

氏 名	塚 本 幾 代
	つかもと いくよ
学位の種類	医学博士
学位記番号	医 博 第 531 号
学位授与の日付	昭和 54 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	医学研究科社会医学系専攻
学位論文題目	The Role of Zinc with Special Reference to the Essential Thiol Groups in δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase of Bovine Liver (ウシ肝 δ -アミノレブリン酸脱水酵素における亜鉛の役割に関する 研究, 特に亜鉛と SH 基との関係について)

(主 査)
論文調査委員 教授 早 石 修 教授 沼 正 作 教授 佐野晴洋

論 文 内 容 の 要 旨

δ -アミノレブリン酸脱水酵素は、2分子の δ -アミノレブリン酸が脱水縮合し、ポルフォビリノーゲンを生成する反応を触媒する酵素であり、分子量 35,000 のサブユニット 8 個から構成されている。本酵素は SH 試薬及び重金属（特に鉛）によって阻害される SH 酵素であり、従来その酵素活性測定には β -メルカプトエタノール、ジチオスレイトール (DTT) 等の SH 還元剤による活性化が必要とされていた。また、哺乳類の本酵素は Zn を含む金属酵素ともいわれてきたが、その含量は一定せずその役割も不明であった。筆者は、ウシ肝臓から高度に精製した酵素を用いて本酵素の活性中心、特に Zn についてその含量・役割及び活性に必須な SH 基との関係に関する研究を行った。

ウシ肝臓からの精製過程に β -メルカプトエタノール (10 mM) と Zn (10 μ M) を添加して得られた本酵素の精製標品は、活性測定時に SH 還元剤による賦活を必要とせず、サブユニット当り 8 個の SH 基を有しており S-S 橋を含まなかった。また、サブユニットと当量の DTNB によって 2 当量の SH 基が修飾され同時にこの時失活することから、本酵素には S-S 橋を形成するに十分近い距離に 2 個の SH 基が存在しており、活性に必須な SH 基はこれらの SH 基の中に含まれていることが明らかになった。

本酵素の Zn に関しては、精製標品の Zn の定量の結果、サブユニット当り 1 個の Zn を含んでいることが判明した (ホロ酵素, Zn 1.0 atom/subunit)。さらに Zn を EDTA で除去した酵素 (アポ酵素, Zn < 0.1 atom/subunit) への Zn の結合実験において、添加した Zn はサブユニット当り 1 原子結合するまでは、強い親和力をもってアポ酵素に結合したが、1 個以上はほとんど結合しなかった。この結果から、本酵素にはサブユニット当り 1 個の Zn の結合部位が存在することが判明した。

そこで Zn が本酵素の中でいかなる役割を果たしているかを調べるために、本酵素から Zn を EDTA で除去した。その結果、アポ酵素は嫌気下ではホロ酵素と同程度の活性を有していたが、好気下では速やかに酸化され 2 個の SH 基の減少 (1 個の S-S 橋の形成) によってほぼ完全に失活した。すなわち、本酵素の活性発現には 1 ~ 2 個の SH 基が必須であるが、Zn は触媒作用に直接には関与していないこと

が判明した。一方、ホロ酵素は空気下ではほぼ安定であるが、酸素を吹きこむと SH 基が減少すると同時に失活と Zn の離脱がみられた。サブユニット当り 2 個の SH 基の減少ではほぼ完全に失活し、Zn も 40% に減少した。同様に、ホロ酵素の SH 基を DTNB, 1,3-dibromoacetone, あるいは重金属 (Ag, Pb) によって修飾した場合も、SH 基の修飾に伴って失活と Zn の離脱が認められた。すなわち、Zn の除去によって SH 基が酸化されやすくなり、逆に SH 基の修飾によって Zn が離脱するという事実から、本酵素中で Zn がシステイン残基と強い相互作用を有していることが示唆された。さらに、酸化アポ酵素が SH 還元剤の存在下でのみ再び Zn を結合すること、高濃度の DTT による処理で Zn の遊離がみられること、Zn を除去することによって 2 個の SH 基の DTNB に対する反応性が高くなることをも考え合わせると、Zn は少なくとも 1 個の SH 基と配位することによって活性に必須な SH 基を酸化から保護し、酵素を活性型に保持する役割を果たしているものと考えられる。

ヒスチジン残基の光酸化によってもまた、失活と Zn の離脱が認められた。この結果から、本酵素の活性中心にヒスチジン残基が含まれ、触媒作用に関与するだけでなく Zn の結合に関与するヒスチジン残基が存在することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

δ -アミノレブリン酸脱水酵素はポルフィリン生合成に重要な位置を占め、SH 基と亜鉛を含んでいる。ウシ肝からメルカプトエタノールと亜鉛存在下で高度に精製した本酵素は、1 個のサブユニット当り 8 個の SH 基と 1 個の亜鉛をそれぞれ含有し、S-S 橋を含まないことが判明した。そして 8 個の SH 基の中、2 個が活性に重要で、互に隣接して存在していること、亜鉛がこれらとキレートしていること等を明らかにした。本酵素から亜鉛を EDTA で除去して得たアポ酵素を嫌気下に保つと極めて高い活性を保持するが、好気下では速やかに $2\text{SH} \rightarrow \text{SS}$ となり失活する。逆にこれらの SH 基を DTNB, 1,3-dibromoacetone, 或は重金属 (特に鉛) によって修飾すると失活と亜鉛の離脱を確認した。従って亜鉛は触媒作用に直接に関与しないが、活性に必須な SH 基を酸化から保護し、酵素を活性型に保っていることを証明した。以上の研究は δ -アミノレブリン酸脱水酵素における亜鉛の役割とシステインとの関係を分子レベルで明らかにし、また労働衛生学上重要な鉛中毒の毒性発現の機序を解明したものである。

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。