

氏名(本籍)	西田利穂(広島県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第236号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	ウマの筋肉型炭酸脱水酵素(CA-Ⅲ)に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 藤岡富士夫 (副査) 教授 田中享一 教授 古泉 巖 教授 藤谷英男

論文内容の要旨

炭酸脱水酵素(以下CAと略す)は1933年, Meldrum及びRoughtonによって発見された, 亜鉛を含み $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ の可逆反応を触媒する金属酵素である。CAは CO_2 の運搬や酸塩基平衡に役立っている酵素であり, ウマにおいては, Deutschらにより赤血球中からCA-IとCA-IIの二種類のアイソザイムが精製され報告されている。CAの第3番目のアイソザイムであるCA-Ⅲに関する研究は, Koesterらが1977年にウサギの筋肉から精製したpeak XがCA活性を持つことを報告したのに端を発した。現在までにウマのCA-Ⅲに関する報告はなされておらず, 本論文ではウマの筋肉からのCA-Ⅲの精製方法と結晶化方法について報告した。そして, 精製したCA-Ⅲの生化学的, 物理化学的, 免疫化学的, 免疫組織化学的性状の分析結果に加え, 一次構造の解析, 化学修飾による影響について検討を行いCA-Ⅲの性状を明確にした。更に, CA-Ⅲの微量測定法を開発し獣医臨床領域への応用を試みた。それらの結果について要約すると下記のごとくである。

1. CA-Ⅲの精製と結晶化

精製にはポニーの中臀筋を用い, トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)を加えてホモジネートを作成した。遠心分離後, 上清をヨードアセトアミドを用いてアルキル化を行った。次に, CMセファローズCL-6Bを用いて筋肉抽出液の陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。吸着した蛋白質は塩濃度を直線的に上昇させることにより溶出した。そして, CA活性の存在する溶出分画をセファデックスG-75でゲル濾過を行い, つづいてカラム等電点電気泳動を行なった。その結果CA-Ⅲは等電点8.9の分画で精製された。精製したCA-Ⅲは澱粉ゲル電気泳動, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一の蛋白質であることを証明した。精製したCA-Ⅲをウサギへ免疫することによりCA-Ⅲに対する抗体のみを作成することができた。上記の方法で精製したCA-Ⅲは60%硫酸を含む0.05 M トリス緩衝液(pH 8.6)で平衡化し, 硫酸濃度を62%に上昇させ温度を室温から4℃へ徐々に下げることにより結晶を得た。CA-Ⅲの多形であるCA-Ⅲaは, 同じ方法で精製することができた。1 kgの筋肉を用いてCA-Ⅲは約300 mg, CA-Ⅲaは約15 mgが精製された。CA-ⅢはCA-I, CA-IIと異なり, サルファマイドをリガンドとしたアフィニティークロマトでは精製されなかった。

2. CA-Ⅲの物理化学的性状

CA-Ⅲ, CA-Ⅲaの分子量は共にゲル濾過法で27,000, SDS-PAGEで26,500と推定され, 単量体の酵素蛋白質であった。

CA-Ⅲの極大吸収は280 nmにあり, 1%溶液の吸光度は280 nmの波長において15.5と算出された。等電点は, CA-Ⅲが8.9, CA-Ⅲaは8.1であった。亜鉛の含有量を測定した結果, およそ1分子のCA-Ⅲ中に1原子の亜鉛が存在した。

3. CA-Ⅲの生化学的性状

ウマのCA-Ⅰ, CA-Ⅱ, CA-Ⅲ, CA-ⅢaのCO₂水和活性を測定し比較した結果CA-Ⅲの値はCA-Ⅰの1/7, CA-Ⅱの1/74であった。CA-ⅢaはCA-Ⅲの1/2.6であった。エステラーゼ活性については, 活性の高い順にCA-Ⅱ, CA-Ⅰ, CA-Ⅲであった。酸性フォスファターゼ活性は, 3種のアイソザイムにおいてはほぼ等しく, アルカリフォスファターゼ活性はCA-Ⅲのみ存在した。CA-ⅢのCO₂水和活性は60°C, 5分間の加熱で活性を失ったが, エステラーゼ活性については100°C, 5分間の加熱でも失活しなかった。

アミノ酸分析の結果, CA-Ⅲのアミノ酸総数は257残基であった。システインは4残基含まれており, その内の2残基は分子表面に存在し残りの2残基は分子内に埋もれた状態で存在していた。CA-Ⅲaに関してはアミノ酸組成はCA-Ⅲに非常に類似しており, 4残基のシステインのうち内部に埋もれた2つのシステイン残基の一方にグルタチオンが結合していることを示唆した。CA-Ⅲのアミノ酸組成の特徴は, システインとアルギニンの数においてCA-Ⅰは1個と6個, CA-Ⅱは1個と9個であるのに対し, CA-Ⅲでは4個と14個とそれぞれの数が多いことであった。

4. CA-Ⅲの免疫化学的性状

抗ウマCA-Ⅲ血清を用いたオクタロニー法では, ウマのCA-Ⅰ, CA-Ⅱとは沈降線を形成せずCA-Ⅲのみと一本の沈降線を形成した。更に, CA-Ⅲaとも一本の沈降線を形成した。ウマの各種臓器抽出液を用いてオクタロニー法を行った結果, CA-Ⅲと同一の明瞭な沈降線を形成したのは筋肉と肝臓の抽出液であった。更にウマの胸腺とは弱い沈降線を形成した。

CA-Ⅲの種特異性を検索した結果, ウシ, イヌ, ネコ, ラットの筋肉抽出液と抗ウマCA-Ⅲ血清との間にスパーを形成する沈降線が観察された。

一方, 肝臓ではウシ, ブタ, ネコ, ラット(雄)との間にもスパーが出現する沈降線を認めた。ウサギ, ニワトリの筋肉と肝臓とは沈降線を形成しなかった。

5. ウマの各種臓器のCA-Ⅲ含有量

サンドイッチ法による酵素免疫測定法を確立しCA-Ⅲの定量を行った結果, 臓器湿重量1g当りの筋肉では530 μg, 肝臓では300 μg, 胸腺で16.5 μgであった。その他の臓器では, 平均57.3ngと極めて低値であった。赤血球中には, ヘモグロビン1g当り319.2ng存在した。この値は, 赤血球中に存在するCA-Ⅰの1/41,692, CA-Ⅱの1/5,549であった。

6. CA-Ⅲの組織局在性

ウマ筋肉の組織切片を作製し, ペルオキシダーゼ標識抗ウマCA-Ⅲ血清を用いる直接法で筋線維中のCA-Ⅲを染色した。その結果, 強く染色される線維と淡く染色される線維, そして染色されない線維が確認

された。強く染色される線維の割合が少ないことからCA-Ⅲは赤筋線維に局在すると考察した。

7. CA-Ⅲのペプチドマップ

CA-Ⅲをトリプシンで分解し、ペプチドマップを作製すると26個のペプチドが検出された。各ペプチドを抽出してアミノ酸分析を行った結果、リジンを含むペプチドは13個、アルギニンを含むペプチドは12個であった。1個のペプチドは両者を含んでいた。CA-Ⅲをシトラコニール化しトリプシンで分解した場合、リジンのC末端が切断されないため15個のペプチドが検出された。CA-Ⅲaのペプチドマップは、グルタチオンが結合していると推定されるペプチドの1個が消失した以外はCA-Ⅲと同じであった。

8. CA-Ⅲのアミノ酸配列

アミノ酸配列の決定は、CA-Ⅲをペプチドに分解し、精製したペプチドをシーケンサーにより自動Edman分解を行い、N末端からのアミノ酸の同定はHPLCで行った。CA-Ⅲの分解は、ブロムシアン、トリプシン、キモトリプシンを用いて行った。その結果ウマのCA-Ⅲの一次構造は259残基中の92%を決定することができた。ウマCA-Ⅲアミノ酸配列は、CA-Ⅰと55.3%、CA-Ⅱとは57.3%の類似性があり、ウシCA-Ⅲとは86.6%が等しかった。CA-Ⅲの活性中心は、他のCAアイソザイムと同様に、94番、96番、119番に位置するヒスチジンであることを推察した。さらに、64番目の活性に関与するアミノ酸がアルギニンであることがCA-Ⅲの活性の低い原因と考察した。

9. CA-Ⅲの化学修飾

p-ニトロフェノールブチレートを用いてCA-Ⅲをアセチル化した結果リジン残基のみが修飾された。アセチル化されるリジンが増えるにつれ等電点は低下し、酵素活性も低下することが認められた。CAの阻害剤として報告されたカルバミルリン酸を用いるとCA-Ⅲのリジンがカルバミル化されることを認めた。カルバミル化されるリジンが増加するにつれ、等電点が低下し酵素活性も低下した。

10. ウマ血清中のCA-Ⅲ値

酵素抗体測定法でウマ血清中のCA-Ⅲを測定した。今回用いたウマ血清中の値は、安静時においては0~27ng/mlであった。競走用サラブレッドにおいては、トレーニング後には最高で84ng/mlに上昇したのも認められた。一頭のウマについては、安静時においても1,380ng/mlと非常に高い値を示したことから、なんらかの筋疾患の存在を推察した。これらのことから、CA-Ⅲの測定は運動生理学の領域や筋疾患の診断に興味ある成績を与えるものと考察した。

論文審査の結果の要旨

炭酸脱水酵素（以下CAと略す）は1933年、Meldrum及びRoughtonによって発見された亜鉛を含む金属酵素で $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ の可逆反応を触媒し生物界（細菌、藻類、酵母、苔類、植物、動物）に広く存在するアイソザイムであることが最初に報告された酵素である。

このアイソザイムは、当初CA-ⅠとCA-Ⅱの二種類のみで、CA-ⅠはCA-Ⅱに比べて CO_2 水和活性、エステラーゼ活性の低活性型で、ほ乳動物では主として赤血球中に存在し、 CO_2 の運搬や、酸塩基平衡に役立っている酵素である。

その後、1977年にKoesterがウサギの筋肉から第3番目のCA-Ⅲを発見し報告している。更に、Holmes(1977)はヒツジの筋肉とニワトリの肢筋から、Shimaその他らはウシおよびヒトの骨格筋からCA-Ⅲを

検出し報告している。

ウマのCA-Ⅲに関する報告はこれまで全くなく、著者は Deutsch 博士の指導によりウマの筋肉(中臀筋)からCA-Ⅲを抽出し、これを精製して独自の方法で結晶化に成功した。更にこの精製したウマの筋肉型であるCA-Ⅲを生化学的、物理化学的、免疫化学的、免疫組織化学的に詳細に実験検討し、その結果を論述している。

その大要は次の如くである。

1. CA-Ⅲの精製と結晶化

CMセファローズ CL-6B を用いて筋肉抽出液の陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。そして、CA活性の存在する溶出画分をセファデックス G-75 でゲル濾過を行い、つづいてカラム等電点電気泳動を行なった結果CA-Ⅲは等電点 8.9 の画分で精製された。精製したCA-Ⅲは澱粉ゲル電気泳動、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一の蛋白質であることを証明した。精製したCA-Ⅲをウサギへ免疫することによりCA-Ⅲに対する抗体のみを作製することができた。上記の方法で精製したCA-Ⅲは60%硫酸を含む0.05M トリス緩衝液(pH 8.6)で平衡化し、硫酸濃度を62%に上昇させ温度を室温から4℃へ徐々に下げることにより結晶を得た。CA-Ⅲの多形であるCA-Ⅲaは、同じ方法で精製することができた。1kgの筋肉を用いてCA-Ⅲは約300mg、CA-Ⅲaは約15mgが精製された。

2. CA-Ⅲの物理化学的性状

CA-Ⅲ、CA-Ⅲaの分子量は共にゲル濾過法で27,000、SDS-PAGEで26,500と推定され、単量体の酵素蛋白質であった。

CA-Ⅲの極大吸収は280nmにあり、1%溶液の吸光度は280nmの波長において15.5と算出された。等電点は、CA-Ⅲが8.9、CA-Ⅲaは8.1であった。亜鉛の含有量を測定した結果、およそ1分子のCA-Ⅲ中に1原子の亜鉛が存在した。

3. CA-Ⅲの生化学的性状

ウマのCA-I、CA-II、CA-Ⅲ、CA-ⅢaのCO₂水和活性を測定し比較した結果CA-Ⅲの値はCA-Iの1/7、CA-IIの1/74であった。CA-ⅢaはCA-Ⅲの1/2.6であった。エステラーゼ活性については、活性の高い順にCA-II、CA-I、CA-Ⅲであった。酸性フォスファターゼ活性は、3種のアイソザイムにおいてはほぼ等しく、アルカリフォスファターゼ活性はCA-Ⅲのみ存在した。CA-ⅢのCO₂水和活性は60℃、5分間の加熱で活性を失ったが、エステラーゼ活性については100℃、5分間の加熱でも失活しなかった。

アミノ酸分析の結果、CA-Ⅲのアミノ酸総数は257残基であった。システインは4残基含まれており、その内の2残基は分子表面に存在し残りの2残基は分子内に埋もれた状態で存在していた。CA-Ⅲaに関してはアミノ酸組成はCA-Ⅲに非常に類似しており、4残基のシステインのうち内部に埋もれた2つのシステイン残基の一方にグルタチオンが結合していることを示唆した。CA-Ⅲのアミノ酸組成の特徴は、システインとアルギニンの数においてCA-Iは1個と6個、CA-IIは1個と9個であるのに対し、CA-Ⅲでは4個と14個とそれぞれの数が多いことであった。

4. CA-Ⅲの免疫化学的性状

抗ウマCA-Ⅲ血清を用いたオクタロニー法では、ウマのCA-I、CA-IIとは沈降線を形成せずCA-Ⅲ

のみと一本の沈降線を形成した。更に、CA-Ⅲaとも一本の沈降線を形成した。ウマの各種臓器抽出液を用いてオクタロニー法を行った結果、CA-Ⅲと同一の明瞭な沈降線を形成したのは筋肉と肝臓の抽出液であった。更にウマの胸腺とは弱い沈降線を形成した。

CA-Ⅲの種特異性を検索した結果、ウシ、イヌ、ネコ、ラットの筋肉抽出液と抗ウマCA-Ⅲ血清との間にスパーを形成する沈降線が観察された。

一方、肝臓ではウシ、ブタ、ネコ、ラット（雄）との間にもスパーが出現する沈降線を認めた。ウサギ、ニワトリの筋肉と肝臓とは沈降線を形成しなかった。

5. ウマの各種臓器のCA-Ⅲ含有量

サンドイッチ法による酵素免疫測定法を確立しCA-Ⅲの定量を行った結果、臓器湿重量1g当りの筋肉では530 μ g、肝臓では300 μ g、胸腺で16.5 μ gであった。その他の臓器では、平均57.3ngと極めて低値であった。赤血球中には、ヘモグロビン1g当たり319.2ng存在した。この値は、赤血球中に存在するCA-Iの1/41,700、CA-IIの1/5,500であった。

6. CA-Ⅲの組織局在性

ウマ筋肉の組織切片を作製し、ペルオキシダーゼ標識抗ウマCA-Ⅲ血清を用いる直接法で筋線維中のCA-Ⅲを染色した。その結果、強く染色される線維と淡く染色される線維、そして染色されない線維が確認された。強く染色される線維の割合が少ないことからCA-Ⅲは赤筋線維に局在すると考察した。

7. CA-Ⅲのペプチドマップ

CA-Ⅲをトリプシンで分解し、ペプチドマップを作製すると26個のペプチドが検出された、各ペプチドを抽出してアミノ酸分析を行った結果、リジンを含むペプチドは13個、アルギニンを含むペプチドは12個であった。1個のペプチドは両者を含んでいた。CA-Ⅲをシトラコニール化しトリプシンで分解した場合、リジンのC末端が切断されないため15個のペプチドが検出された。CA-Ⅲaのペプチドマップは、グルタチオンが結合していると推定されるペプチドの1個が消失した以外はCA-Ⅲと同じであった。

8. CA-Ⅲのアミノ酸配列

アミノ酸配列の決定は、CA-Ⅲをペプチドに分解し、精製したペプチドをシークエンサーにより自動Edman分解を行い、N末端からのアミノ酸の同定はHPLCで行った。CA-Ⅲの分解は、ブロムシアン、トリプシン、キモトリプシンを用いて行った。その結果ウマのCA-Ⅲの一次構造は259残基中の92%を決定することができた。ウマCA-Ⅲのアミノ酸配列は、CA-Iと55.3%、CA-IIとは57.3%の類似性があり、ウシCA-Ⅲとは86.6%が等しかった。CA-Ⅲの活性中心は、他のCAアイソザイムと同様に、94番、96番、119番に位置するヒスチジンであることを推察した。さらに、64番目の活性に関与するアミノ酸がアルギニンであることがCA-Ⅲの活性の低い原因と考察した。

9. CA-Ⅲの化学修飾

p-ニトロフェノールブチレートを用いて、CA-Ⅲをアセチル化した結果リジン残基のみが修飾された。アセチル化されるリジンが増えるにつれ等電点は低下し、酵素活性も低下することが認められた。CAの阻害剤として報告されたカルバミルリン酸を用いるとCA-Ⅲのリジンがカルバミル化されることを認めた。カルバミル化されるリジンが増加するにつれ、等電点が低下し酵素活性も低下した。

10. ウマ血清中のCA-Ⅲ値

酵素抗体測定法でウマ血清中のCA-Ⅲを測定した。今回用いたウマ血清中の値は、安静時においては0~27ng/mlであった。競走用サラブレッドにおいては、トレーニング後には最高で84ng/mlに上昇したのも認めた。一頭のウマについては、安静時においても1,380ng/mlと非常に高い値を示したことから、なんらかの筋疾患の存在を推察した。これらのことから、CA-Ⅲの測定は運動生理学の領域や筋疾患の診断に興味ある成績を与えるものと考察した。

前述のように、著者はこれまで究明し得なかったウマの筋肉型炭酸脱水酵素であるCA-Ⅲを確認し、更にこれを精製して、このCA-Ⅲを硫酸を含むトリス緩衝液中で結晶化に成功している。なお、CA-Ⅲの多形であるCA-Ⅲaをも精製している。

この精製したウマの筋肉型であるCA-Ⅲの生化学的性状、物理化学的性状、免疫化学的性状、組織局在性、ペプチドマップ、アミノ酸配列、化学的修飾および各種臓器のCA-Ⅲ含有量などについて詳細に論及している。

なお、ウマの血清中のCA-Ⅲ値を測定し、筋疾患の存在、運動生理学の領域などに興味ある成績を与えるものと推察している。

したがって、この研究業績は獣医学上寄与するところがまことに大であり、獣医学博士の学位を授与するにふさわしいものと高く評価する。