

氏 名	西 岡 謙 治 にし おか けん じ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	論 医 博 第 741 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 7 月 24 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	Particulate Tyrosinase of Human Malignant Melanoma: Solubilization, Purification Following Trypsin Treatment, and Characterizaion (ヒト悪性黒色腫のチロシナーゼ：可溶化，トリプシン処理後の精製およびその性状)
論文調査委員	(主 査) 教 授 沼 正 作 教 授 佐 野 晴 洋 教 授 早 石 修

論 文 内 容 の 要 旨

メラノーマ（悪性黒色腫）は，メラニン産生細胞であるメラノサイトの悪性化した腫瘍である。一般にメラノーマは，急速に増殖進展し極めて悪性度が高いに拘わらず，メラノサイトの分化した機能であるメラニン合成能を合せ持っている事をその特徴としている。メラニンは，チロシナーゼの触媒作用によるチロシン→ドーパ（L-3,4-dihydroxyphenylalanine）→ドーパキノンの2段階の酸化反応の後，酵素の関与しない一連のラジカル反応を経て生合成されと考えられている。このようにチロシナーゼは，メラニン生合成における key enzyme として重要な役割を果している。チロシナーゼは，広く自然界に分布し特にキノコのチロシナーゼは，詳細に研究されている。しかし動物のチロシナーゼに関する研究は，少くその大半は，マウスおよびハムスターのメラノーマにおけるチロシナーゼの研究である。動物メラノーマのチロシナーゼには，チロシナーゼ T¹，T² および T³ の3種類が存在する事が知られている。チロシナーゼ T¹ と T² は，可溶性アイソザイムと考えられている。しかし大部分のチロシナーゼ活性は，チロシナーゼ T¹，T² とは全く異りメラニン生合成のオルガネラであるメラノソームに結合した不溶性な酵素として存在しチロシナーゼ T³ と呼ばれている。

そこで著者は，殆んど研究のなされていないヒトメラノーマのチロシナーゼ特にチロシナーゼ T³ の細胞内の動態を明らかにする事を目的として，チロシナーゼ T³ の可溶化精製を試み本酵素の生化学的特性の変動を検討した。

ヒトメラノーマ組織ホモジネート 100,000 g 沈澱画分をコール酸処理により可溶化した後，硫酸分画，DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー，コンカナバリンAアフィニティークロマトグラフィーおよびセファデックス G-150 カラムによるゲル濾過の精製過程を経て，1,500倍に精製されたチロシナーゼを得た。このチロシナーゼ T³ 標品をトリプシン処理し，その経時的变化をドーパ（チロシナーゼ活性）およびクマシーブリリアントブルー（蛋白）染色を用いてゲル電気泳動により追跡した結果，チロシナーゼ T³ のバンドは，時間の経過とともに減少し，同時に陽極へ大きい移動度を示すチロシナーゼが現れる

事が観察された。そこでこのトリプシン処理チロシナーゼの精製を試み、セファデックス G-150 を用いるゲル濾過および DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによりゲル電気泳動的に単一の標品として単離した。このようにして得られたトリプシン処理チロシナーゼは、分子量66,700の可溶性糖蛋白であり、そのシアル酸含量は、約4%であった。また本酵素標品1分子当り2分子の銅が検出された。この酵素標品とヒトメラノーマの可溶性チロシナーゼ T^1 の電気泳動による易動度は、全く一致した。この事実は、不溶性チロシナーゼ T^3 が、トリプシン様プロテアーゼ作用により可溶性チロシナーゼ T^1 に変換する事を示唆する。さらにこのトリプシン処理チロシナーゼをノイラミダーゼ処理しゲル電気泳動で追跡したところ、陽極への易動度は、減少し可溶性チロシナーゼ T^2 と同一の易動度を示した。この結果は、トリプシン処理チロシナーゼがさらにノイラミダーゼ処理によりそのシアル酸残基を遊離して、ゲル電気泳動で陽極への易動度の小さい可溶性チロシナーゼ T^2 へと変換される事を示唆している。

以上の実験結果より著者は、ヒトメラノーマ細胞においてチロシナーゼは1種類であり、メラノソームに結合した不溶性チロシナーゼ T^3 として存在し、トリプシン様プロテアーゼおよびノイラミダーゼにより酵素的修飾を受け、 $T^3 \rightarrow T^1 \rightarrow T^2$ の変化を生じる可能性を指摘した。

論文審査の結果の要旨

動物のメラノーマでは従来から不溶性のチロジナーゼ T^3 と可溶性のアイソザイムと考えられる T^1 と T^2 が知られている。著者はヒトのメラノーマの不溶性チロジナーゼをコール酸で可溶化し、約1500倍精製することに成功した。この精製チロジナーゼ T^3 標品をトリプシンで処理し、さらに精製して得られた標品はゲル電気泳動的に単一で分子量約66,700、銅2原子を含み、また約5%のシアル酸をもつ糖蛋白である。この酵素標品はヒトの可溶性チロジナーゼ T^1 と電気泳動による易動度が完全に一致するが、さらにノイラミニダーゼで処理すると可溶性チロジナーゼ T^2 と一致する易動度を示した。以上の実験結果はヒトのメラノーマ細胞のチロジナーゼは元素一種類で不溶性の T^3 がプロテアーゼおよびノイラミニダーゼにより酵素的修飾を受け $T^3 \rightarrow T^1 \rightarrow T^2$ の変化をとげることが示唆されている。以上の研究はヒトのメラノーマのチロジナーゼの多様性を解明し、癌の診断治療にも寄与するところが多い。

したがって、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。