

名 氏 大 木 史 郎  
おお き し ろう  
 学位の種類 薬 学 博 士  
 学位記番号 論 薬 博 第 227 号  
 学位授与の日付 昭 和 55 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 Prostaglandin hydroperoxidase に関する研究

(主 査)  
 論文調査委員 教授 冨田謙吉 教授 山科郁男 教授 高木博司

論 文 内 容 の 要 旨

Endoperoxide 型の Prastaglandin (PG) には PGG と PGH の 2 種類があり各臓器で種々の PG あるいは thromboxane に変換し、その臓器の機能に対応した生物活性を発現する。さらに前駆体の不飽和脂肪酸に酸素添加して PGG を生じ、その PGG が PGH に変換した後、この PGH より PGE が生成されるという経路がウシ精のう腺ミクロソームより可溶化精製された酵素を用いて明らかにされている (図 1)。本論文は PGG の PGH への変換のステップ、つまり PGG の 15-hydroperozide の酸素原子間の結合が開裂し水酸基に還元されて PGH を生ずるステップの酵素反応について詳細に検討した結果を述べ、その反応機構を考察しようとするものである。

酵素は既報の方法(1)に従って、ウシ精のう腺ミクロソームより可溶化したものを、DEAE-セルロースカラムクロマトと等電点分画によって精製した。基質として用いた PGG<sub>1</sub> は、ホモ- $\gamma$ -リノレン酸を Mn-プロトポルフィリンの存在下に酵素と反応させて調製した。

酵素の性質に関する基礎的知見としては、酵素 PGG<sub>1</sub> とを反応させると、反応開始後30秒以内に PGH<sub>1</sub> が急速に生成し基質がまだ十分に残っているにもかかわらずほぼ1分間で反応が停止してしまうという特徴的な時間経過を示した。PGG<sub>1</sub> の PGH<sub>1</sub> への変換の初速度は、用いた酵素量に比例して増大した。酵素活性にはヘムを必要とし、ヘマチン 10  $\mu$ M 以上で最大活性が認められたが、トリプトファン等後述の化

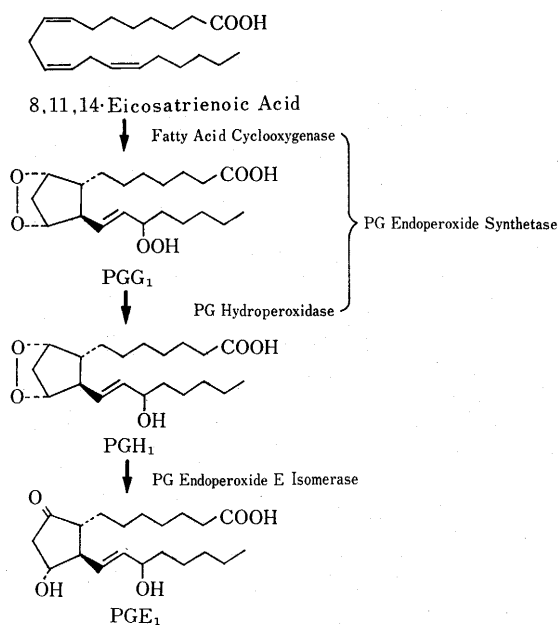


図 1 PGE の生合成経路

合物を加えることにより、ヘマチンの飽和濃度は  $1\mu\text{M}$  に低下すると共に、最大活性は約 2 倍に上昇した。

$\text{PGG}_1$  の  $\text{PGH}_1$  への酵素的変換に対する種々の物質の効果を調べてみると、グアヤコール、エピネフリン、ベンジン、フェニレンジアミン、フェノール等の一般に peroxidase の水素供与体になるものが、低濃度で著明な促進効果を示すことがわかった。これらの水素供与体は反応中に脱水素されることが、そのスペクトル変化で明らかになり反応後の  $\text{PGH}_1$  の生成量と脱水素された水素供与体との定量的関係は約 1:1 であった。このことより上記の水素供与体の存在する場合の  $\text{PGG}_1$  より  $\text{PGH}_1$  への酵素反応は、 $\text{PGG}_1$  の 15-hydroperoxide を水素受容体とする peroxidase 反応で進行しているものと考えられる。水素受容体の特異性を調べると、この酵素は過酸化水素及び有機過酸化物も有効ではあるが  $\text{PGG}_1$  及びその他の 15-hydroperoxide をもつ PG 類縁体に対して特に高い親和性を示すと共に最大活性も高い値を示した。

トリプトファンは、この酵素反応の代表的な促進因子として以前より用いられてきた。このトリプトファンの存在下に酵素と  $\text{PGG}_1$  とを反応させると、生成した  $\text{PGH}_1$  の量に見合ったトリプトファンの変化は認められず、この場合は単純な peroxidase 反応とは異なる反応機構が存在すると考えられる。

上記のように、本酵素は hydroperoxide に作用する酵素で特に PG の構造を持つものに高い親和性を示すという意味で、PG hydroperoxidase と命名した。この PG hydroperoxidase と  $\text{PGG}_1$  を生成する酸素添加酵素とは現在のところ別個の蛋白としては分離できず、このことは酵素学的に興味ある問題である。

- (1) Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S., and Hayaishi, O. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2629-2636

### 論文審査の結果の要旨

プロスタグランディン (PG) はシクロペンタン環を含む炭素数 20 の不飽和モノカルボン酸の誘導体であって広範な生理活性をもつ一群の化合物である。このうち PGE 合成の酵素系については、宮本らによりウシ精のう腺のミクロソームの界面活性剤による可溶化、分画により、例えば  $\text{PGE}_1$  は、8, 11, 14-eicosatrienoic acid  $\xrightarrow[\text{ヘム}]{\text{酵素 I}}$   $\text{PGG}_1$   $\xrightarrow[\text{ヘム, Try}]{\text{酵素 I}}$   $\text{PGH}_1$   $\xrightarrow[\text{GSH}]{\text{酵素 II (PG Endoperoxide isomerase)}}$   $\text{PGE}_1$  のように 2 つの酵素が関与して生成されることが判明した。しかしながら、酵素 I (PG Endoperoxide synthetase) は高度に精製されながら、不飽和脂肪酸  $\rightarrow$   $\text{PGG}$  (Endoperoxide-15-hydroperoxide 体)  $\rightarrow$   $\text{PGH}$  (Endoperoxide 体) という 2 つの酵素活性をもち、それぞれの活性をもった酵素蛋白への分離は困難でその反応機構に関しては不明の点が多かった。そこで著者は、 $\text{PGG} \rightarrow \text{PGH}$  変換の酵素反応を詳細に検討して以下の諸点を明らかにした。(1)ウシ精のう腺より精製した酵素 I による  $\text{PGG}_1 \rightarrow \text{PGH}_1$  変換は極めて速かで、その初速度は酵素量に比例して増大する。酵素活性にはヘムが必要で、例えばヘマチン 10 mM 以上で最大活性が認められるが、エピネフリン、グアヤコール、トリプトファンの添加により、ヘマチンの飽和濃度は約 1 mM に低下、酵素の最大活性も約 2 倍に上昇する。(2)酵素 I に Catalase 活性は認められるものの、 $\text{PGG}_1 \rightarrow \text{PGH}_1$  変換に伴う  $\text{O}_2$  の放出はなく、Catalase による dismutation 機構は考えにくい。(3)酵素 I には GSH (グルタチオン) peroxidase 活性は認められず、また GSH を添加しても  $\text{PGG}_1 \rightarrow \text{PGH}_1$  変換

は促進されない。(4)反応促進物質のうち、エピネフリン、グアヤコールは  $\text{PGH}_1$  の生成量と 1:1 の関係で脱水素されるので、水素供与体存在下での反応は、 $\text{PGG}$  の 15-hydroperoxide を水素受容体とする一種の peroxidase 反応と結論される。この酵素は  $\text{H}_2\text{O}_2$  及び有機過酸化物をも基質とするが、 $\text{PGG}_1$  及び他の 15-hydroperoxide をもつ PG 類縁体に特に親和性が高い。(5)しかし、代表的促進因子トリプトファンには、 $\text{PGG}_1 \rightarrow \text{PGH}_1$  変換に伴う定量的変化は認められず、単純な peroxidase 反応だけでは説明できない点もある。トリプトファンは、ヘムの酵素への親和性上昇と酵素の安定化に貢献している可能性がある。(6)以上の結果よりこの酵素を PG hydroperoxidase と命名した。従って、PG endoperoxide synthase は、Fatty acid cyclooxygenase と PG hydroperoxidase と 2 つの酵素活性をもち、基質に応じてそれぞれの活性を示すものと思われる。

以上の成果は、PG の生合成経路ならびにその制御機構の一端を解明したもので、PG の基礎研究に寄与するところが大きい。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認定する。