記分光光度計を用いて測定し、酵素の三次構造の検索にはセファデックスゲル濾過法および超遠心分析を行なった。

#### 結果ならびに考按

グルタミン酸脱水素酵素はグルクロン酸抱合ビリルビンによつて著しく、また遊離型ビリルビンによつて中等度に阻害されるがアルブミン結合型ビリルビンによつては殆ど阻害をうけない。グルクロン酸抱合ビリルビンは

調製中に胆汁酸の混入が考えられ、ビリルビンの作用に加えて胆汁酸の detergent 効果で酵素の開裂に強く働くものと推定されたので、ビリルビン本来の阻害機序の解明には遊離型ビリルビンを用いて実施した。ビリルビンが存在すると、同じ酵素濃度においても、酵素の開裂が起ることがセファデックス G 200 を用いたカラムクロマトグラフィーでわかり、更に開裂を裏付ける目的で超遠心分析を行なうと、酵素の同濃度で、ビリルビンが存在すると沈降係数が約半分になることが明らかになった。また、ビリルビンの酵素阻害は  $Zn^{2+}$  の高濃度において完全に失活が除かれるところからビリルビンは  $Zn^{2+}$  によつて結合されているといわれるグルタミン酸脱水素酵素の 6 コのサブユニットから  $Zn^{2+}$  を奪い、ビリルビン-Zn 複合体を作つて、酵素を開裂に導き、失活させるものと思われる。また、グルタミン酸脱水素酵素は EDTA のようなキレート物質によつても完全に阻害をうけるが、コール酸のような detergent によつては部分阻害しか起こさない。すなわち、ビリルビンの阻害は構造上異環窒素化合物という点で類似しているフェナンスロリンやキノリンのような金属結合物質の作用に以下の点で共通している。i) 阻害は可逆的であり  $Zn^{2+}$  の存在下において失活が除かれる。

ii) NAD 結合部位に見かけ上、競争的に結合する。それらの点を考慮すると、ビリルビンの阻害機序はタンパク変性に働く detergent 作用に類を求めるよりは、生体キレート物質とし働くものと考えられる。ビリルビン特に直接型(グルクロン酸抱合)ビリルビンの血清中増

量は多くの障害をもたらすことは衆知の事実であるが、生化学的にはトリプシンやキモトリプシンなどタンパク水解酵素および肝アミラーゼや消化管アルカリホスファターゼを阻害し、更に脳および肝細胞のミトコンドリアの酸化的磷酸化の uncoupler として働き、ミトコンドリア中へのリンのとりくみを抑え、プロトン濃度凝固時間を延長させ、コレステロールエステラーゼの活性を低

下させるなど、多くの事実が明らかになっている。また胆汁酸も酵素阻害剤として知られ、ミオシンの ATPase や胆汁ホスファターゼを阻害するなど胆汁は多くの酵素阻害に働く組成を含む体液で、ここにビリルビンがグルタミン酸脱水素酵素を阻害する事実を解析し立体的に構造変化をとる酵素に対してアロステリックな調節作用をすることが示唆された。

## 論文審査の要旨

グルタミン酸はアミノ酸代謝の諸反応の基礎ともいわれるアミノ基転移反応の中心的存在をなす物質であり、グルタミン酸脱水素酵素の活性を通じて、生体内代謝機構に広く関係を持つことができる。グルタミン酸脱水素酵素に対して、同じく生体内物質であるビリルビンが阻害作用を有することが本論文により明らかにせられた。この事実は生体内代謝調節の機構に対して新たな知見をもたらしたものであつて、学術上価値あるものと認める。

### 主論文公表誌

Inhibition of Glutamic Dehydrogenase by Bilirubin.

(ビリルビンによるグルタミン酸脱水素酵素の阻害)

Journal of Biochemistry (Tokyo)

Vol. 68 (4) 441~447 (1970)

### 副論文公表誌

1) ラット肝ホモジネート中のグルタミン酸脱水素酵素測定に関係する因子について。

東女医大誌 35 47~50 (昭40. 2)

2) Studies on  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphate Incorporation into Nucleotides, Phospholipids and Phosphoproteins of Isolated Nerve Endings from Developing Rat Brain.

(発育中のラット脳から単離した神経末端分画による  $^{32}\text{P}$  の核酸磷脂質および磷タンパクへのとりこみに関する研究)

by A.A. Abdel-Latif, T. Yamaguchi, M. Yamaguchi and F. Chang

Brain Research, 10 307~321 (1968)

3) Studies on the effect of Ouabain on Sodium and Phosphate Uptake into Nerve Endings of Developing Rat Brain.

(発育中のラット脳の神経末端におけるナトリウムおよび磷酸のとりこみにおよぼすウアバインの影響に関する研究)

by A.A. Abdel-Latif, M. Yamaguchi, J. Smith T. Yamaguchi

Life Science, 7 1325~1333 (1968)

4) Studies on Phosphate Metabolism and  $\text{Na}^+$  Uptake in Nerve Endings of Developing Rat Brain.

(発育中のラット脳の神経末端分画における磷酸代謝とナトリウムのとりこみに関する研究)

by A.A. Abdel-Latif, T. Yamaguchi, M. Yamaguchi and F. Chang

Federation Proceeding, 27 287 (1968)

5) Inhibition of Dipeptide Transport in Mouse Brain Slices.

(マウス脳切片におけるジペプチド輸送の阻害について)

by T. Yamaguchi, M. Yamaguchi and A. Lajtha  
Journal of Neurological Science, 10 323~433 (1970)

6) Amino Acid Uptake in the Peripheral Nerve of the Rat.

(ラットの末梢神経によるアミノ酸のとりこみについて)

by M. Yamaguchi, T. Yanos, T. Yamaguchi and A. Lajtha  
Journal of Neurobiology 1 419~433 (1970)