

氏 名 堀 真 一 郎
ほり しん いち ろう

学位の種類 医学 博士

学位記番号 医 博 第 472 号

学位授与の日付 昭和 50 年 5 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 **Effects of Sulfhydryl Agents on the Activation of
Tryptophan-5-monooxygenase from Bovine Pineal
Glands**

(牛松果体のトリプトファン水酸化酵素の活性化に及ぼすスルフハ
イドリル剤の効果について)

論文調査委員 (主査)
教授 藤原元始 教授 井上 章 教授 早石 修

論 文 内 容 の 要 旨

Tryptophan-5-monooxygenase (EC 1.14.16.4) は還元型 pterin を助酵素として, L-tryptophan の 5 位に分子状酸素 1 原子添加する 1 原子酸素添加酵素である。哺乳動物組織での本酵素は Schindler (1958) により悪性形質細胞腫を用いて始めてその存在を *in vitro* で証明され, その後 Carcinoid tumor (Graham-Smith, 1964), 脳幹部 (Graham-Smith, 1964), 松果体 (Lovenberg et al, 1967), 血小板 (Lovenberg et al, 1968) に於ける *in vitro* での活性存在が次々と報告された。中枢神経系内での本酵素活性の分布に関しては未だ研究者間で相違があるが, その分布と神経化学伝達物質の 1 種と考えられる serotonin の分布とはよく一致しており, 本酵素が serotonin 生合成の律速酵素である (Jequier et al, 1967; Green et al, 1968) と考えられている。更に, Lovenberg ら (1967) は松果体に強い本酵素活性の存在を報告し, 本酵素は melatonin 生合成の第 1 段階をも触媒している。しかし, 本酵素の酵素的性質の解明は未だ充分ではない。例えば, 本酵素の *in vitro* での酵素反応に, sulfhydryl 剤及び二価鉄の添加が必要であると悪性形質細胞腫 (Sato et al, 1967), 松果体 (Jequier et al, 1969), 脳幹部 (Lovenberg et al, 1967; Ichiyama et al, 1970), 鶏の Spindle cell (Sorimachi et al, 1973) で報告されたが, それらの酵素反応への関与については研究室間で相異なる報告がなされている。即ち, sulfhydryl 剤の添加効果は助酵素である不安定な pterin の還元型を保護する作用によるので, tetrahydropterin を酵素的に再生する系の添加によって, 全く代用される (Friedman et al, 1972) と主張される一方, sulfhydryl 剤は助酵素の安定化のみならず, 酵素自身に作用し, 酵素活性の増強をもたらす (Sjoerdsma et al, 1970) とする主張がなされている。二価鉄の添加効果に於ても, 酵素反応自身に二価鉄が関与している (Lovenberg et al, 1968) とする主張と還元型 pterin の自然酸化の際に生ずる過酸化水素を二価鉄が分解し, 過酸化水素による酵素の不活性化を防いでいるのであり, 二価鉄の添加は catalase の添加により代用しうる (Friedman et al, 1972) とする主張がなされている。

私達は近年 (FEBS LETTERS, 1974), 牛松果体から部分精製した tryptophan-5-monooxygenase が

dithiothreitol と二価鉄の存在下で嫌氣的に前処理することにより 50 倍以上の活性増強されることをみいだした。本論文ではこの問題を更に検索し、次のことを明らかにした。活性化は酵素を還元型の sulfhydryl 剤で前処理することにより観察される。二価鉄、水素化ホウ素、dithionite、ascorbate などの還元剤の添加は活性化速度を促進するが、それらのみでは酵素の活性化はおこし得ない。還元型の sulfhydryl 剤ならば、dithiothreitol, cystein, cysteamine, cystein ethylester, N-acetylcystein, 2-mercaptoethanol 及び還元型 glutathione のいずれによっても活性化は観察される。活性化の程度は前処置時の sulfhydryl 剤の濃度と酵素蛋白量の相互の量的関係によっている。活性化現象の動的解析から、活性化現象には酵素中の二つ以上の部位が関与していると推定され、その内の 1 つには二価鉄などの還元剤により作用をうけるが、他の部位は sulfhydryl 剤によってのみ作用を受けると推測された。なお、助酵素である tetrahydropterin を酵素的に再生する系によっては酵素の活性化は観察されなかった。これらの実験結果から、種々の酵素添加酵素に於いて報告されているが如く、tryptophan-5-monooxygenase に於いても不安定な mercaptan の存在が示唆され、sulfhydryl 剤はこれに対し作用し、それを還元することにより酵素自身を活性化していると考えられる。更に、二価鉄に関しては、活性化処置前の酵素では既に報告されているが如く、二価鉄の添加により酵素活性の増強が観察されるが、活性化処置後にはその効果は認められない。しかし鉄のキレート剤により活性化処置前及び後の酵素共、その活性が阻害されることから、酵素中におそらく存在するであろう鉄が酵素反応に何らかの役割を演じているものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

Tryptophan-5-monooxygenase は還元型 pteridine を助酵素として、L-tryptophan の 5 位に水酸基を導入する一原子酸素添加酵素である。本酵素は serotonin 生合成の律速酵素と考えられているが、その酵素学的性質には不明な点が多い。著者は牛松果腺から部分精製した酵素を用い、種々の SH 剤で酵素を前処置することにより活性が約 50 倍以上増強されることを認めた。二価鉄、水酸化ホウ素、アスコルビン酸などの還元剤は SH 剤による活性化速度を促進するが、それのみでは無効である。活性化現象の動的解析から、以上の活性化現象には酵素中の二つ以上の部位が関与しているものと推定され、その中のひとつは SH 剤の作用を受け、他のひとつは還元剤の作用をうけるものと考えられる。前者は恐らく酵素たん白の SH 基であり、後者は酵素中に存在する金属であろうと結論された。以上の研究は生理的にきわめて重要な tryptophan-5-monooxygenase の活性化現象を発見し、詳細な解析を加えて本酵素の生体内におけるあり方に興味ある示唆を与え、セロトニン生合成経路の解明に寄与するところが大きい。

よって、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。