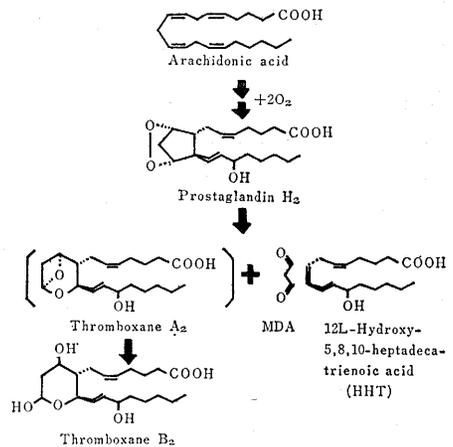


氏名	吉本谷博 よしもと たにひろ
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第514号
学位授与の日付	昭和54年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科生理系専攻
学位論文題目	Solubilization and Resolution of Thromboxane Synthesizing System from Microsomes of Bovine Blood Platelets (ウシ血小板ミクロソームのトロンボキサン合成酵素系の可溶化と分画) (主査)
論文調査委員	教授 沼正作 教授 早石修 教授 内野治人

論文内容の要旨

プロスタグランジン(PG)およびトロンボキサン(TX)は、生体内に広く分布する生理活性をもつ一群の化合物の総称である。このうち TXA<sub>2</sub> は、血小板や肺などの組織で生合成され、血小板凝集、動脈収縮等の活性をもつことが知られている。その生合成については、アラキドン酸からエンドペルオキシド型の PG(PGH<sub>2</sub>) を経由して生成した TXA<sub>2</sub> は、半減期が30秒と非常に不安定であるために分解して、上記の生理活性のない TXB<sub>2</sub> に変換すると考えられている。同時に、PGH<sub>2</sub> からマロンジアルデヒド(MDA) を遊離して、炭素数が17個のヒドロキシ酸である 12 L-hydroxy-5, 8, 10-heptadecatrienoic acid (HHT)



が生成される。この一連の反応を触媒する酵素は、血小板のミクロソームに局在するが、私達は、この TX 合成酵素を可溶化し、二つの酵素画分に分画し、各々の酵素画分について若干の性質を明らかにすると共に、上記の生合成経路を酵素の面から確認した。

抗凝固剤として 7.7 mM EDTA を添加したウシ血液から遠心分離によって洗浄血小板を調製し、音波破碎した後、10,000 × g 遠心上清をさらに、105,000 × g で遠心して得た沈澱をミクロソームとした。このミクロソームとアラキドン酸とを反応させると、TXB<sub>2</sub> と HHT の生成が認められた。この生成した TXB<sub>2</sub> と HHT の同定は、種々の化学的変換およびガスクロマトグラフィー—質量分析で行った。以上のようにして得たミクロソームを非イオン性界面活性剤である Triton X-100 で処理すると、酵素は可溶化された。この可溶化酵素を DEAE セルロースのカラムにのせると、素通りする酵素画分 A と、緩衝液濃度を上昇させて溶出される酵素画分 B とが得られた。酵素画分 A と B とを共存させ、活性化因子とし

てヘムとトリプトファンを加えてアラキドン酸を反応させると、ミクロソームの場合と同様に、 $\text{TXB}_2$  と HHT の生成が認められた。ところが、酵素画分 A を単独でアラキドン酸と反応させると、 $\text{TXB}_2$ 、HHT のいずれとも異なる反応生成物が認められた。このものは、塩化第一錫で処理すると  $\text{PGF}_{2\alpha}$  に変換することなどから、中間体の  $\text{PGH}_2$  であることが分かった。この酵素画分 A は、活性化因子としてヘムとトリプトファンを要求することなどから、ウシ精のう腺から単離・精製された PG エンドペルオキシド合成酵素と同じ性質をもつものと考えられる。また、酵素画分 B とアラキドン酸との反応では、何ら反応生成物は認められなかった。

一方、 $\text{PGH}_2$  を基質として反応させると、酵素画分 A の場合は、有意の反応生成物は認められなかったが、酵素画分 B との反応では、 $\text{TXB}_2$  と HHT の生成がほぼ 1 対 1 の割合で認められた。この酵素画分 B と  $\text{PGH}_2$  との反応は、従来から PGE 生合成の活性化因子として知られているグルタチオンによっては、ほとんど影響されなかった。

酵素画分 B と  $\text{PGH}_2$  との反応で認められる  $\text{TXB}_2$  は、生理活性をもつ  $\text{TXA}_2$  の分解産物であると考えられているが、実際にこの酵素画分 B の一次反応生成物を調べるために、血小板凝集の実験を行った。すなわち、不安定な反応生成物の分解を最少限にするために、酵素画分 B と  $\text{PGH}_2$  とを低温 ( $0^\circ\text{C}$ ) で反応させ、その一部を取って、素早くヒトの血小板浮遊液に加えて、その凝集能を時間をおいて調べると、酵素反応開始後 2～4 分で凝集能は最大に達し、以後その活性は漸減した。同時に反応液中に生成した  $\text{TXB}_2$  と HHT の量を調べると、4 分後に最高に達し、この時点で基質として加えた  $\text{PGH}_2$  はほぼ消費し尽されていた。以上のことから、酵素画分 B と  $\text{PGH}_2$  との反応で、血小板凝集能をもつ不安定な物質、おそらく  $\text{TXA}_2$  が生成し、それが分解して  $\text{TXB}_2$  に変換するものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

トロンボキサン  $\text{A}_2$  は極めて不安定な生理活性物質であって、血小板凝集、動脈収縮などの強力な生理作用を示す。本研究は、このトロンボキサン  $\text{A}_2$  のアラキドン酸からの生合成を酵素学的に検討したものである。すなわち、ウシ血小板を材料として、そのいわゆるミクロソーム画分に含まれる合成酵素系を可溶化し、アラキドン酸からエンドペルオキシド型のプロスタグランジンを生成する酵素と、この中間体をトロンボキサン  $\text{A}_2$  に変換する酵素とに分画し、それぞれの性質を明らかにした。同時に、有機合成が実際上不可能な程不安定なトロンボキサン  $\text{A}_2$  を酵素的に調製し実験に供することが出来るようになった。

このように、トロンボキサン  $\text{A}_2$  の生合成を酵素レベルで研究した結果は、循環系の生理作用の調節を明らかにする基礎的知見を提供し、また、本物質の酵素的調製法を確立したことは、生理薬理実験に実用上寄与するところが多い。

したがって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。