

氏 名	宮 本 積 みやもと つもる
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	論 薬 博 第 171 号
学位授与の日付	昭 和 52 年 3 月 23 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	Prostaglandin 合成酵素の研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 富 田 謙 吉 教 授 山 科 郁 男 教 授 井 上 博 之

論 文 内 容 の 要 旨

Prostaglandin (PG) は、広範は分布と多彩な生理作用を特徴とする生理活性物質である。その生合成は、Samuelsson らおよび Nugteren らの両研究グループにより、まず、炭素20個の高度不飽和脂肪酸を前駆体として、ミクロソームに局在する酵素系により生合成されることが明らかにされ、ついで、同位元素を用いた実験により、endoperoxide をもつ中間体(図1を参照)を含む生合成反応機構が、仮説として提唱され、一般に支持されてきた。

ところが最近になって、そのような endoperoxide 型の PG が、Nugteren らおよび Samuelsson らによって実際に単離されるようになった。すなわち、彼等は、ヒツジ精囊腺のミクロソームと前駆体の不飽和脂肪酸との反応から常温では極めて不安定な2種の化合物を単離し、1つは、15-hydroperoxy-9 α ,11 α -peroxidoprostanoic acid (PGG₁ または 15-hydroperoxy-PGR₁)、もう1つは、15-hydroxy-9 α ,11 α -peroxidoprostanoic acid (PGH₁ または PGR₁) と同定した。

ところが、PG 合成酵素系はミクロソームに局在するいわゆる膜結合型の酵素であり、今迄に、いくつかの研究グループで、その精製の試みが行われていたが、いずれも満足すべき結果は得られない。著者らは、ウシ精囊腺ミクロソームの PG 合成酵素系の研究の過程で、ミクロソームから界面活性剤で可溶化した酵素が、endoperoxide 型の PG を生成する画分と、その endoperoxide を異性化して PGE に変換する画分とに分かれることを見出した。さらに、前者の酵素画分を高度に精製し、その性質を明らかにし、また、従来知られている種々の活性化因子の機能を検討した。そこで得られた知見を基にして、endoperoxide を中間体とする PG の合生成経路を、酵素学的な面から実証した。

PG 合成酵素の可溶化と分画 ウシ精囊腺より常法に従い調製したミクロソーム画分を、8,11,14-eicosatrienoic acid と反応させると、PGE₁ が生成するが、この反応にはいくつかの物質が、補酵素としてあるいは活性化因子として必要である。Samuelsson らおよび van Dorp らによって見出されたグルタチオン (GSH)、van Dorp らにより報告されたヒドロキノン、吉本らによって見出されたヘモグロビン

ン (Hb) などのヘム化合物である。著者らは、さらにトリプトファン (Try) がハイドロキノンと同様の促進効果をもつことを見出した。このように、ミクロソームの PGE_1 合成は、Hb, Try, GSH の三者の共存で著明に促進される。

ミクロソーム画分を Tween 20 で処理して得られる可溶性酵素は、ミクロソームと同様に上記の3種の活性化因子の存在下で、 PGE_1 を合成するが、この可溶性酵素を DEAE-セルロースのカラムにのせると、吸着されないで溶出する部分 (酵素画分 I) と、緩衝液の濃度を上げると溶出する部分 (酵素画分 II) の、2つの酵素画分が得られた。この酵素画分 I と II を共存させて、Hb, Try, GSH の3種の活性化因子を加えて反応させると、やはり PGE_1 の生成が認められた。ところが、酵素画分 I を、Hb と Try の共存下に、基質と反応させた場合には、 PGE_1 とは異なる不安定な生成物が認められた。そこで、この生成物を反応後速かに低温下 (-20°C) に抽出し、薄層クロマトで分離し、種々の化学的方法でその性質を検討した結果、それが上記の endoperoxide をもつ PGH_1 であることが明らかになった。このように単離した PGH_1 と、酵素画分 II とを反応させると、 PGE_1 が生成し、この反応には、3種の活性化因子のうち、GSH だけが必要であった。

以上のように、酵素画分 I は、不飽和脂肪酸に酸素添加して、endoperoxide をもつ PGH_1 という中間体までを合成する酵素活性を含み、酵素画分 II は、 PGH_1 の endoperoxide を開裂して、 PGE_1 に異性化する酵素活性を含んでいる。したがって、著者らの実験結果によって、PG の生合成は、少なくとも2つの異なる酵素により触媒される反応の連鎖であり、endoperoxide をもつ PGH_1 が、PG 生合成の中間体であることが、酵素学的に証明されたものと考えられる。

PG endoperoxide 合成酵素の精製とその性質 上記の酵素画分 I (PG endoperoxide 合成酵素) を、pH 3.5~10.0 の Ampholine carrier ampholyte を用いた等電点分画をおこなうと、 PGH_1 の合成活性は、pH 7.1 付近に現われ、最終的に、ミクロソーム画分から約700倍の精製で、収率は約50%、比活性は $2.4 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白の標品が得られた。この酵素標品は、可視部の吸収はほとんどなく、ディスク電気泳動的にはほぼ均一で、分子量は300,000程度と推定された。

この精製酵素標品を、Hb の存在下に不飽和脂肪酸と反応させると、 PGE_1 や PGH_1 とは異なる生成物が蓄積する。この生成物も常温では極めて不安定であって、低温下に抽出分離して、その化学的性質を調べると、前述の、endoperoxide と hydroperoxide をもつ PGG_1 に一致した。この PGG_1 を再び精製酵素と反応させると PGH_1 に変換するが、この反応にも、Hb が必要で、さらに、Try の添加によって促進される。

このように、精製した酵素標品は、不飽和脂肪酸に酸素添加して、endoperoxide と hydroperoxide をもつ PGG_1 を生成する反応と、その hydroperoxide を切断して PGH_1 を生ずる反応と、2種の反応を触媒

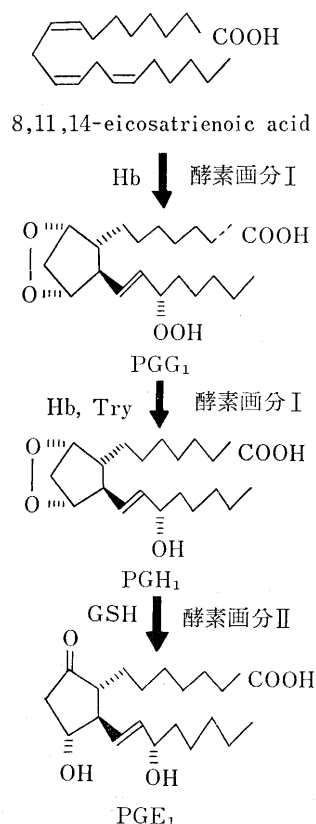


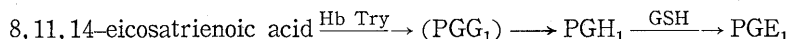
図1 PG の生合成経路

し、今までのところでは、この2種の酵素活性は分離されていない。

以上の結果をまとめたのが図1であって、著者らの研究によって、不飽和脂肪酸から2種の endoperoxide 型の PG, すなわち, PGG_1 と PGH_1 を経て, PGE_1 が生成すること, および, それに関与する少なくとも2種の酵素が単離され, さらに, 今迄知られていた活性因子が, それぞれの反応に必要であるかが明らかになった。なお, 非ステロイド系の抗炎症剤が PGG_1 を生成する反応を特異的に阻害することも明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

Prostaglandin (PG) の生合成については、これまでに、(1)その前駆体が炭素数20の高度不飽和脂肪酸であること、(2)生合成酵素が動物の精囊などのミクロソームにあり、ヘム化合物 (Hb, Hm 等), ヒドロキノン及びグルタチオン (GSH) 等の活性化因子を要することが知られており、また、(3) hydroperoxide 型中間体を含む反応過程の仮説も提唱されていた。しかし、酵素の精製が不十分であったため、反応機構の詳細は不明の点が多かった。著者はウシ精囊のミクロソームより PG 生成酵素の部分精製を試み以下の結果を得た。(1)ウシ精囊ミクロソーム画分を Tween 20 を用いて可溶化し、これを DEAE-セルロースカラムマトグラフィーにより酵素 I 及び II に分画、I はさらに等電点分画法により、ミクロソームから 750 倍に精製された。(2)酵素画分 I は 8,11,14-eicosatrienoic acid からヘム化合物の存在下に PGG_1 (9,10-endoperoxide, 15-hydroperoxide 体) を、またヘム化合物とトリプトファン (Try) 等のインドール化合物の共存下には PGH_1 (9,10-endoperoxide, 15-hydroxide 体) を生成する。また、この酵素画分には PGG_1 より Hm, トリプトファン存在下に PGH_1 を生成する酵素活性も存在する。(3)酵素画分 II は GSH の存在下に PGH_1 より PGE_1 を生成する一種のイソメラーゼである。(4)以上により PGE_1 はウシ精囊ミクロソームの複合酵素系により、



の経路で生成されること、及び活性化因子の作用する段階が明らかとなった。さらに、(5)インドメサチン等非ステロイド系抗炎症剤は、8,11,14-eicosatrienoic acid よりの PGG_1 の生成を抑制することを見出した。

以上の結果は、ウシ精囊ミクロソームの prostaglandin 生成酵素を部分精製し、生合成の過程の重要な部分及びそれに関与する因子の役割を明らかにしたものである。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。