

氏名	山田和弘
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第1831号
学位授与の日付	平成10年9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Studies on Rat Cobalamin-dependent Methionine Synthase ラット・コバラミン関与メチオニンシンターゼに関する研究
論文審査委員	教授 虎谷 哲夫 教授 大森 齊 教授 金澤 浩

学位論文内容の要旨

ビタミンB₁₂(B₁₂; cobalamin, Cbl)関与酵素の一つであるメチオニンシンターゼ (MS) は、メチオニン代謝と葉酸代謝の接点に位置する重要な酵素であるが、動物酵素については不明な点が多い。本論文ではラットを用いて、肝臓MSの精製、cDNAクローニング、組み換え体酵素の発現と性質、およびB₁₂欠乏動物での動態について研究を行った。

ラット肝臓よりMSを単一にまで精製した。この酵素は分子量14万の単量体で、活性発現には還元系とS-adenosylmethionineを必要とした。精製酵素のN末端アミノ酸配列を解析し、これをもとにラット肝臓mRNAを鋳型としたRT-PCR、3'-および5'-RACEにより、4.5kbのラットMS cDNAの塩基配列を明らかにした。大腸菌での大量発現系で得られた不活性な蛋白質を用いてウサギ抗ラットMS抗血清を作成した。活性をもつ組み換え体酵素は、昆虫細胞でのbaculovirus発現系により得られた。この発現系でアポ酵素の調製も可能となったので、補酵素特異性および活性化、再活性化に関する検討を行った。さらにB₁₂欠乏が酵素活性、酵素蛋白質量、mRNA発現量に及ぼす影響を検討した結果、MSは動物細胞内においてB₁₂量によらず定常的に発現し、Cblとの結合により安定化されることが示唆された。

論文審査結果の要旨

メチオニンシンターゼはビタミンB₁₂（コバラミン）が補酵素として関与するメチル基転移酵素で、メチオニンと葉酸の代謝に重要な役割を演じている。最近、大腸菌の酵素を用いてその構造と機能の研究が活発に行われつつあるが、動物酵素についての知見は、組織中の含有量が低いこともあって極めて限られている。本論文は、B₁₂欠乏の栄養学的研究が詳細に行われているラットを用いて、肝臓からの本酵素の精製、cDNAクローン化、組み換え体酵素の発現と性質、およびB₁₂欠乏状態での動態、について行った研究をまとめたものである。

申請者は、まずラット肝臓からメチオニンシンターゼを単一にまで精製した。本酵素は単量体酵素であった。精製酵素を用いたN末端アミノ酸配列解析の結果をもとに、ラット肝臓mRNAを鋳型としたRT-PCR、3'-および5'-RACEにより、cDNAのクローン化と塩基配列解析を行い、ラット酵素のアミノ酸配列を明らかにした。大腸菌での大量発現系で得られた不活性なポリペプチドを用いて、本酵素に対するウサギ抗血清を作成した。一方、昆虫細胞でのバキュロウィルス発現系では、酵素活性をもつ組み換え体酵素が得られた。この発現系で大量調製が可能となった本酵素を用いて、補酵素特異性や、還元系とS-アデノシルメチオニンによる再活性化などに関する酵素化学的検討を行った。さらにB₁₂欠乏が酵素活性、酵素蛋白質量、mRNA発現量に及ぼす影響を検討した結果、本酵素は動物細胞内においてB₁₂量にかかわらず定常的に発現し、コバラミンと結合することにより安定化されることが強く示唆された。

以上のように本研究では、ラットメチオニンシンターゼに関して重要かつ独創的な新見解が得られており、学術上資するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位に値するものと認める。