

氏 名	荻 野 誠 周 おぎ の のぶ ちか
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医 博 第 496 号
学位授与の日付	昭 和 53 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	Prostaglandin Endoperoxide E Isomerase from Bovine Vesicular Gland Microsomes, a Glutathione-requiring Enzyme (ウシ精のう腺ミクロソームのプロスタグランジンエンドペルオキシドE異性化酵素, グルタチオン要求性酵素)

(主査)
論文調査委員 教授 沼 正 作 教授 佐野晴洋 教授 早 石 修

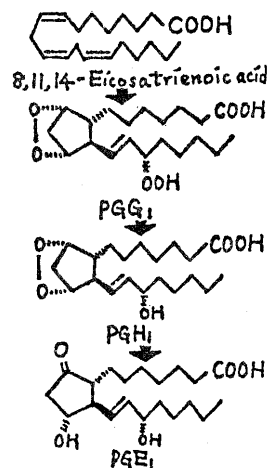
論 文 内 容 の 要 旨

プロスタグランジン (PG) Eは主として平滑筋に作用する生理活性物質である。その生合成は右図のように、不飽和脂肪酸からエンドペルオキシドをもつ PGG₁および PGH₁を経由しておこなわれる。この最終段階の反応を触媒する異性化酵素はミクロソームに局在する膜結合酵素である。我々は、この異性化酵素の可溶化と部分精製を行い、その酵素標品を用いて、従来あいまいであった PG 生合成におけるグルタチオン (GSH) の役割を明らかにした。

酵素源として、ウシ精のう腺を用い、遠心分画で得たミクロソーム画分を1%ツィーン20で処理すると、酵素は可溶化された。この可溶化酵素はDEAEセルロースカラムクロマトグラフィー、アセトン沈澱、次いで ω -アミノブチルセファローズ 4B 疎水性クロマトグラフィーを行うことにより、ミクロソーム画分から約26倍に部分精製された。酵素活性測定には、[1-¹⁴C] PGH₁を GSH の存在下で酵素と1-2分間反応させ、溶媒抽出物をシリカゲル薄層クロマトグラフィーで分離し、放射活性を測定した。

部分精製酵素はpH7~8で最も活性が高く、その1mgは毎分1.9 μ mol のPGH₁をPGE₁に異性化した。PGH₂もほぼ同じ反応速度でPGE₂に異性化された。PGG₁も PGH₁ のほぼ半分の反応速度で基質となり、PGG₁は15-ヒドロペルオキシPGE₁に、PGG₂は15-ヒドロペルオキシPGE₂に変換した。基質に対するK_m値は、PGH₁で10 μ M, PGG₁で50 μ Mであった。

異性化酵素は極めて不安定で、室温では約30分の半減期で失活した。ところが種々のチオール化合物を加えると、酵素は顕著に安定化され、1mM の濃度では GSH, ジチオスレイトール, メルカプトエタ



ノール, システイン等いずれも有効で, 室温 2 時間でほとんど失活が認められなかった。それ故, 前述の酵素の精製は常に 1mM の GSH の存在下で行った。

本酵素による PG エンドペルオキシドの異性化反応は GSH の存在を必要とした。GSH 以外の種々のチオール化合物は無効で, 酵素反応は特異的に GSH の存在下でのみ認められ, 酵素反応速度は GSH 濃度に従って上昇し, 約 1mM で飽和した。GSH の酸化型は無効であった。また, 酵素と基質が結合した状態で, 特に不安定となって失活することを, GSH が防止するのではないかという可能性は, 次の実験で否定された。すなわち, 酵素と基質を前もって接触させ, GSH を添加して反応を開始すると, 接触時間にかかわらず, 同じ初速度で反応が進行した。このように, GSH は酵素の単なる安定化剤として作用しているのではなく, 酵素反応に必要な補酵素として作用していると思われる。

不飽和脂肪酸からの PGE 生合成を GSH が促進することは, 以前から多くの研究者が認めていたが, どの段階に必要なかは明確でなく, また GSH が定量的に酸化されると考えられていた。前述の実験結果から GSH が必要なのは PGH から PGE への異性化反応であることが明らかとなった。また, この反応はストイキオメトリーからみて, 酸化還元反応を伴わない反応であって, 実際, 本酵素標品を用いた実験で PGH から PGE への変換に際して, GSH はほとんど酸化されないことが見出された。したがって一般的には酸化還元助酵素と考えられている GSH が, 本酵素反応のような異性化反応では, 別種の反応機構で働いているものと思われる。

論文審査の結果の要旨

本研究は, ウシ精のう腺のプロスタグランジンエンドペルオキシド E 異性化酵素を, ミクロソームから可溶化し, 約 26 倍に部分精製して, その基質特異性, 安定性ならびにグルタチオン要求性を検討したものである。本酵素は, G 型および H 型のプロスタグランジンのエンドペルオキシド部分を開裂して E 型のプロスタグランジンを生成する。また従来, 不飽和脂肪酸からのプロスタグランジン E 生合成を促進する因子として知られていたグルタチオンが, この異性化反応に関与することが酵素学的に証明された。グルタチオンには, 本来極めて不安定な異性化酵素を安定化する作用もあることが見出されたが, この安定化作用の他に, グルタチオンは本酵素による異性化反応に必須の補酵素であることが明らかにされた。

プロスタグランジンの多彩かつ重要な生理作用を考えると, 本研究によって明らかにされた酵素学的知見は, この重要な生理活性物質の生合成をよりよく理解する基礎となるものである。さらに, 従来酸化還元反応の補酵素として知られていたグルタチオンが, 本酵素反応のような酸化還元レベルに変化のない異性化反応にも関与するという知見は, 酵素反応機構上, 極めて興味ある問題である。

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。