

オルニチン脱炭酸酵素の活性調節 機構に関する研究

(研究課題番号：01570148)

平成3年度科学研究費補助金(一般研究C)研究成果報告書

平成4年3月

研究代表者 木谷隆子

(旭川医科大学医学部教務職員)

は し が き

平成元年度から文部省科学研究費補助金（一般研究C）の助成のもとに行われた「オルニチン脱炭酸酵素の活性調節機構に関する研究」は3年間の研究期間を終了し、ここに研究成果をまとめることになった。本研究は細胞増殖、癌化の機構に深く関わっていると考えられるポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素の活性制御機構を明らかにする目的でスタートした。オルニチン脱炭酸酵素は哺乳動物の酵素の中で最も代謝回転の速い酵素として知られており、その急激な活性変動は多くの研究者の注目を惹いてきた。生体での酵素活性の調節は、酵素蛋白質の合成と分解による酵素蛋白質の量的変化によるものと、酵素の活性化と不活性化の酵素蛋白質の質的变化によるものの2つが考えられる。私はオルニチン脱炭酸酵素の活性変動の速さから察して、酵素の活性化不活性化の質的变化が重要と考え研究を進めてきた。本研究のスタートに先駆けて、私はオルニチン脱炭酸酵素、およびその特異的な活性阻害蛋白質であるアンチザイムをラットの肝臓からそれぞれ70万倍、および60万倍という高倍率で精製し純粋にしてそれらの性質を調べる一方、ヘパリンなどのポリアニオンや、ホスファチジルイノシトールやホスファチジルセリンなどの陰イオン性磷脂質が酵素活性を著明に抑制すること、またホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンなどの中性磷脂質が促進することを明らかにし、オルニチン脱炭酸酵素の活性に影響を与える生体成分について *in vitro* での研究を進めてきた。本研究では引き続き、アンチザイムの特異的な活性阻害蛋白質であるアンチザイムインヒビターの研究を進め、“研究成果”の項に記載したように、ラットの肝臓から1700万倍という高倍率で精製することに成功しその性質を研究した。その後、研究をより生理的意義を目指す方向に向け、オルニチン脱炭酸酵素の活性が生体や細胞の環境変化や、細胞に与えられる種々の刺激によって著明に変動することから、細胞内情報伝達機構との関連とくにセカンドメッセンジャーに応答する多機能性蛋白質磷酸化酵素による活性制御について研究を進めたが、特筆すべき結果は得られなかった。結論的には、オルニチン脱炭酸酵素は極めて速やかな代謝回転で変動しているに

もかかわらず、これまでその活性の変動は酵素蛋白質の量的変動の面から研究されるばかりであった。本研究では、もとより全ての研究計画が達成されたわけではないが、オルニチン脱炭酸酵素の活性調節に酵素蛋白質の質的変動も重要であることを、アンチザイムや、アンチザイムインヒビターなどの物質的根拠をもって示すことができたと思う。今後、オルニチン脱炭酸酵素の量的変動、質的変動を各種の生理的条件下で調べ、生体におけるこの重要な酵素の活性制御機構を明らかにしていくことが重要である。

研究組織

研究代表者： 木谷隆子 （旭川医科大学医学部 教務職員）

研究経費

平成元年度	800千円
平成2年度	800千円
平成3年度	700千円
計	2300千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. T. Kitani and H. Fujisawa : Purification and Characterization of Antizyme Inhibitor of Ornithine Decarboxylase from Rat Liver, *Biochim. Biophys. Acta* 991, (1989)
2. N. Koibuchi, S. Matsuzaki, T. Kitani, H. Fujisawa and M. Suzuki : Localization by Immunohistochemistry of Renal Ornithine Decarboxylase in the Mouse with and without Testosterone Treatment, *Endocrinol. Japon* 37, (1990)

(2) 口頭発表

1. 船越洋、奥野幸子、木谷隆子、藤澤仁 : 3つの多機能性蛋白質磷酸化酵素によるチロシン水酸化酵素のセリン40の磷酸化が酵素活性に与える影響について、第64会日本生化学会大会、1991年10月

(3) 出版物

1. 石田敦彦、木谷隆子、藤澤仁 : カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II、*実験医学* 9, (1991)

研究成果

(1) アンチザイムインヒビターの研究

オルニチン脱炭酸酵素の特異的な活性阻害蛋白質であるアンチザイムの作用を特異的に抑制するアンチザイムインヒビターの報告は、オルニチン脱炭酸酵素活性の複雑な調節系の存在を考えさせ多くの研究者の注目を集めたが、アンチザイムインヒビターの性質を十分に捉えることが困難であったために果たして実在するのかどうか疑問視されてきた。そこで私はすでに精製に成功していたアンチザイムのアフィニティークロマトを用いてアンチザイムインヒビターを特異的に単離することを計画した。ラットの肝臓から精製したアンチザイムでウサギを免疫して調製したアンチザイムの抗体を介してプロテインA-セファロースにアンチザイムを結合させ、このアンチザイムのアフィニティークラムを利用して、アンチザイムインヒビターをラットの肝臓から1700万倍精製することに成功した。こうして精製したアンチザイムインヒビターは分子量ほぼ5万1千のシングルポリペプチドであった。アンチザイムと特異的に結合するアンチザイムインヒビターが、不活性化したオルニチン脱炭酸酵素（オルニチン脱炭酸酵素の分子量は約5万3千）であるという可能性は、オルニチン脱炭酸酵素の抗体がアンチザイムインヒビターと反応しないという実験結果によって否定された。以上の結果は、オルニチン脱炭酸酵素の活性調節系の1つとして、アンチザイム/アンチザイムインヒビター系があることを示すものである。

(2) テストステロン投与による腎臓オルニチン脱炭酸酵素の活性変動

ラット肝臓より精製したオルニチン脱炭酸酵素でウサギを免疫して得た抗体を用いて、アンドロゲン投与してオルニチン脱炭酸酵素活性を約6倍上昇させたマウス腎臓のオルニチン脱炭酸酵素の蛋白量を測定したところ、アンドロゲン投与しない対照マウスの腎臓と有意な差が認められず、アンドロゲン投与によるオルニチン脱炭酸酵素活性の上昇は、酵素量の増加によるものではなく酵素の活性化によるものであると思われた。

(3) オルニチン脱炭酸酵素活性とシグナルトランスダクション系に関する研究

オルニチン脱炭酸酵素の活性は生体や細胞の様々な環境変化や、細胞に与えられる種々の刺激などによって著明に変動し、細胞の情報伝達系に応答して変動する可能性が考えられた。そこで細胞内情報伝達に重要な働きをしているサイクリックAMP依存性蛋白質磷酸化酵素、プロテインキナーゼC、カルシウム/カルモデュリン依存性蛋白質磷酸化酵素II、の3つの代表的なセカンドメッセンジャーに応答する多機能性蛋白質磷酸化酵素によって活性が調節されていないかどうかについて *in vitro* で調べた。サイクリックAMP依存性蛋白質磷酸化酵素の触媒サブユニットをウシの心筋から、プロテインキナーゼCとカルモデュリン依存性蛋白質磷酸化酵素IIをラットの脳から、それぞれ純粋に精製して、ラットの肝臓から精製したオルニチン脱炭酸酵素と蛋白質磷酸化条件下でインキュベーションして磷酸化を検討したが、いずれの場合もオルニチン脱炭酸酵素の有意な磷酸化は認められなかった。