

て検討し、LH および FSH は DNA 複製酵素である DNA polymerase α 活性を促進させるが、DNA 複製酵素である DNA polymerase β 活性は促進させず、一方、prolactin は両者とも促進させないこと、さらに primase 活性も同時期卵胞に存在することを初めて明らかにした。今回は、排卵前卵胞における LH および FSH の DNA 複製酵素活性促進の作用機序を明らかにするため、ラットの排卵前卵胞における LH および FSH の卵細胞 (O)、顆粒膜細胞 (GC)、卵胞膜細胞 (TC) および間質細胞 (IC) の核内 DNA 合成機構に及ぼす影響について DNA polymerase α , β (DNA poly. α , β) および primase 活性面から、in vitro で各細胞レベルからの検討を加えた。

方法：27日 齢の Wistar-Imamichi 系雌ラットに PMS 10IU を皮下投与後、48時間目に卵巣を摘出し、種々の濃度の rat NIH-LH-24, NIH-FSH-15 および dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) で120分間 incubation した。ついで卵胞 (FO)、卵丘細胞と卵細胞 (CO), O, GC, TC, および IC の各群にわけ、DNA, poly. α , β および primase 活性を測定した。

成績：DNA poly. α 活性は、LH および FSH 群で FO, CO および O で control 群の 3.4~4.7倍 (300~383pmol dTNP incorporated) と有意な上昇を認めしたが、GC, TC, および IC では1.3~1.5倍と有意な変化を認めなかつた。dbcAMP 群でも0.01~0.1 μ M において FO, CO および O で DNA poly. α 活性は有意な上昇を示した。primase 活性も同様な傾向を示した。DNA poly. β 活性はいずれの群においても有意な変化を示さなかつた。以上の事実は、排卵前卵胞において LH および FSH は resumption of meiosis, oogenesis ないし embryogenesis に必要な DNA poly. α を卵細胞に蓄積させ、しかもこの過程に cyclic AMP も介在することが判明した。

独創点：LH および FSH の排卵前卵胞での DNA 複製酵素活性が、主に卵細胞で変化する事実を明らかにした。

質問 (東邦大) 木下 佐

卵丘細胞における DNA poly. α 活性はどうか。卵丘細胞+卵における酵素活性の上昇は主として卵における活性上昇と考えてよいのか。

回答 (筑波大) 臼杵 愼

Cumulus cells 単独での DNA polymerase α 活性は細胞数の問題か、現在のところうまく測定できていない。卵の方に圧倒的に多くの活性が認められる。

回答

(筑波大) 臼杵 愼

最近 Freter, Schuetz et al. は、non-cyclic AMP inhibitor を測定することによって protocol をつくり、cyclic AMP の oocyte maturation 作用を説明している。precursor が充分にある場合は、non-cyclic AMP inhibitor がつくられるが、cyclic AMP の増加に伴って inhibitor は減少し、oocyte maturation が促される。即ち cyclic AMP の増加が oocyte maturation を促進させるという説です。

従来の cyclic AMP の oocyte maturation 抑制説に対するもので、この2説を頭においておくべきだ。

我々のデータでは主に cyclic AMP の介在で nuclear maturation の促進が調節されていることはわかるが、その機序の仮説をたてる段階にはいたっていない。

193. Cyclic GMP-stimulated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase の構造と機能について

(三重大) 山本 稔彦, 杉山 陽一

目的：Gonadotropin をはじめとする各種蛋白・ペプチドホルモンは cAMP を 2nd Messenger として作用を発現している。したがって、cAMP を分解する Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase (PDE) はこれらホルモンの生理作用の細胞内 Switch off 機構として意義を有している。そこでわれわれはこの PDE の一種である cGMP-stimulated PDE を単一蛋白にまで分離精製し、その酵素学的性格を明確にすることを目的とした。

方法：仔牛肝臓より硫酸沈澱、DE-52, DEAE-Sephacrose CL-6B, C⁸-cAMP Agarose, N⁶-cAMP Agarose を用いて同酵素の分離精製を行なった。純度の検定は Laemmli の方法、酵素活性は RI 法、蛋白濃度の測定は Bradford の方法によった。

成績：13,000倍の精製、5~10%の回収率をもつて、同酵素は SDS-PAGE 上102,000daltons の単一蛋白であることが証明された。沈降定数6.8S, Stokes radius 67 Å, Frictional ratio (f/fo) 1.7であることから、同酵素は native な状態では分子量201,000 daltons の非球形二量体として存在することが判明した。酵素活性の発現には二価金属イオンの存在を必須とし、Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺の至適濃度はそれぞれ10mM, 1mM, 0.2mM であつた。至適濃度の Mg²⁺ の存在下で Vmax (μ mol/min/mg) は170 (cAMP), 200 (cGMP), Km (μ M) は33 (cAMP), 15 (cGMP), Hill 定数は 1.8(cAMP), 1.5 (cGMP) であつた。本酵素による

cAMP の分解能は cGMP の存在下で最大32倍まで賦活化され、その K_a は $0.5\mu\text{M}$ であった。

独創点：cGMP-stimulated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase は cAMP, cGMP を分解するにあたり、Positive Cooperativity を有する特異的な酵素であるが、分離精製によつて本酵素を単一蛋白にまで純化し、世界で初めてその酵素学的性格の詳細を明らかにすることができた。

質問 (東邦大) 木下 佐
この酵素は実際に卵巣に存在しているのか。

回答 (三重大) 山本 稔彦

現在までのところ卵巣における Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase の isozymes に関する詳細な報告はない。今後同酵素の抗体を用いて局在の有無を検討したい。

194. 胎盤性5'-Nucleotide Phosphodiesterase による ADP 分解

(浜松医療センター)

佐倉 東武, 藤井 俊朗, 鶴田 晋二

5'Nucleotide Phosphodiesterase (PDEase) (E.C. 3.1.4.1) は DNA, RNA 等の 3'OH 末端より非特異的に 5' Mononucleotide を遊離する酵素で、細胞の Microsome 系に存在することが知られている。胎盤での生理的役割を推察する為に PDEase を精製し、その特徴について調べ以下の結果を得た。① PDEase は p-nitrophenyl-5'TMP を基質として、胎盤より硫酸塩析, DE52 カラム, Sephacryl S300 カラムを用いて精製し、その比活性は $11.1\mu\text{mole/h/mg protein}$ であった。② PDEase は NAD Pyrophosphatase 活性及無機燐定量法にて ADPase 活性を持つことが分つた。NAD 及び ADP に対する分解活性はそれぞれ p-nitrophenyl-5'TMP の 20% 及び 10% であった。ADPase 活性は分解産物である AMP を TLC 及び HPLC にて定量することからも確認できた。③ ADP を PDEase で前処置することにより、反応時間とともに ADP 誘発血小板凝集能は阻止された。終濃度 $5\mu\text{MADP}$ の約 30% を分解する PDEase 量で、血小板凝集は完全に抑制された。又加熱処理で反応を停止していることから PGI_2 等の凝集抑制物質による影響あるいはプロテアーゼによる血小板への直接作用はないと思われる。④ PDEase 活性は NAD, ADP, ATP, ADP-Ribose, UDP, TDP, CDP などの Pyrophosphate 結合を持つものによつていずれも抑制された。又 ADP は PDEase の競合的阻害剤であり、 $K_i = 1.52 \times 10^{-5}\text{M}$ で

あつた。2'AMP, 3'AMP, 3'5'cAMP, Adenosin では全く抑制されないが 5' Mononucleotides では PDEase 活性は抑制された。即ち PDEase は free 3'OH を持ち 5'-Phosphate を介した Phosphodiester 結合乃至は Pyrophosphate 結合に親和性を示した。⑤ PDEase 活性は EDTA, EGTA, o-Phenanthroline により完全に抑制され、 Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} により回復した。又アミノ酸の中では Histidine が抑制的に作用した。⑥ 胎児血清中の PDE 活性は $2.09\mu\text{mole/h/ml}$ と妊婦血清のほぼ 2 倍の高値を示した。以上 PDEase は ADPase として胎児胎盤の血流維持にとつて関係があるばかりでなく酸化還元反応, ADP-ribosyl 化反応に関与する NAD 量の調節因子でもあることが示唆された。

質問 (香川医大) 福岡 秀興

① ADP による血小板 2 次凝集阻止物質として Apyrase が頻用されるが、先生の抽出精製された、ADP 凝集阻止物質との character の差はどうか。

② Apyrase 添加では血小板 2 次凝集を阻害するが、本物質は一次凝集も阻止している。この差は何に由来するのか。

195. ヒト卵巣白膜に存在する Androgen Binding Protein (ABP)

(東邦大) 平川 舜, 椎名 一雄

(東京薬大) 伊藤 晃

目的：卵巣白膜の組織構築の主体はコラーゲンである。生化学的には I 型コラーゲンが解析され、また、免疫組織化学的には、III, IV, V 型コラーゲンの存在を併せ確認し既報した。今回は白膜構築コラーゲンの代謝を解明する目的の一端として、正常卵巣および PCO 白膜組織中 ABP の存在とその性状を検討した。

材料：ヒト正常卵巣白膜, PCO 白膜組織。

方法：①細胞質分画の調製, ②細胞質を [^3H] DHT とインキュベーション後 Sephadex G50 カラムによりゲルろ過, ③ショ糖密度勾配遠心法, ④ Scatchard Plot 法, ⑤結合阻害実験 (DHT, Testosterone (T), Estradiol (E_2), DHA, R1881 など), ⑥ Concanavaline A (Con-A) Affinity Chromatography。

成績：白膜細胞質のショ糖密度勾配遠心法により沈降定数 9S および 4.6S の [^3H] DHT 結合蛋白が解析された。しかし Androgen Receptor (AR) の低分子化を防ぐモリブデン酸の存在下でも、細胞質中総 [^3H] DHT 結合の 95% 以上が 4.6S に相当する。この蛋白は DHT に強い親和性を持ち、T, E_2 がこれにつぐ。AR と特異的に結合する R1881 により阻害されないこと。そ