

氏名	大江秀雄 おお へ え ひで お
学位の種類	農学博士
学位記番号	論農博第1073号
学位授与の日付	昭和59年1月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	STUDIES ON THE EFFECTS OF METHOTREXATE AND FOLIC ACID ON THE GROWTH OF A TRYPANOSOMA, <i>CRITHIDIA FASCICULATA</i> (トリパノソーマ, <i>Crithidia fasciculata</i> の生育に及ぼすメトトレキセート及び葉酸の影響に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 岩井和夫 教授 森田雄平 教授 土井悦四郎

### 論文内容の要旨

本論文は、メトトレキセート(4-アミノ-4-デオキシ-10-メチルプテロイルグルタミン酸；以下 MTX と略記する)及び葉酸のトリパノソーマ, *Crithidia fasciculata* の生育に及ぼす影響並びに代謝について検討した結果をとりまとめたものである。

葉酸の拮抗体であり、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DFR) の特異的阻害剤として知られている MTX は、 $10^{-7}$ ~ $10^{-4}$ M で *C. fasciculata* の生育を阻害するよりも、むしろ著しく生育を促進することを見いだした。そして、その生育促進効果は葉酸の場合と同程度であることを明らかにした。その際、MTX 添加培地で生育した *C. fasciculata* の細胞内の DFR の活性は、哺乳動物の培養細胞や細菌の場合とは異なってピオプテリン添加培地で生育した細胞内の活性とほぼ同じであった。そこで、*C. fasciculata* の無細胞抽出液から DFR を分別精製し、四つの活性画分 (I, II<sub>a</sub>, II<sub>b</sub> 及び II<sub>c</sub>) を分離し、まず主画分である II<sub>a</sub> 酵素を電気泳動的に均一にまで高純度に精製してその酵素的性状を詳細に検討した。その結果、この酵素は MTX によって拮抗的に阻害されることを明らかにした。また II<sub>b</sub> 酵素は II<sub>a</sub> 酵素と酵素的諸性質は類似していたが、ジヒドロプテロイン酸のほかにもネオプテリンや 6-ヒドロキシメチルプテリンなどの酸化型プテリジン化合物をも還元し、しかもその活性は基質であるプテリジンの 6 位の置換基の立体構造に影響されるという特徴的な新しい基質特異性を有することから本酵素をプテリジンレダクターゼ：ジヒドロ葉酸レダクターゼと命名し、その性質を検討した結果、本酵素も MTX によって拮抗的に阻害されることを明らかにした。また、活性画分 I 及び II<sub>c</sub> はそれぞれ主画分である II<sub>a</sub> 酵素のポリマー及び NADPH 結合酵素であることを示した。

一方、MTX は *C. fasciculata* には葉酸輸送系を通してとり込まれ、MTX は 4-アミノ-4-デオキシ-10-メチルプテロイン酸 (以下 AMPte と略記) に代謝されることが見いだされた。また、*C. fasciculata* の無細胞抽出液中にも MTX を AMPte に、葉酸をプテロイン酸に加水分解する酵素の存在することが検出された。そこで、本酵素を葉酸加水分解酵素 (FH-酵素) と仮称し、本酵素の活性を微量で定量的に

再現性よく測定できる  $[2-^{14}\text{C}]$  葉酸を基質に用いるラジオアッセイを開発設定し、この測定法を用いて *C. fasciculata* から FH-酵素を精製単離し、その性質を検討した。その結果、本酵素は MTX 及び葉酸などの  $\alpha$ -ペプチド結合をよく加水分解したが、補酵素型のテトラヒドロ葉酸化合物には低い活性しか示さず、また、葉酸の  $\gamma$ -ジグルタミン酸誘導体であるテロプテリンには全く作用しなかった。しかし、Z-Phe-Ala や Z-Gly-Tyr のような芳香族アミノ酸から成るカルボベンゾキシ-L-アミノ酸のジペプチド、並びに Z-Phe や Z-Glu のようなカルボベンゾキシ-L-アミノ酸をよく加水分解する特性を有しており、新しいタイプのカルボキシペプチダーゼであることを明らかにした。また、これらの結果から、この FH-酵素が *C. fasciculata* に対する MTX 及び葉酸の生育促進作用発現のための初発反応に関与する酵素であることを考察している。

### 論文審査の結果の要旨

*Crithidia fasciculata* は蚊に寄生するトリパノソーマの一種で、その生育には、特に血色素のほかに、ピオプテリンのような微量の 6-アルキルプテリンまたは比較的少量の葉酸を必要とすることが知られている。一方、メトトレキサート (MTX) は B 群ビタミンの一つである葉酸の拮抗体であって、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DFR) の特異的阻害剤として知られており、臨床的には急性白血病やある種の悪性腫瘍の化学療法剤として使用されている化合物である。

本論文では、このような葉酸の拮抗体である MTX が *C. fasciculata* の生育を抑制しないばかりでなく、却って生育を促進する現象を見だし、この *C. fasciculata* の生育に及ぼす MTX 及び葉酸の影響、並びにそれらの代謝について *in vivo* 及び *in vitro* で検討している。

まず、*in vivo* の実験によって MTX は葉酸と同程度の  $10^{-7}$ ~ $10^{-4}$ M で *C. fasciculata* の生育を著しく促進することを見だすとともに、その際の細胞内の DFR 活性には特に上昇は認められないことを明らかにした。つぎに、*C. fasciculata* の DFR にはジヒドロ葉酸に基質特異性を有する II。酵素のほかに、基質特異性を異にする II。酵素が存在することを見だし、その酵素的諸性質を検討して、この酵素はプテリジンレダクターゼ：ジヒドロ葉酸レダクターゼと命名されるべきものであることを明らかにしたが、これらの両酵素はいずれも MTX によって拮抗的に阻害された。

そこで、*C. fasciculata* による MTX のとり込み及び代謝について検討した結果、MTX は葉酸の輸送系を通してとり込まれ、4-アミノ-4-デオキシ-10-メチルプテロイン酸 (AMPte) に代謝されることを単離実験によって実証することに成功した。また、*C. fasciculata* の無細胞抽出液中には MTX を AMPte に、葉酸をプテロイン酸に加水分解する酵素が存在することを見いだした。そこでこの酵素を葉酸加水分解酵素 (FH-酵素) と仮称し、 $[2-^{14}\text{C}]$ -葉酸を基質に用いる本酵素の新しい活性測定法を設定し、この方法を用いて大量の *C. fasciculata* から本酵素を高純度に精製単離し、その酵素的諸性質を検討した。その結果、FH-酵素は、MTX 及び葉酸などの  $\alpha$ -ペプチド結合はよく加水分解するが、補酵素型のテトラヒドロ葉酸化合物に対しては分解活性が低い性質を有し、かつ、芳香族アミノ酸から成るカルボベンゾキシ-L-アミノ酸のジペプチドやカルボベンゾキシ-L-アミノ酸はよく加水分解する特性を有する新しいタイプのカルボキシペプチダーゼであることを実験的に明らかにしている。また、これらの結果から、FH-酵

素は MTX 及び葉酸が *C. fasciculata* に対して生育促進作用を発現するための初発反応に関与する酵素であることを考察している。

以上のように、本論文はこれまでほとんど全く未開拓であった原生動物における MTX 及び葉酸の代謝について重要な新知見を与えるものであってビタミン学並びに生化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、昭和58年11月30日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、農学博士の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。