HPLCによるアルギニル転移酵素活性測定法の開発とその応用

高尾浩一

HPLCによるアルギニル転移酵素活性測定法の開発とその応用

高尾浩一

目次

総論の部

緒言 …… 1

第一章　酵素的アルギニル転移反応の阻害 …… 5
第一節　ポリアミンアナログによる阻害と活性化 …… 5
第二節　非ペプチド性低分子化合物による阻害 …… 6
第三節　小括ならびに考察 …… 10

第二章　蛍光性基質の開発 …… 11
第一節　蛍光性化合物のデザイン …… 11
第二節　蛍光性化合物の合成とHPLCによる分離 …… 12
第三節　蛍光性化合物のアルギニン受容活性 …… 13
第四節　小括ならびに考察 …… 14

第三章　蛍光性基質を用いる酵素活性測定法の開発 …… 16
第一節　Km値の測定 …… 16
第二節　ラジオアイソトープ法との比較 …… 17
第三節　加水分解酵素による基質及び生産物の分解 …… 18
第四節　加水分解酵素共存下での活性測定 …… 20
第五節　小括ならびに考察 …… 22

第四章　ラット組織中におけるアルギニル転移酵素活性の測定 … 24
第一節　粗抽出液中における活性測定の検討 …… 24
第二節　組織中の酵素活性 …… 25
第三節　小括ならびに考察 …… 26

総括 …… 29
謝辞 …… 30
実験の部 …… 31
引用文献 …… 48

総論の部

緒言

アルギニル転移酵素（アルギニル-tRNA：タンパク質転移酵素、EC2.3.2.8）は、N末端に酸性アミノ酸を持つ蛋白質又はペプチドのα-アミノ基に、アルギニル-tRNAを基質として、そのアルギニンを転移する酵素である（Chart 1）。[1-3]



Chart 1　Arginyltransfer reaction

本酵素は、真核生物である酵母から哺乳動物の細胞質ゾル中に幅広く存在し、翻訳後修飾（post-translational modification）を行う酵素の一種であり、細胞質中に存在する基質タンパク質のリソソーム酵素によらない分解に関与するのではないかと考えられている。プロテアーゼによる細胞内タンパク質の分解において、そのタンパク質に寿命を決定する何らかのシグナルがあると考えられているが定説はない。現在のところ、そのシグナルが高次構造、電荷、疎水性などタンパク質全体の物理化学的性質にあるという考え方と、局所的なアミノ酸配列、ドメイン、リン酸化などの化学修飾、末端アミノ酸などタンパク質の一部の配列で決定されるという考え方とがある。後者について、タンパク質のアミノ酸配列中にPro-、Glu-、Ser-、Thrのような4種のアミノ酸に富んだ配列を含むとユビキチン-プロテアソーム系により認識され速やかに分解されるという PEST 仮説、[4] および同様に速やかに分解されるペプチドモチーフも酸つ

か報告されている。[10] また、N末端アミノ酸残基が塩基性に富むものや疎水性に富むものであれば分解されやすいという N末端則[5]や、N末端から二番目、三番目のアミノ酸がシグナルになるという説などが知られている（Fig.1）。[6]

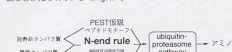


Fig.1 細胞内タンパク質の分解経路

このようなタンパク質分解において、アルギニル転移酵素はN末端則に従うタンパク質分解に関与しているらしいことは、酵母を用いた遺伝子組み替え実験の結果から推察された（Fig.2）。[6] 即ち、N末端を種々のアミノ酸に改変したβ-ガラクトシダーゼを酵母で発現させ、菌体内における半減期を調べると、N末端にアルギニンを持つものが最も速く分解されること、また、アルギニル転移酵素の基質となるN末端にアスパラギン酸やグルタミン酸を持つもの、及び脱アミド化されてアスパラギン酸やグルタミン酸になるアスパラギン、グルタミンをN末端に持つものも速く分解されることがわかり、実際に酵母内のアルギニル転移酵素が関与していることを示唆する実験結果が報告されている。[10,11] しかし、本酵素の生理的基質が発見されていないことや、N末端則そのものが酵母における遺伝子組み替え実験の結果を根拠としていることから、哺乳動物細胞にそれを適用できるかは不明である。また、酵母における本酵素遺伝子の欠損が増殖に対し影響を及ぼさないという報告もあり、[9] その生理的意義については今後の研究に待つところが大である。

N-terminal amino acid	half-life (min)	N-terminal amino acid	half-life (min)
Arg	2	Cys	>1200
Lys	3	Ala	>1200
Phe	3	Ser	>1200
Leu	3	Thr	>1200
Trp	3	Gly	>1200
Tyr	10	Val	>1200
His	3	Pro	>1200
Ile	30	Met	>1200
Asp	3		
Glu	30		
Asn	3		
Gln	10		

Fig.2 Half-lives of gene-manipulated β-galactosidase having various N-terminal amino acids in yeast

これまで、本酵素に関する研究には、ラジオアイソトープ（^{14}C-, ^{3}H-標識アルギニン）とタンパク基質（牛α-ラクトアルブミン、遺伝カルボキシメチル化牛血清アルブミン）を用いるペーパーディスク法が活性測定法として利用されてきている。[12,13] しかし、この活性測定法を精製度の低い試料に適用すると、試料中に混入してくる内在性基質の影響や、活性測定に用いるタンパク基質の分解、およびそのアルギニル化体がさらに分解され易くなる可能性などが考えられた。

そこで、本研究では タンパク基質を使用せずに低分子基質化合物を使用し、ラジオアイソトープに匹敵する感度が期待できる蛍光を利用したより信頼性の高い活性測定法の開発を目的として研究を行った。以下、第一章では、種々の低分子化合物による本酵素反応の阻害性から活性部位構造の概観を推察した結果について、第2章では、その情報を参考にして蛍光性基質をデザイン、合成した結果について、第3章には、新たに開発した蛍光性基質を用いる活性測定法に

ついて、第4章には、開発した方法によりラット各種組織ホモジネートの105,000g上清中に存在する本酵素活性を測定した結果について記す。[13-15]

これまで、アルギニル転移酵素によるアルギニル転移反応を阻害する化合物として、競合的阻害を示す種々のペプチド[16]、不可逆的な阻害を示すphenyl arsenoxide[17]、そのほかに、ヘパリンやポリアミン[18]、さらにセリンプロテアーゼ阻害剤[19]などが報告されている。

これら化合物の中で、セリンプロテアーゼ阻害剤は、tRNAのアルギニル化を阻害することによりアルギニル転移反応を阻害することが報告されており、また、phenylarsenoxide による阻害は、酵素に存在する隣接したSH基に反応し不活化させることが最近報告された。[20]

本章では、基質開発のための活性部位構造の推測を目的として、競合的阻害を示す化合物を対象にすることとした。そのために阻害性ペプチドの中で最も効果が強く、基質性もあることが知られているGlu-Val-Pheに着目し、この構造から、酸性アミノ酸のα-カルボキシル基に疎水性基を導入した低分子化合物を種々合成し、それら化合物の阻害効果を検討した。なお、これまでに報告されているポリアミンの効果をポリアミンアナログも含めて再検討し、得られた結果を初めに記す。

第一節　ポリアミンアナログによる阻害と活性化

ポリアミンは、生物界に広く存在する塩基性低分子化合物であり、代表的なものに、プトレシン（Put）、スペルミジン（Spd）、およびスペルミン（Spm）がある。これまで、これら3種のポリアミンによるアルギニル転移反応への効果については、低濃度ではむしろ活性化することが報告されており、そのようなポリアミンの挙動が

3種ポリアミンに限られるのかどうかを確かめるために、種々のポリアミンアナログを用い、転移反応に対する効果を検討した。効果を検討するための活性測定系は、酵素試料としてブタ胃粗抽出ピドロキシアパタイト処理酵素分画を使用し、^{14}Cアルギニンとα-ラクトアルブミンを用いるペーパーディスク法により行った。対照の活性を100%として得られた結果をTable 1に示す。表中化合物の略号は、（例）に示すように、ポリアミンおよびポリアミンアナログの構造を、アミノ基間のメチレン鎖の数で表した。

Table 1 Effects of polyamines on arginyltransferase activity

Compound	concentration(mM) 0.1	1	10
Put	116	105	88
Spd	136	101	55
Spm	111	125	42
333	118	91	41
353	120	93	36
Et343Et	101	109	48
3(3)3	103	103	60

Compound	concentration(mM) 0.1	1	10
4334	110	96	22
3443	122	88	20
Et4334Et	109	85	24
Et3443Et	107	91	11
34343	112	75	7

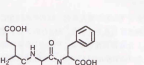
(Control activity=100)

略号（例）333：$H_2NCH_2CH_2NHCH_2CH_2CH_2NH_2$
3(3)3：$NCH_2CH_2CH_2NH_2$

Table 1に示すように、ポリアミンの生理的濃度に近い0.1mMでは、報告されているように、ほとんどの化合物で阻害よりはむしろ活性化効果が認められ、10mMでは顕著な阻害効果が認められた。

第二節　非ペプチド性低分子化合物による阻害

これまでに報告されている阻害剤の中で、アルギニル転移酵素活性を最も強く阻害するトリペプチドGlu-Val-Pheの構造をFig.3に示す。



Glu-Val-Phe

Fig.3 Inhibitor of arginyltransferase

このように、本化合物はN末端酸性アミノ酸としてグルタミン酸を持ち、それに疎水性アミノ酸が結合していることから、酵素の活性部位に親和性を持たせるためには、N末端にL-アスパラギン酸（Asp）またはL-グルタミン酸（Glu）を持ち、そのα-カルボキシル基に疎水性グループを導入した化合物が有効であろうと考えられた。そこで、種々化合物を合成してその阻害効果を検討した（Table 2）。表中の数値は、阻害率（%）を示している。

Table 2 Inhibition of arginyltransferase activity with L-aspartyl or L-glutamyl compounds containing hydrophobic groups

Compound	concentration (mM) 0.1	1
Glu-Val-Phe	n.s.	23
b. Asp-NH-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3	n.s.	29
c. Asp-NH-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3	n.s.	31
d. Asp-NH-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3	n.s.	26
e. Asp-NH-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3	n.s.	26
f. Asp-NH-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3	25	59
g. Asp-NH-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3	n.s.	26
h. Asp-NH-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3	n.s.	20
i. Asp-NH-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3	25	59
j. Asp-NH-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3	43	91

n.s. negligible small

メチレン鎖長の増加やフェニル基の導入、また、フェニル基の代

わりにナフチル基の導入など、疎水性の増加に伴い阻害効果は上昇する傾向が見られた。また、Aspとのアミド結合の隣りに不斉炭素を導入した立体異性体では、D体よりS体の効果の方が強いことがわかった（Compound 11-14）。今回調べた化合物の中で最も強く本酵素活性を阻害したのはL-aspartic acid α-((s)-(-)-naphthylethylamide)［Asp(S)NEA］（Compound 12）で、Glu-Val-Pheよりも強い効果を示した。

次に、Asp(S)NEAのAsp部分を種々変更した化合物を合成し、その阻害効果を検討した（Table 3）。その結果、AspをD-アスパラギン酸やピログルタミン酸に代えると効果が無くなることがわかった。また、Aspのアミノ基やカルボキシル基を保護基で保護した誘導体の阻害効果は著しく減少した。

Table 3 Inhibition of arginyltransferase activity with Asp(S)NEA derivatives modified at L-aspartyl moiety

Compound	Inhibition (%) 1 mM	Compound	Inhibition (%) 1 mM
12: Asp-NH-CH(CH3)-Naph	43 91	18: Asp-O(tBu)-NH-CH(CH3)-Naph	n.a. 26
13: D-Asp-NH-CH(CH3)-Naph	n.s. n.s.	19: Ac-Asp-NH-CH(CH3)-Naph	n.a. 17
14: PyroGlu-NH-CH(CH3)-Naph	n.s. n.s.	20: Suc-NH-CH(CH3)-Naph	n.a. 10
17: Boc-Asp-(OBzl)-NH-CH(CH3)-Naph	n.d. 16		

n.s. negligibly small

次に、最も強い阻害効果を示したAsp(S)NEAの阻害機構について検討した。Fig.4のLineweaber-Burk plotから、競合的阻害であることがわかり、Kiは値140μMであった。

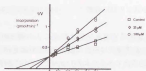


Fig.4 Competitive inhibition of arginyltransferase activity by Asp(S)NEA

この阻害機構から、Asp(S)NEAが活性部位に入り基質としても働く可能性が考えられたので、つぎにAsp(S)NEAの基質性を検討した。予め、Asp(S)NEAとArgAsp(S)NEAを用いて蛍光検出HPLC条件を設定した後、阻害実験に用いたインキュベーション液中の^{14}C-アルギニン、α-ラクトアルブミンをそれぞれ^{14}C-アルギニン、Asp(S)NEAにかえてインキュベーションした結果、若干ではあるが基質性が認められた（Fig.5）。



Fig.5 Time-dependent increase of ArgAsp(S)NEA

第三節　小活ならびに考察

ポリアミン及びポリアミンアナログにより得られた結果は、10mMのような高濃度では確かに顕著な阻害効果を示したが、ポリアミンの生理的濃度であるおよそ0.1mMでは活性化効果を示した。このような挙動はポリアミンに共通と考えられ、ポリアミンの役割としては、RNAやDNAに吸着してポリペプチド合成を促進したり[22-24]、種々酵素活性に影響を与えることなどから考えて、アルギニル転移酵素によるアルギニル-tRNAの認識やtRNAの構造安定化などに広く影響しているものと考えられる。従って、ポリアミンの阻害効果からは、本酵素の活性部位に関する情報は得られなかった。

一方、非ペプチド性低分子化合物を用いた阻害効果の検討から、本酵素の活性部位には、N末端酸性アミノ酸を認識する部位とその近傍に疎水性空間が存在すると考えられた。酸性アミノ酸認識部位は、L型アミノ酸のアミノ基とカルボキシル基をそれぞれ認識しており、比較的大きいと思われる疎水性空間はN末端アミノ酸とアミド結合した隣の不含炭素を認識するような方向性を持っていると考えられた。これらの結果を模式図にまとめFig.6に示す。

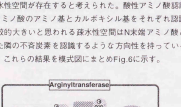


Fig.6　Possible interaction of arginyltransferase with its substrates

第二章　蛍光性基質の開発

第一章の結果から、Asp(S)NEAに基質性が認められたが非常に弱く、またその水溶性が極めて低いため、蛍光性基質として利用するための必要条件を満たしていなかった。そこで、本章ではFig.6の活性部位構造を参考にして、より良い蛍光性基質になることが期待される化合物のデザインと合成をはじめに行った。蛍光体としては比較的安定で強い蛍光性を示し、疎水性ではありながら水と親和性のあるジメチルアミノ基を有し生理的条件下でのトランスグルタミナーゼ反応にも利用されているダンシル化合物を選択した。[25] ついで、合成した化合物をHPLCで分離分析する条件を確立した後、実際の酵素反応によりそれら化合物が基質になるかどうかを検討した。

第一節　蛍光性化合物のデザイン

デザインした化合物の構造をFig.7に示す。このようにAspまたはGluを持ち、Fig.6に示したようにそれに続くアミド基の間りの不含炭素を本酵素が認識することを考えて、比較的自由度の高いメチレン鎖をアミド結合でダンシルグループとの間に介在させた化合物をデザインした。メチレン鎖長については、3,4,5を対象とし、全部で合計6種類の化合物を合成することにした。

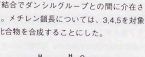


Fig.7　Design of compounds carrying danayl group

第二節　蛍光性化合物の合成とHPLCによる分離

デザインした蛍光性化合物の合成法は、N-L-asparyl-N'-dansyl-1,4-butanediamine（Asp(4)DNS）およびN-L-arginylasparyl-N'-dansyl-1,4-butanediamine（ArgAsp(4)DNS）を例としてChart 2に示した。

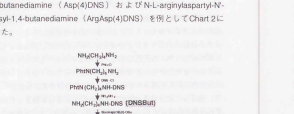


Chart 2 Synthetic routes of Asp(4)DNS and ArgAsp(4)DNS

まず、1,4-butanediamineの一方のアミノ基をフタロイル基で保護し、他方のアミノ基をダンシル化した後、保護基を常法により除去し、得られた4-dansylamidobutylamine（DNSBut）をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製した。ついで、tert-butyloxy-carbonyl-L-aspartic acid β-benzylesterの活性エステルを反応させ、生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した後、保護基を常法により順次除去しAsp(4)DNSを合成した。同様にして他の5種の化合物も合成した。また、合成中間体であるBocAsp-(OBzl)NH(CH$_2$)$_4$NHDNSのBoc基を除去した後、tribenzyloxy-carbonylarginineの活性エステルと反応させて得られる生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、接触還元により全ての保護基を除去してArgAsp(4)DNSを合成した。同様にしてArgGlu(4)DNSも合成した。

合成した蛍光性化合物の基質性を検討するためには、生成物であるアルギニル化体との分離分析法が必要である。そのために、合成標品を用いてそれらを10分以内で分離する蛍光検出HPLC条件を先ず設定した。Fig.8には、Asp(4)DNSおよびGlu(4)DNSおよびそれらのアルギニル化体が、DNSButも含めて設定した条件でそれぞれ良好に分離される様子を示した。

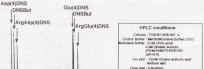


Fig.8 HPLC chromatograms of a series of aspartic acid or glutamic acid derivatives connected to DNSBut

第三節　蛍光性化合物のアルギニン受容活性

以上のように設定したHPLC条件を用いて、ラジオアイソトープ法で用いた反応液中のL-アルギニンおよびD-ラクトアルブミンをそれぞれL-アルギニンおよび基質性検討のための蛍光性化合物に

かえてインキュベーションし、それらのアルギニル化体が酵素的に生成するかどうかを調べた。その結果、Asp(4)DNSを例にしてFig.9左図に示すクロマトグラムからもわかるように、インキュベーション時間依存的にArgAsp(4)DNSピークが上昇し、Asp(4)DNSが本酵素の基質になることがわかった。他の5種の化合物についても同様にアルギニル化体の生成が認められ、いずれも基質になることがわかった。Fig.9の右図に6種化合物の基質性を比較した結果を示す。

この結果から、Asp結合型が、Glu結合型より基質性が良いことがわかり、メチレン鎖長は4のものが3や5よりも基質性が良いことがわかった。従って、以後の実験には、最も基質性の良かったAsp(4)DNSを用いることにした。

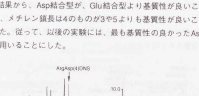


Fig.9 Enzymatic arginylation of the synthetic substrates with hydroxyapatite-treated enzyme preparation

第四節　小活ならびに考察

Asp(n)DNS、Glu(n)DNS（n=3,4,5）の全6種の基質様補化合物をデザイン、合成し、同時に想定されるアルギニル化体の標品ArgAsp(4)DNS、ArgGlu(4)DNSも合成し、検討した。合成各段階で得られる中間体の多くは、結晶化が困難で、カラムクロマトグラフィーによる精製が欠かせなかった。その際、シリカゲルカラムで、分離溶媒にCHCl$_3$-MeOH-AcOHを用いる系が各化合物の純化に有用であった。

ついで、合成標品を用いて、イオン対逆相HPLCで分離し蛍光検出により分析する条件を設定した後、酵素反応により実際にアルギニル化体が生成するかどうかを調べた結果、6種の化合物全てが基質になることがわかった。中でもAsp(4)DNSが最も良いアルギニン受容活性を示した。なお、D-Asp(4)DNSも合成し試したところ、アルギニン受容活性は全くないことが判明した。この結果は、第一章でも記したようにL-Aspが必須であることを再確認するとともに、基質性がないことを利用して、HPLCで分離できるD-Asp(n)DNSを定量のための内標として将来用いることが考えられた。

第三章　蛍光性基質を用いる酵素活性測定法の開発

本章では、蛍光性基質Asp(4)DNSを用い、AspのないDNSBulおよび生成物であるArgAsp(4)DNSの三者を同時に測定できるHPLCによる活性測定法を開発し、方法の感度、再現性などに関する基礎検討を行った後、組織の粗抽出液中の本酵素活性の測定を目指して種々検討を行った。

第一節　Km値の測定

Asp(4)DNSの本酵素に対するKm値の測定に先立ち、アルギニル-tRNAの再生系として反応液中に加えてある大腸菌からの部分精製aminoacyl-tRNA合成酵素分画中に、Asp(4)DNSおよびArgAsp(4)DNSを分解するような酵素の混入がないかどうかを、アルギニル転移酵素を除いた反応液にAsp(4)DNSあるいはArgAsp (4)DNSを加えて調べた結果をFig.10に示す。

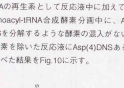


Fig.10 Slight elimination of arginine from ArgAsp(4)DNS with the preparation of aminoacyl-tRNA synthetases from E.coli, and inhibition of the elimination with bestatin

インキュベーション時間により Asp(4)DNSの分解は認められなかったが、ArgAsp (4)DNSはわずかに分解して Asp(4)DNSになることがわかった。これは、aminoacyl-tRNA合成酵素分画中にわずかながらアミノペプターゼ様酵素の混入があることを示しており、その影響を防ぐためにアミノペプターゼ阻害剤であるbestatinを加えたところ分解は抑制された。このようにbestatinが有用であることがわかったが、通常のインキュベーション条件下で、aminoacyl-tRNA合成酵素分画中に混入するアミノペプダターゼの影響は、ほとんど無視できる程度であることもわかった。

そこで、アルギニル転移酵素としては、Asp(4)DNSおよびArgAsp(4)DNSの分解が全く認められない、ヒトロキシアパタイト処理段階の精製酵素を用い、Km値を求める実験を行った。得られた結果をFig.11に示す。Km値はおよそ30uM、Vmax値はおよそ2pmol/min/mg であった。これらの値を参考にして、活性測定に用いる Asp(4)DNS の濃度を100μMにすることにした。

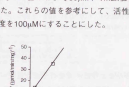


Fig.11 Lineweaver-Burk plot for the formation of ArgAsp(4)DNS from Asp(4)DNS

第二節　ラジオアイソトープ法との比較

^{14}C-アルギニンとα-ラクトアルブミンを用いるこれまでのラジオアイソトープ法と、今回設定した Asp(4)DNSを用いる蛍光HPLC法

とを比較することを目的として、ヒドロキシアパタイト処理した酵素分画を酵素試料として三段階に希釈し、それぞれについて活性測定を繰り返し行いその再現性を比較した（Table 4）。両者を比較するため、インキュベーション時間は15分に決め、ラジオアイソトープ法で測定に使用する100μlの反応液中の40μl分に含まれる生成物量に換算して、Table 4に⑥をとめた。なお、蛍光HPLC法では、100μlの反応液中の10μl相当量をカラムに注入して測定した。

Table 4 Reproducibilities of the isotope method and the fluorescent HPLC method[a]

	Hydroxyapatite treated enzyme preparation added (expressed as protein amount, ng well)					
	400		200		100	
	$\bar{x} \pm s$[b]	CV%	$\bar{x} \pm s$	CV%	$\bar{x} \pm s$	CV%
Isotope method	1.02 ±0.41	40.2	2.69 ±0.25	8.7	6.89 ±0.22	5.9
HPLC method	0.98 ±0.06	6.7	3.04 ±0.11	3.6	7.14 ±0.42	3.2

[a] Assay conditions for the incubation period of 15 min

[b] Average value ± standard deviation (n=5) expressed as pmol in 40 μl of the reaction mixture (100 μl).

表からわかるように、両者の$\bar{x}$値はほぼ一致していたが、蛍光HPLC法では、酵素の希釈倍率が増えてもCV値は7%以下であるのに対し、ラジオアイソトープ法では、最も希釈倍率の高い酵素試料を用いたときのCV値が40%と高く、定量限界に近いことを示した。この結果から、蛍光HPLC法が従来当研究室で使用してきたラジオアイソトープ法と比べて再現性、感度ともに良いことがわかった。

第三節　加水分解酵素による基質及び生産物の分解

つぎに、蛍光HPLC法を用いて精製度の低い試料中のアルギニル

転移酵素活性が測定できるかどうかを調べるために、ブタ腎臓の105,000g上清の透析試料（10SS）を使って、ArgAsp(4)DNSの生成を調べてみた。その結果、Fig.12に示すように、インキュベーション初期に若干のArgAsp(4)DNSの生成が認められたが、、インキュベーションを続けると消滅し、さらにAsp(4)DNSもインキュベーション初期から顕著に減少して、DNSButピークのみになる傾向が見られた。

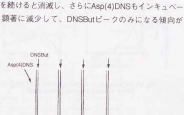


Fig.12 Hydrolysis of Asp(4)DNS during incubation with 10SS

そこで、この分解をさらに詳しく調べるために、反応液中のAsp(4)DNSの代わりにArgAsp(4)DNSを加えてその変化の様子を調べてみた（Fig.13）。Fig.13左図に示すように、インキュベーション時間に伴いArg Asp(4)DNSは速やかに分解する一方、Asp(4)DNSが一時的に増加し、それも速やかに減少し、DNSButになっていく様子が明瞭に見られた。同様な分解パターンは、10SSよりも精製度の進んだDEAE処理酵素分画を用いた場合でも認められ（Fig.13右図）、これら相酵素試料中にはArgAsp(4)DNSを段階的に加水分解してDNSButにするアミノペプチダーゼが存在し、直接ArgAspを

加水分解するジペプチジルペプチダーゼのような酵素の混入は余り考えなくても良いと思われた。

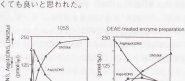


Fig.13 Hydrolysis of ArgAsp(4)DNS with 10SS and DEAE-treated enzyme preparation

第四節　加水分解酵素共存下での活性測定

前節の結果から、10SSのような粗酵素試料では直接活性測定はできないことが判明したが、ジペプチジルペプチダーゼの関与は無視できることからArgAsp(4)DNSのアルギニンの加水分解が阻止できれば活性測定が可能になると考えられた。そこで、市販のプロテアーゼやペプチダーゼの阻害剤の効果を調べた。使用したものは、セリンプロテアーゼ阻害剤（TPCK, TLCK, TAME, PMSF）、システインプロテアーゼ阻害剤（E64）、システイン、セリンプロテアーゼ阻害剤（leupeptin, chymostatin）、アミノペプチダーゼ阻害剤（cysteamine, bestatin, amastatin）などである。これらを活性測定用反応液に添加し種々検討した結果、アミノペプチダーゼ阻害剤であるbestatinおよびamastatinがArgAsp(4)DNSの分解を阻止することがわかった。しかし、いずれの阻害剤もAsp(4)DNSの分解は抑制

できず、DEAE処理酵素分画で使用したときにはbestatinの存在でむしろ分解が促進される傾向が見られた（Fig.14左図）。このときArgAsp(4)DNSの生成をみると（Fig.14右図）、bestatinを添加した場合、インキュベーション時間が短ければArgAsp(4)DNSの生成に直線的な上昇が認められた。この結果は、粗酵素試料中でも、bestatinを加えて短時間のインキュベーションにより酵素活性の測定が可能であることを示した。

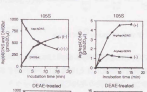


Fig.14 Effect of Bestatin on 10SS and DEAE-treated enzyme preparation

上記実験より、bestatinを加えてインキュベーションする標準活性測定法をFig.15にまとめた。インキュベーション時間は、0,3,5,7,10,15分間行い、短時間での直線性を確認しながら活性測定を行うことにした。

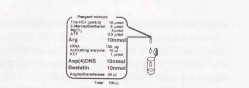


Fig.15 Standard assay procedure

次に、上記条件下でのArgAsp(4)DNSの直線的な上昇が実際に粗酵素試料中のアルギニル転移酵素活性を反映しているのかどうかを確認するために、105Aへの本酵素の添加回収実験を行った。添加酵素試料としてはDEAE処理酵素分画を用いた。結果をFig.16に示す。105Sおよび DEAE処理添加酵素の各試料で生成したArgAsp(4)DNSの生成量の和と、予め両者を混合した試料で生成したArgAsp(4)DNS量がほとんど一致し、良好な活性の回収が可能であることがわかった。このことは、105Sや本酵素反応を妨害するような物質が存在していても、本酵素の肢知活性量を添加してArgAsp(4)DNSの生成量が測定できれば、105Sやの活性を添加酵素活性量に基づき測定できることを意味しており、どりわけ反応液中のRNAを分解するRNaseの混入を監視する上でも、この標準添加法は重要である。

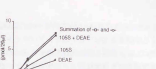


Fig.16 Addition-recovery test of the DEAE-treated enzyme preparation to 105S

第五節　小括ならびに考察

本章では、アルギニル転移酵素活性測定法として4sp(4)DNSを用いる蛍光検出HPLC法を確立し、これまで当研究室で使用してきたラジオアイソトープ法とくらべて再現性、感度ともに優れた方法であることがわかった。本法の特徴は、HPLCの利点を十分に生かして、基質であるAsp(4)DNS、分解物であるDNSBut、生成物であるArgAsp(4)DNSの3者を同時に測定することができ、試料中に混入する反応妨害成分を常に監視しながら測定できる点にあり、ラジオアイソトープ法で問題になった基質や生成物の分解による測定値純度の低下の欠点を解決した。本法を105Sのような精製度の低い試料に応用するには、アミノペプダーゼ阻害剤であるamastatinやbestatinの添加により生成するArgAsp(4)DNSの分解を抑制する必要があった。この知見に基づきbestatinを反応液に含む標準添性測定法を確立した。また、本法の信頼性をさらに高めるために肢知活性の酵素を試料に添加するのが有用であることがわかった。添加用酵素としては、本研究ではDEAE処理酵素分画を使用した。この酵素分画は、凍結保存で失活しないので、添加酵素としての条件を満た

していた。しかし、アミノペプチダーゼが混入しているので、本分画の正しい酵素活性は、ヒドロキシアパタイト精製段階の酵素活性を指標にして、同様な添加回収実験から求めた。このように実際の通常測定に用いる添加酵素は、妨害物質のない純化酵素を必ずしも用いなくても良いことを示した。

第四章　ラット組織中におけるアルギニル転移酵素活性の測定

本酵素活性が真核細胞の細胞質ゾル中に存在することは、105,000g上清に加えられた^{14}C-アルギニンが内在する蒸質タンパク質に取り込まれることから発見され証明されてきた。哺乳動物では羊甲状腺をはじめ[1]、ブタ腎臓[28]、うさぎ網状赤血球[29]、ラットの肝臓、腎臓、脳、甲状腺[30]、そして、牛の水晶体[30]などその活性が証明されており、最近では、アルツハイマー病の発症の原因に関係すると考えられるβ-アミロイドタンパク質内対応箇にアスパラギン酵を持つことから、脳における本酵素の役割が注目されている。[30]このように哺乳動物細胞に広く常在する酵素であることは既に良く知られているが、その生理的意義を解明するための基本的なデータである定量的な組織分布に関する報告はこれまでなされていない。

本章では、開発した蛍光検出HPLCによる活性測定法を用いて、ラット各種組織中の本酵素活性を定量し比較することを目的とした。そのために、測定用試料調製の手間を必要最小限に抑えるには、組織をホモジナイズした後、105,000g超遠心分離し、得られる上清を直接測定できれば理想的と思われ、そのための検討をまず行い、ついでラット各種組織における本酵素活性を測定した。

第一節　粗抽出液中における活性測定の検討

これまで使用していた105Sは、105,000g超遠心上清を透析した試料であった。そこで、ラット腎臓を試料として低分子成分を含む透析していない105Sを直接用いても、酵素活性が正しく測定できるかどうかを検討した。両者を比較するために、105,000g上清を二分し、一方は、氷冷下16時間そのままで保存し（未透析105S）、

他方は、常法により4℃で18時間透析し、両者を同じ容量になるように透析用緩衝液で希釈して比較用試料液とした。その結果はFig.17に示すように、両者の示したArgAsp(4)DNS生成量が、DEAE処理酵素分画を添加したのもそれぞれほぼ完全に一致した。



Fig.17 Assurance of direct assay of 105S without dialysis

この結果は透析の前後で本酵素の失活が無いことを示しており、それはまたホモジネーションから105,000g上清を得る操作の間中、失活を全く考えなくて良いことも示している。

以上の実験から、透析しない105Sの直接測定により組織中の本酵素活性が正しく測れることがわかった。

第二節　組織中の酵素活性

つぎに、ラット各種組織の活性測定を行った。試料の調製は、組織重量に対し正確に2倍容量のホモジネーション用緩衝液を加えて組織を破砕し、105,000g で超遠心分離を行い、その上清を活性測定用の試料とした。その結果をFig.18に示す。左図は上清1μlが示す酵素活性を比較したものであり、右図はタンパク質1mg当たりの酵素活性を比較したものである。

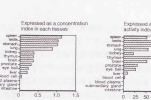


Fig.18 Arginyltransferase activitivities in non-dialyzed 105S of rat tissues

組織中での本酵素濃度を反映すると考えられる左図からは、脾臓、精巣、胃、肺で高いことがわかり、その他の組織でも本酵素活性が確認された。しかし、血漿、顎下腺、舌では、ArgAsp(4)DNSの生成が認められず、同時に行ったDEAE処理酵素分画の添加試料でも顎下腺、舌ではArgAsp(4)DNSの生成が認められず、血漿では、添加試料のみに生成が認められた。この結果から血漿中には、本酵素は存在しないこと、顎下腺、舌では、本酵素反応を強く阻害するものの共存が推察された。また、右図に示したタンパク質1mg当たりの本酵素の比活性からみると、存在濃度の高い組織ではいずれも高く、存在濃度の比較的低い胸腺、脳も高かった。

第三節　小括ならびに考察

蛍光検出HPLC法を用いて、未透析105S中の本酵素活性が正しく測れるかどうかを、透析前後の上清を試料として検討した結果、両試料で活性の変化がなかったことから、未透析105Sの直接測定が可能であることがわかった。また、透析中本酵素活性が変化しなかったことから、未透析105Sの調製の過程で本酵素の失活は全く考え

なくて良いこともわかった。本酵素の精製において、従来のラジオアイソトープ法を使って得られてきた結果からは、105Sも含めて精製度の低い試料中での本酵素は余り安定ではないとの認識があったが、今回得られた結果から、それはラジオアイソトープによる測定自体に問題があったのではないかということを示唆している。そこで、本活性測定法を利用してラット各種組織の未遠心105Sにおける本酵素活性を測定し比較したところ、報告されてきたように本酵素は各種組織に広く分布し、比較的代謝回転の速いと思われる組織に活性が高い傾向が認められた。今回測定した組織のなかで、血漿、顎下腺、膵では活性が認められなかった。血漿については、標準酵素の添加試料で活性が認められたことから、本酵素の存在は否定されたが、顎下腺、膵では標準酵素の添加試料でも活性が認められなかった。その原因としてはプロテアーゼやRNaseの混入により、本酵素やtRNAが分解されたためではないかと考えられる。多くの組織に本酵素が存在することを考えれば、これら組織にも当然存在すると考えられるので、今後は、プロテアーゼ阻害剤やRNase阻害剤などを加えてこのような組織の本酵素活性が測定できるかどうかを検討していく必要がある。

総括

本研究では、これまでアルギニル転移酵素に関する研究に用いられてきたラジオアイソトープによる活性測定法に代わる方法として、蛍光検出HPLCによる活性測定法を開発し、その方法の有用性を確かめた後、ラットの組織中本酵素活性の測定に応用した結果について記述した。第一章では、本酵素の活性部位に関する情報を得るため各種化合物によるアルギニル転移反応の阻害効果を検討し、活性部位にはN末端ヒ-酸性アミノ酸を認識する部位があり、その隣にはアミド結合に遠結する不安定基を認識する方向性を持った比較的大きな疎水性空間が存在することを示した。第二章では、得られた活性部位の情報をもとに、基質化合物をデザイン、合成し、最も基質性の高いAsp(4)DNSを見出した。第三章では、新たな活性測定法として、基質のAsp(4)DNS、生成物のArgAsp(4)DNS、分解物のDNSButの三者を同時に測定できる蛍光検出HPLC法を開発し、従来のラジオアイソトープ法と比べて信頼性の高い方法であることを示した。つぎに、蛍光検出HPLC法を組織の105SのようなSを粗抽出液中の本酵素の活性測定に応用したところ、105S中に含まれる加水分解酵素によりAsp(4)DNSおよびArgAsp(4)DNSが顕著に分解されることがわかった。そこでアミノペプチダーゼ阻害剤であるbestatinを添加すればArgAsp(4)DNSが分解を抑制されることがわかり、bestatin存在下短時間測定により活性測定が可能であることがわかった。さらに、部分精製酵素の標準添加試料を同時に測定すれば方法の信頼性がさらに高められることもわかった。第四章では、このようにして開発した活性測定法を用いて、ラット各種組織の未遠析105S中に存在するアルギニル転移酵素活性を測定し、各種組織中に存在する本酵素活性の量的分布を初めて測定するのに成功した。

謝　辞

本研究に際し、研究テーマの設定から結論に至るまで終始御懇篤な御指導並びに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬品分析化学教室　鈴島健二郎　教授に深く感謝致します。

実験研究において有益な御助言並びに御指導を賜りました城西大学薬学部生化学教室　白幡　晶　助教授に深く感謝いたします。

数々の御助言、御指導を賜りました城西大学　新津　勝　講師に感謝致します。

また、御助言を頂きました　佐々木ひとみ　助手、和田敦子　助手にひより感謝するとともに、実験に際し、終始御協力頂きました　許　淑吉　氏をはじめとする城西大学薬学部薬品分析化学教室の諸氏に心より感謝致します。

本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました城西大学　菊川清雄　教授並びに城西大学　谷　優　教授に深く感謝致します。

実験の部

一般事項

試薬・材料

活性測定用の2-メルカプトエタノール、塩化マグネシウム（$MgCl_2$）、および、トリクロロ酢酸（TCA）は和光純薬工業株式会社から、TRIZMA BASE（SIGMA7-9 BIOCHEMICAL BUFFER）、ATP、α-ラクトアルブミン、塩化カリウム（KCl）、および、t-RNAはSIGMAから、ジエチルエーテル、エタノール、および、L-アルギニンは関東化学株式会社から、^{45}Ca-アルギニン（147mCi/mmol）は宝町化学工業株式会社から、シンチレーター（ECONOFLUOR）は第一化学薬品工業株式会社から購入したものを用いた。またペーパーディスクは、Whatman R 3MM 2.5cmを使用した。

タンパク定量に用いたクマシーブリリアントブルー試液はBio-Radから購入し、標準タンパク質として用いた牛血清アルブミンは生化学工業株式会社から購入した。酵素調製に用いたブタ腎臓は、東松山醸器食品から購入した。塩化マグネシウムおよび酢酸は和光純薬工業株式会社から、2-メルカプトエタノール（生化学用）および、EDTAはSIGMAから、DEAE-セルロファイン、ヒドロキシアパタイトは、生化学工業株式会社から購入したものを用いた。

アルギニル-tRNA 合成酵素の調製

アルギニル-tRNA 合成酵素（activating enzyme）は、Zubayの方法[25]に準じて部分精製した。即ち、ペプトン培地中37℃でジャーファーメンターを用いて大量インキュベーションした大腸菌を、5,000rpmで連続遠心して集菌し、-80℃で凍結保存した。その約1gを乳鉢に取り、蒸留水2ml、アルミナ3gを加えて氷冷下、約30分間、菌体をすりつぶした。これに、10mM酢酸マグネシウムを含む

1mMTris-HCl緩衝液（pH 7.4）6ml及びDNase I（SIGMA）が4μg/mlになる様に混和し，17,000gで20分間遠心分離してアミラナと菌体膜を取り除いた。この上清を更に78,000gで150分間遠心分離し，その上層の約3分の2を分取し，これを5mM 2-メルカプトエタノールを含む20mMリン酸緩衝液（pH7.7）で一晩透析し，真ちに-80℃で凍結保存し，使用直前に解凍して用いた。全ての操作は5℃以下で行った。

アルギニルトランスフェラーゼのラジオアイソトープによる活性測定法

アルギニルトランスフェラーゼの活性測定は，基質タンパク質としてα-ラクトアルブミンを，そしてアルギニル-tRNAの再生系を用いるHorinishiらの方法[13]に従って行った。

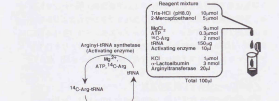


Fig.19 Transfer reaction of ^{14}C-arginine to α-lactoalbumin using ^{14}C-Arg-tRNA-generating system

即ち，通常のassay系では，standard incubation mixture 100μl中に，10μmol Tris-HCl（pH7.8），5μmol 2-メルカプトエタノール，9μmol $MgCl_2$，1μmol KCl，0.3μmol ATP，150μg tRNA，2nmol α-lactoalbumin，2nmol ^{14}C-アルギニン（50nCi/nmol=1.85kBq/nmol）をreagent mixtureとして70μl，activating enzyme 10μl，及びアルギニルトランスフェラーゼの試料溶液20μlを含み，37℃で一定時間インキュベーションしてアルギニン転移反応を行った。なお，この系では，アルギニル-tRNA量は常に十分量存在する様に設定した。インキュベーション後，Manns and Novelliの方法[14]に従って，反応液40μlずつを2枚のペーパーディスクにスポットし，一方を遊離のアルギニンを除くために氷冷したTCAで処理し，含まれる放射能を測定してCold値とした。もう一方をアルギニル-tRNAに由来するアルギニンを除くために熱したTCAで更に処理し，含まれる放射能を測定してHot値とした。Hot値がアルギニルトランスフェラーゼにより転移されたアルギニン量を示し，Cold値からHot値を差し引いた値が活性測定系に存在するアルギニル-tRNA量を示す。この活性測定系にはRNaseが混入しやすいため，アルギニル-tRNA量をこれにより常に確認した。実際のディスク処理は以下のように行った。0.1M ^{14}C-アルギニンを含む 10%TCA（氷冷）で5分間1回，次に5%TCA（加熱）で10分間1回，更に 5%TCA（室温）で15分間1回処理した後，室温下エタノールで15分間1回，エーテルで15分間1回洗浄し，約10分間風乾した後，シンチレーター10ml を入れたバイアル中に入れ，液体シンチレーションカウンターで測定した。Cold TCA処理の測定は，TCAでの処理を全て氷冷下で行った以外は，Hot TCA と同様に行った。

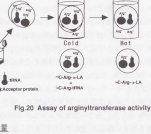


Fig.20 Assay of arginyltransferase activity

タンパク定量

タンパク定量は、Bradfordの方法[20]に従って測定した。標準蛋白質には牛血清アルブミン（BSA）を用いた。即ち、30,50,100,150,200, 300,400μg/mlのBSA標準液と、適度に希釈した試料を調製し、これらにクマシーブリリアントブルー試液2.5mlを加えて混和した後、595nmにおける吸光度を測定し、BSA標準液の検量線から試料中のタンパク量を算出した。

アルギニル転移酵素のブタ腎臓からの調製

哺乳動物のアルギニル転移酵素は、ウサギ肝臓[20]、ブタ腎臓[20]、ウサギ網状赤血球[22]からの精製が報告されてので、それらの方法に従い部分精製を行った。手順の概要を、Fig.21に示す。

以下、全ての操作は記述がない限り5°C以下で行った。

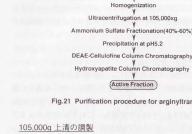


Fig.21 Purification procedure for arginyltransferase

105,000g 上清の調製

豚の腎臓の重量に対し2倍容量の5mM塩化マグネシウム、5mM塩化カリウム、0.1mM EDTA、5 mM 2-メルカプトエタノール、及び、0.25M シュ糖を含む20mM Tris-HCl緩衝液（pH 7.8）を加え、氷冷下、polytron homogenizerでホモジナイズした。その後、20,000g、15分間遠心分離し、更にこの上清を105,000g、90分間遠心分離した。得られた上清をを0.1mM EDTA、5 mM 塩化マグネシウム、及び、5 mM 2-メルカプトエタノールを含む20 mM Tris-HCl緩衝液（pH7.8）で一晩透析した（105S）。

硫安（40%-60%）分画

硫酸アンモニウムを飽和させた5 mM 2-メルカプトエタノールを含む20 mM Tris-HCl緩衝液（pH 7.8）を、硫酸アンモニウムの飽和濃度が40%になるように、105Sの透析試料に撹拌しながら徐々に加え、加え終わってから15分間撹拌し続け、その後、20,000g、15分間遠心分離した。その上清に、硫酸アンモニウムの飽和濃度が60%になるようにして、上記飽和溶液を撹拌しながら徐々に加え、

加え終わってから15分間撹拌し続け、その後、20,000g、15分間遠心分離した。ここで得た沈殿に5mM 2-メルカプトエタノールを含む20mM Tris-HCl緩衝液（pH 7.8）を加えて溶かし、同じ緩衝液で一晩透析した。

等電点沈殿（pH 5.2）分画

硫安分画（40%-60%）の透析試料に0.1M酢酸溶液を加えてpH 5.2とし、その後10分間撹拌し続け、これを20,000g、10分間遠心分離した。得られた沈殿に0.1M 2-メルカプトエタノールを含む0.02M Tris-HCl緩衝液（pH 7.8）を加えて懸濁し、これを5mM 2-メルカプトエタノールを含む10 mM Tris-HCl緩衝液（pH 7.8）で一晩透析した。

DEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィー分画

DEAE-セルロファインを充填したカラム（4.5 cm I.D.x 30cm）を elution buffer（0.1M 2-メルカプトエタノールを含む、10mM Tris-HCl緩衝液（pH 7.8））で平衡化し、試料溶液（ブタ腎臓100gより調製した）を吸着させた後、流速は6ml/min で、elution buffer の塩濃度を 0mM NaCl（0-30min）、200mM NaCl（30-90min）、400mM NaCl（90-150min）にかえ段階溶離を行い、200mM NaCl 溶出部分を回収した。このように精製したDEAE-セルロファインの活性分画を飽和度が75%になるように硫酸アンモニウムの結晶を加え、30分間撹拌し続け、その後、20,000g、15分間遠心分離した。ここで得た沈殿を、0.1M 2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸カリウム緩衝液（pH 7.8）で一晩透析し、DEAE処理酵素分画とした。

ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー分画

DEAE処理酵素分画を、予め0.1M 2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸カリウム緩衝液（pH 7.8）で平衡化しておいたヒドロキシアパタイトカラム（4.5cm ID.x20cm）にかけ、0.01M-1Mリン酸緩衝液のリニアグラジェントで溶離した。これにより溶出される2nd.ピークをヒドロキシアパタイト処理酵素分画とした（Fig.22）。

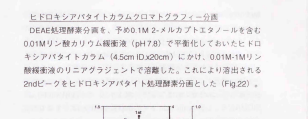


Fig.22 Elution Profile of Arginyltransferase Activity from Hydroxyapatite Column

第一章に関する実験

試薬・材料

プトレシン（Put）塩酸塩、スペルミジン（Spd）塩酸塩、スペルミン（Spm）塩酸塩は、SIGMAから購入したものを水・エタノールから再結晶したものを用いた。その他のテトラアミン、ペンタアミンは、当研究室で以前報告した方法[29,37]に従い調製したものを用いた。合成した化合物、sym-norspermine tetrahydrochloride（333）、N,N'-bis(aminopropyl)cadaverine tetrahydrochloride（353）、tris(aminopropyl)amine（3(3)3）、N',N''-bis(ethyl)spermine（Et343Et）、1,17-diamino-5,9,13-triazaheptadecane pentahydrochloride（4334）、1,17-diamino-4,9,14-triazaheptadecane penta-

hydrochloride（3443）、1,17-bis(ethylamino)-5,9,13-triazaheptadecane pentahydrochloride（E43434Et）、1,17-bis(ethylamino)-4,9,14-triazaheptadecane pentahydrochloride（E43443Et）、1,21-diamino-4,9,13,18-tetraaza heneicosane hexahydrochloride（34343）はそれぞれ塩酸塩として元素分析により確認した。

トリペプチド（Glu-Val-Phe）、L-aspartic acid α-(β-naphthylamide)、L-glutamic acid α-(4-methoxy-β-naphthylamide)はSIGMAから、L-glutamic acid α-(β-naphthylamide)はフナコシ株式会社から購入したものを用いた。

アスパラギン酸誘導体の合成に用いた試薬

3-Aminoquinoline、phenethylamine、L-pyroglutamic acid、(R)-(+)-1-(naphthyl)ethylamine、(S)-(-)-1-(naphthyl)ethylamine、benzylamineは東京化成工業株式会社から、cyclohexylamine、シリカゲル（Wakogel）は和光純薬株式会社から、1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine、4-phenylbutylamineは、Aldrichから、succinic anhydride、n-heptylamineは、関東化学株式会社から購入した。

tert-butyloxycarbonyl-L-aspartic acid β-benzylester（BocAsp(OBzl)-OH）は国産化学から、N-hydroxysuccinimide（HO-Su）、N,N'-dicyclohexylcarbodimide（DCC）は東京化成工業株式会社から、N α ,N^in^-tributoxycarbonyl-L-arginine N-hydroxysuccinimide ester（Z-Arg (di-Z)-OSu）はNovabiochemから購入した。

アスパラギン酸誘導体の合成

アスパラギン酸誘導体の合成は、全て同一条件で行った。

BocAsp(OBzl)-OH（2mmol）およびHO-Su（2.6mmol）をdioxaneに溶解し、DCC（2.2mmol）を加え、20時間室温で撹拌し、

反応液を濾過後、濾液に一級アミノ基を持つ化合物（2mmol）を加えて20時間室温で撹拌した。反応液を濾過し、溶媒を留去後、残査をベンゼンに溶かしシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ベンゼン：アセトン系）により精製した。この生成物は、80%以上の収率で得ることができた。この生成物の保護基を常法に従い除去した。BOC基はトリフルオロ酢酸により除去し、Bzl基は、酢酸中で接触還元により除去した。これにより生成するアスパラギン酸誘導体を水・エタノールから再結晶した。

合成した化合物は、元素分析、FAB-MS、NMRにより確認した。

L-Aspartic acid α-(benzylamide) (1): Anal. Calcd for $C_{11}H_{14}N_2O_3$・0.55CF_3COOH: C, 51.00; H, 5.17; N, 9.83. Found: C, 50.63; H, 5.61; N, 9.57.　L-Aspartic acid α-(phenethylamide) (2): Anal. Calcd for $C_{12}H_{16}N_2O_3$・0.9CF_3COOH: C, 48.91; H, 5.03; N, 8.27. Found: C, 49.27; H, 5.12; N, 8.38.　L-Aspartic acid α-(phenylbutylamide) (3): Anal. Calcd for $C_{14}H_{20}N_2O_3$・CF_3COOH: C, 50.79; H, 5.59; N, 7.40. Found: C, 50.64; H, 5.54; N, 7.49.　L-Aspartic acid α-(heptylamide) (4): Anal. Calcd for $C_{11}H_{22}N_2O_3$・CF_3COOH: C, 45.35; H, 6.73; N, 8.14. Found: C, 45.01; H, 6.52; N, 8.31.　L-Aspartic acid α-(cyclo- hexylamide) (5): Anal. Calcd for $C_{10}H_{18}N_2O_3$・CF_3COOH: C, 43.90; H, 5.83; N, 8.53. Found: C, 43.69; H, 5.73; N, 8.71.　L-Aspartic acid α-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamide) (6): Anal. Calcd for $C_{14}H_{18}N_2O_3$・CF_3COOH: C, 51.07; H, 5.09; N, 7.44. Found: C, 51.07, H, 5.13; N, 7.56.　L-Aspartic acid α-(3-quinolinamide) (10): Anal. Calcd for $C_{13}H_{13}N_3O_3$・CF_3COOH・$2H_2O$: C, 44.02; H, 4.43; N, 10.27. Found: C, 43.70; H, 4.69; N, 10.42.　L-Aspartic acid α-[(R)-(+)-naphthyl- ethylamide] (11): Anal. Calcd for $C_{16}H_{18}N_2O_3$・0.7CF_3COOH: C, 57.08; H, 5.15; N, 7.65. Found: C, 57.36; H, 5.30; N,

7.29.　L-Aspartic acid α -[(S)-(-)-naphthylethylamide]（12, Asp(S)NEA）. Anal. Calcd for $C_{16}H_{16}N_2O_3{\cdot}H_2O$: C, 63.14; H, 6.62; N, 9.20. Found: C, 62.80; H, 6.57; N, 9.13.　D-Aspartic acid α -[(S)-(-)-naphthylethylamide]（13）. Anal. Calcd for $C_{16}H_{16}N_2O_3{\cdot}0.5CH_3COOH{\cdot}0.7CF_3COOH$: C, 55.58; H, 5.27; N, 7.07. Found: C, 55.94; H, 5.63; N, 7.07.　L-Pyroglutamic acid α -[(S)-(-)-naphthylethylamide]（14）. Anal. Calcd for $C_{16}H_{16}N_2O_3$: C, 72.32; H, 6.43; N, 9.92. Found: C, 72.04; H, 6.58; N, 9.93.　N- α tert-Butyloxycarbonyl-L-aspartic acid β -benzyl ester α -[(S)-(-)-naphthylethylamide]（15）. Anal. Calcd for $C_{27}H_{28}N_2O_5$: C, 70.57; H, 6.77; N, 5.88. Found: C, 70.43; H, 6.83; N, 5.81.　L-aspartic acid β benzyl ester α -[(S)-(-)-naphthylethylamide]（16）. Anal. Calcd for $C_{23}H_{24}N_2O_3{\cdot}2H_2O$: C, 66.68; H, 6.84; N, 6.76. Found: C, 66.58; H, 6.12; N, 6.70.　N- α -Acetyl-L-aspartic acid α -[(S)-(-)-naphthylethylamide]（17）. Anal. Calcd for $C_{18}H_{20}N_2O_4{\cdot}0.1H_2O$: C, 65.48; H, 6.17; N, 8.48. Found: C, 65.25; H, 6.13; N, 8.48.　N-Succinyl-(S)-(-)-naphthylethylamine（18）. Anal. Calcd for $C_{16}H_{17}NO_3$: C, 70.83; H, 6.32; N, 5.16. Found: C, 70.72; H, 6.41; N, 4.88.

HPLC用ArgAsp(S)NEA標品の合成

BocAsp(OBzl)(S)NEA（2mmol）をトリフルオロ酢酸で処理してBoc基を除去したものとZ-Arg(di-Z)-OSu（2mmol）をN,N-dimethylformamide（DMF）中で20時間室温で反応させた。反応後、溶媒を留去し、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール=9：1）により精製した。精製した化合物の保護基を酢酸中接触還元で除去し、生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール：酢酸=1：1：0.1）により精製した。ArgAsp(S)NEA（Ionspray-MS m/z 442.4 (Calcd for $C_{22}H_{30}N_6O_4$: 442.4)）

HPLCによるAsp(S)NEAとArgAsp(S)NEAの分離条件

カラムは、TOSOH TSKgel ODS-80T$_M$を用い、溶離液は、メタノール：クエン酸-リン酸緩衝液（0.1Mクエン酸48.5%：0.2Mリン酸水素二ナトリウム51.5%）＝3：2を用い、流速0.6ml/min、励起波長280nm、蛍光波長325nmで行った。

Asp(S)NEAの基質性の検討

ラジオアイソトープ法で用いたstandard incubation mixtureの一部を変更して使用した。今回は、standard incubation mixture 100μl中に、10μmolTris-HCl（pH 7.8）、5μmol 2-メルカプトエタノール、9μmol $MgCl_2$、1μmol KCl、0.3μmol ATP、150μg tRNA、10nmol Asp(S)NEA（予めDMSO 5μlに溶解）、10nmol ^{45}Cアルギニンをreagent mixtureとして70μl、activating enzyme 10μl、及びヒドロキシアパタイト処理酵素溶液を20μlを含み、37℃で一定時間インキュベーションしてアルギニン転移反応を行った。反応停止は、20%トリクロロ酢酸100μlを反応液に添加して行った。これを遠心分離して上清をHPLCにより確認した。

第二章に関する実験

試薬・材料

1,3-Diaminopropane、1,5-diaminopentaneは、東京化成工業株式会社から、1,4-butanediamineは和光純薬株式会社から、dansylchlorideは、SIGMAから、ヒドラジン1水和物は関東化学株式会社から購入したものを用いた。

N-Aspartyl-N'-dansyl-1,4-butanediamine (Asp(4)DNS)の合成

1,4-Butanediamine と無水アタル酸を等mol量酢酸中に加え、1時間 reflux し、反応後塩酸塩にしてから再結晶した。再結晶により得られた、N-(4-Aminobutyl)phthalimide (1.00 g, 3.9 mmol)を、炭酸水素ナトリウム水溶液（4g/60ml）に加え、そこにアセトン75 mlに予め溶かした dansyl chloride （0.80 g, 3.0 mmol）を滴下した。滴下後18時間室温で反応させた。反応後溶媒を留去し、4Mアンモニア酢酸エチルで抽出した。その酢酸エチル相を集めて溶媒を留去し、残査にメタノール（25ml）を加えた。ここに、98%ヒドラジン1水和物（3ml）を加え2時間reflux し、フタロイル基を除去した。反応後溶媒を留去し、残査を4Mアンモニア-クロロホルムで抽出し、クロロホルム相を集め溶媒留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール：酢酸=5：1：0.1）により分離した。

精製した4-dansylamidobutylamine は、TLC（クロロホルム：メタノール：酢酸=5：1：0.1）により1バンドであることを確認した（4-Dansylamidobutylamine 酢酸塩（0.77 g, 2.4 mmol））。遊離型にした4-dansylamidobutylamine (0.39 g, 1.2 mmol) をジオキサン50 ml に溶かした。この溶液に第一章と同様に調製した BocAsp(OBzl)-OSu を濃縮したものを加え、TLC（ベンゼン：アセトン=5：1）で確認しながら反応させた。反応終了後、ジオキサンを留去し、残渣をベンゼン：アセトン=20：1の混液に溶かし、同じ混液で平衡化したシリカゲルカラムにかけ、ベンゼン：アセトン=20：1、ベンゼン：アセトン=10：1、ベンゼン：アセトン=5：1で順次溶出し、5：1の溶出液を集めた。精製した BocAsp(OBzl)(4)DNSはTLCにより1バンドであることを確認した（BocAsp(OBzl)(4)DNS（0.71 g, 1.13 mmol））。BocAsp(OBzl)(4)DNSの保護基を第一章と同様に酢酸中での接触還元とトリフルオロ酢酸による処理で除去し、生成物（Asp(4)DNS）をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール：酢酸=20：1：0.2および4：1：0.3）により精製した。精製分画の溶媒を留去し、少量のエタノールに溶かし、エーテルを加えて析出する沈殿を集めた。Asp(4)DNS (0.12 g, 0.28 mmol) Anal.Calcd for $C_{20}H_{30}O_6N_4S$· 0.4 CF_3COOH：C, 51.77; H, 5.89; N, 11.62. Found：C, 51.56; H, 6.04; N, 11.39.

N-Arginylaspartyl-N'-dansyl-1,4-butanediamine（ArgAsp(4)DNS）の合成

上記合成中間体BocAsp(OBzl)(4)DNS（660 mg, 1.05 mmol）をトリフルオロ酢酸で処理し、Boc基を除去した（Asp(4)DNS· TFA, 676 mg, 1.03 mmol）。それを4Mアンモニア-クロロホルム抽出によりクロロホルム相を集め、溶媒留去後ジオキサン50mlに溶かした。その溶液に、第一章で先用いたZ-Arg(di-Z)-OSu（670 mg, 0.99 mmol）を加え、15時間室温で撹拌した。反応液のジオキサンを留去し、残渣をクロロホルム：メタノール：酢酸=25：1：0.4の混液に溶かし、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール：酢酸=25：1：0.4）により精製した。蛍光を示す分画（Z-Arg(di-Z)Asp(OBzl)(4)DNS）を集めアセトンから再結晶した（450 mg）。Z-Arg(di-Z)Asp(OBzl)(4)DNS; Anal.Calcd for $C_{52}H_{54}O_{12}N_8S$· 0.8CH_3COOH：C, 62.05; H, 5.93; N, 9.88. Found C, 61.86; H, 5.95; N, 10.16

Z-Arg(di-Z)Asp(OBzl)(4)DNSの保護基を酢酸中での接触還元により除去した。得られたArgAsp(4)DNSをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール：酢酸=2：4：1）により精製した（ArgAsp(4)DNS、67 mg）。

ArgAsp(4)DNS; Anal. Calcd for $C_{20}H_{40}O_8N_8S\cdot2CH_3COOH\cdot C,50.51;$ H, 6.73; N, 15.71. Found : C, 50.28; H,7.00; N, 15.63.

N-Glutamyl-N'-dansyl-1,4-butanediamine （Glu(4)DNS）の合成

全ての操作は、tert-butyloxycarbonyl-L-glutamic acid γ-benzyl-ester （BocGlu(OBzl)OH）を用いる以外、Asp(4)DNSの合成と同様に行った。中間体 tert-butyloxycarbonyl-Glu(4)DNSは結晶化し、その時の元素分析値は、Anal. Calcd for $C_{30}H_{42}O_8N_6S\cdot0.5CH_3COOH\cdot C,$ 55.86; H, 6.90; N, 9.65. Found : C, 55.67; H, 6.94; N, 9.49であった。また、Glu(4)DNSは、TLCにより1バンドであることを確認し、さらにFAB-MSにより確認した FAB-MS m/z : 551 (M+H)。

N-Arginylglutamyl,N'-dansyl-1,4-butanediamine(ArgGlu(4)DNS)の合成

合成中間体としてGlu(OBzl)(4)DNSを用いる以外はArgAsp(4)DNSの合成と同様に行い、保護基の付いた中間体Z-Arg(di-Z)Glu(OBzl)(4)DNSの元素分析値は、Z-Arg(di-Z)Glu(OBzl)(4)DNS; Anal. Calcd for $C_{54}H_{62}O_{12}N_8S\cdot0.5CH_3COOH\cdot C,$ 62.71; H, 6.02; N, 9.92. Found : C, 62.74; H, 6.01; N, 9.74であった。また、ArgGlu(4)DNSは、TLCにより1バンドであることを確認し、さらにFAB-MSにより確認した。FAB-MS m/z :1100 (M+H)

その他の蛍光性化合物の合成

その他の4種化合物N-aspartyl-N'-dansyl-1,3-propanediamine （Asp(3)DNS）、N-glutamyl-N'-dansyl-1,3-propanediamine （Glu(3)DNS）、N-aspartyl-N'-dansyl-1,5-pentanediamine （Asp(5)DNS）、N-glutamyl- N'-dansyl-1,5-pentanediamine （Glu(5)DNS）は、上記と同様に合成しTLCにより1バンドであることを確認し、さらにFAB-MSにより確認した。

FAB-MS m/z: 423(M+H) for Asp(3)DNS 、437(M+H) for Glu(3)DNS、451(M+H) for Asp(5)DNS、465(M+H) for Glu(5)DNS

蛍光検出HPLC条件

カラムは、TOSOH ODS-80T$_M$(4.5 mmφ x 15 cm)を使用し、アイソクラティック溶出（15mMオクタンスルホン酸ナトリウムを含むメタノール：クエン酸-リン酸緩衝液（0.1Mクエン酸：0.2Mリン酸=79.45：20.55（pH3.0））=13：7）、流速0.8 ml/min、蛍光検出Ex 333nm、Em 536 nmで行った。

蛍光性化合物の基質性検討

Standard incubation mixture 100μl中に、10μmol Tris-HCl（pH 7.8）、5μmol 2-メルカプトエタノール、5μmol $MgCl_2$、1μmol KCl、0.5μmol ATP、150μg tRNA、10nmol蛍光性化合物（Asp(n)DNSまたはGlu(n)DNS）、10nmol ^{15}C-アルギニンをreagent mixtureとして70μl、activating enzyme 10μl、及びアルギニルトランスフェラーゼの試料溶液を20μlを含み、37℃で一定時間インキュベーションしてアルギニン転移反応を行った。反応終了後、20%TCAで反応を停止させその上清を上記蛍光検出HPLCで測定した。

第三章に関する実験

Km値の測定

基質性検討で用いた反応溶液を使用し、基質Asp(4)DNS濃度をそれぞれ1,5,10,50,100,500nmolにして、37℃で30分間インキュベーションしてアルギニン転移反応を行い、20%TCAで反応を停止させ

その上清5μlを上記蛍光検出HPLCで測定した。

加水分解酵素による基質及び生産物の分解の測定

基質性検討で用いた反応溶液の10nmol Asp(4)DNSを10nmol AfgAsp(4)DNSに かえ、一定時間インキュベーションし、20%TCAを100μl加え反応を停止させ、その上清5μlをHPLCにより測定した。

加水分解酵素共存下での活性測定の検討に用いた各種阻害剤

セリンプロテアーゼ阻害剤（N-tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone（TPCK）、N-p-tosyl-L-Lysine chloromethyl-ketone（TLCK）、N α-p-tosyl-L-arginine methylester（TAME）、phenylmethylsulfonylfluoride（PMSF））、システインプロテアーゼ阻害剤（trans-epoxysuccinyl-L-leucylamide(4-guanidino-butane)（E64）、システイン、セリンプロテアーゼ阻害剤（leupeptin, chymostatin）、アミノペプチダーゼ阻害剤（cysteamine, -(2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl- Leu（bestatin）、(2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-5-methylhexanoyl-Val-Val-Asp（amastatin）は、SIGMAから購入したものを用いた。

各種阻害剤を用いる阻害効果の検討

基質性検討に用いた反応溶液に10,100nmolになるように各種阻害剤を加え活性測定を行い、未添加試料による結果と比較して効果を調べた。

第四章に関する実験

各組織中の酵素活性を調べるための酵素試料の調製

埼玉実験動物より購入したS.D.ラット（12週齢、♂）を頚椎脱臼

してから解剖し、各組織を採取後、直ちに液体窒素を用いて凍結し試料調製まで、-30℃で凍結保存した。酵素試料の調製法は、ブタ腎臓からの調製と同様に行った。

引用文献

1) Soffer R. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **155**, 228-240 (1968)
2) Kaji H., *Biochemistry*, **7**, 3844-3850 (1968)
3) Soffer R. L., and Horinishi H., *J. Mol. Biol*, **43**, 163-175 (1969)
4) Scott R. et al, *Science*, **234**, 364-368 (1986)
5) Realini C. et al, *FEBS Lett.*, **348**, 109-113 (1994)
6) Coleman C. S. and Pegg A. E., *J. Biol. Chem.*, **272**, 12164-12169 (1997)
7) Bachmair A., et al, *Science*, **234**, 179-186 (1986)
8) Nishizawa M., et al, *EMBO J.*, **11**, 2433-2446 (1992)
9) Gonda D. K., et al, *J. Biol. Chem.*, **264**,16700-16712 (1989).
10) Ferber S., and Ciechanover A., *Nature (London)*, **326**, 808-811 (1986).
11) Balzi E., et al, *J. Biol. Chem.*, **265**, 7464-7471 (1990)
12) Savage M., et al, *Curr. Genet.*, **7**, 285-288 (1983)
13) Horinishi H., et al, *Anal. Biochem.*, **75**, 22-29 (1976)
14) Klemperer, N. S., and Pickart, C. M., *J. Biol. Chem*, **264**, 19245-19252 (1989)
15) Takao K., Igarashi T., Ogiso H., Ugata K., Shirahata A., and Samejima K., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1169-1172 (1998)
16) Takao K., Xu Y. J., Samejima K., Shirahata A., and Nitsu M., *Anal. Biochem.*, **267**, (1999) in press
17) Takao K., and Samejima K., in preparation
18) Soffer R. L., *J. Biol. Chem.*, **248**, 2918-2921 (1973)
19) Kato M., *J. Biochem. (Tokyo)*, **94**, 2015-2022 (1983)
20) Yu M., et al, *Neurochem. Res.*, **19**, 105-110 (1994)

21) Li J., and Pickart C. M., Biochemistry, 34, 15829-15837 (1995)
22) Kakegawa T., et al, *Arch. Biochem. Biophys.*, **261**, 250-256 (1988)
23) Basu H. S., et al, *Cancer Res.*, **53**, 3948-3955 (1993)
24) Campbell R. A., et al, *Advances in polyamine research*, **1**, (1976)
25) Pasternack R., et al, *Anal. Biochem.*, **249**, 2918-2921 (1997)
26) Kato M., and Nozawa Y., *Anal. Biochem.*, **143**, 361-367 (1984)
27) Ciechanover A., et al, J. Biol. Chem., 263, 11155-11167 (1988)
28) Barra H. S., et al, *J. Neurochem.*, **20**, 97-108 (1973)
29) Wagner B. J., and Margolis J. W., *Exp. Eye. Res.*, **53**, 609-614 (1991)
30) Bongiovanni G., et al, *NeuroReports*, **7**, 326-328 (1995)
31) Hallak M. E., and Bongiovanni G.,*Neurochem. Res.*, **22**, 467-473 (1997)
32) Wang Y. M., and Ingoglia N. A., *Neurochem. Res.*, **22**, 1453-1459 (1997)
33) Zubay G., *Proc. in Nucleic Acid Res.*, 455-460 (1966)
34) Mans R. J., and Novelli G. D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **3**, 540-543 (1960)
35) Bradford M. M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976)
36) Soffer R. L., *J. Biol. Chem.*, **245**, 731-737 (1970)
37) Samejima K., et al, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3428-3435 (1984)
38) Nitsu M., and Mamejima K., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1032-1038 (1986)
39) Nitsu M., et al, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2958-2961 (1992)

