

氏 名	渡 邊 恭 良 わた なべ やす よし
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医 博 第 563 号
学位授与の日付	昭 和 55 年 7 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	Stereospecificity of Hepatic L-Tryptophan 2, 3-Dioxygenase (動物肝臓のL-トリプトファン2原子酵素添加酵素の立体特異性)

論文調査委員 (主査) 教授 沼 正 作 教授 村 地 孝 教授 早 石 修

論 文 内 容 の 要 旨

トリプトファン2原子酵素添加酵素(以下、TPOと略す。)は、哺乳動物の肝臓、昆虫、細菌などに見出し、必須アミノ酸であるトリプトファンを基質として、生体に重要なNADやオモクロームなどの生合成、トリプトファン完全分解系などの初発反応を触媒する酵素として重要視されている。TPOは、ラット肝臓及び緑膿菌より分離精製されて諸性質が明らかにされ、特にヘムを含む2原子酵素添加酵素であるので、酵素添加酵素の反応機構のモデルとして、当研究室を中心に活発な研究がなされてきた。

従来、TPOは、基質としては、トリプトファンの天然型(L体)に高度に特異的であるとされてきた。ところが、栄養学的研究において、光学異性体で非天然型のD体のトリプトファンを動物に投与すると、尿中に多量のD-キヌレニンが検出されることが知られた。よって、その起源について、当研究室では肝臓以外の臓器を検索して、ウサギ小腸においてトリプトファンのD、L両体のみならず、他のインドールアミン体をも広く基質とするインドールアミン2原子酵素添加酵素(IDO)を発見した。しかし、我々は、このIDOの臓器分布をD-トリプトファンを用いて検索する際に、ウサギ肝臓を調べると、かなりの量のD-キヌレニンが生成することを発見した。この発見により、IDOの様にD体にも働く酵素がTPOと共に肝臓に存在するのか、又は、TPOが、従来の知見に反し、D体にも働くのか、いずれかという疑問が生じた。

そこで、まず、ラジオアイソトープを用いた感度の高い酵素 assay 法を開発し、いろいろな哺乳動物の肝臓を調べてみると、どの動物の肝ホモジネート上清にも有意なD-トリプトファンの開裂活性(以下、D型活性)を見出した。マウス肝のD型活性が抜きんでて高く、又、L型活性との比も高いので、マウス肝を用いてD型活性の起源を検討した。TPOは、ハイドロコチゾンやL-トリプトファンの腹腔内投与で特異的に誘導されることが知られているが、この処理でマウス肝のD型、L型両活性が等比で上昇した。よって、この両活性を持つ分画を集めながら、ヘム酵素の新しい精製法である安定化剤としてCOガスを用いる方法を開発し、酵素を均一に迄、精製した。精製各段階での両活性の量比(1/4)は変わ

らず、電気泳動上、均一な標品もD、L両体に働く。熱処理や種々の阻害剤に対する挙動も両活性は等しく、両活性が単一の酵素に拠ることを示唆した。精製酵素の分子的性状は、ラット肝のTPOと類似して、ウサギ小腸・マウス副睾丸よりのIDOと異なる。又、この酵素は、IDOに特徴的な他の性質も持たないことから判断してもTPOと呼ぶことができる。以上の結果は、TPOが、従来の知見に反し、トリプトファンをD体をも基質とすることを明らかにした。

従来の報告と我々の結果との差違に関して、我々の精製酵素を用いて反応条件を検討すると、従来よりL-トリプトファン開裂活性を測定する為に用いられてきた濃度のアスコルビン酸や過酸化水素発生系では、D体が基質の際には、酵素の著しい失活がおこることが観察された。即ち、L体が基質であると同時にTPOを安定化させる能力があるのに対し、D体はTPOを安定化しない。そこで適切な反応条件を再検討したが、アスコルビン酸単独では、L体が基質の時ですえ、約2/3の酵素活性しか検出できないことが判明した。我々の開発した反応系（メチレンブルー・カタラーゼ・アスコルビン酸を含む）では、ラット肝より精製したTPOでも、十分にD-型活性が測定できた。一方、緑膿菌のTPOは、D体と全く反応しなかった。

これらの結果より、動物肝臓のTPOは、従来の報告に反し、D体のトリプトファンを基質とすること、又、緑膿菌のTPOとはこの点で、決定的に異なること、更には、従来の酵素反応条件では、肝より精製したTPOはfull activityが見られていないことが判明した。これらの知見は、酵素の反応機構・活性部位の構造などの研究に寄与する。

論文審査の結果の要旨

ヒトをはじめ動物体内には、肝臓に局在し生体に必須なニコチン酸合成経路の初発段階を担うトリプトファン2原子酸素添加酵素（TPO）と、全身に分布し様々なインドールアミンを分解するインドールアミン2原子酸素添加酵素（IDO）とが知られている。前者はトリプトファンのL体のみを基質とされてきたが、後者の基質特異性は広く、光学異性体のD体にも働く。著者らは、D体のトリプトファンを用いて、IDOの臓器分布を検索する際に、肝臓上清に有意にその開裂活性を見出した。この発見により、IDOが肝臓に存在するか、又は、TPOが従来の定説に反し、D体をも基質とするかが検討された。至適反応条件を確立し、ヒトなど多くの哺乳動物の肝臓、及び、マウス肝より純品に精製した酵素について詳細に調べた結果、肝臓のTPOはD体をも基質とし、細菌のTPOとこの点で全く異なること、IDOが肝臓に有意に存在しないことを明らかにした。酵素学的な意味において、この結果及び精製酵素の性質は、TPOの反応機構・活性部位の構造に関する研究に大いに寄与するものと考えられる。

従って、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。