

氏 名 (本籍) いし ざわ し のぶ
石 澤 志 信

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 1 5 1 3 号

学位授与年月日 昭 和 5 8 年 9 月 1 4 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴 昭 和 5 3 年 3 月
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 Induction of Heme Oxygenase in Rat Liver.
(ラット肝臓におけるヘムオキシゲナーゼの誘導
機構について)

(主 査)

論文審査委員 教授 多 田 啓 也 教授 後 藤 由 夫

教授 立 木 蔚

論文内容要旨

ヘモグロビンなどのヘム蛋白質を構成しているヘムは、代謝的に分解されてビリベルジンとなり、哺乳動物ではさらにビリルビンとなつて胆汁中に排泄される。生体内でのヘムの分解機構については、ようやく1968年になって米国のシュミットらによって、ヘムオキシゲナーゼが発見され、現在ではこの酵素が生理的なヘム分解反応を行っているものと、広く認められている。動物ではヘムオキシゲナーゼは通常、細網内皮系細胞のミクロソームに存在するため、脾臓、骨髄などでその活性が強く認められる。一方、本酵素活性は肝実質細胞では通常低いが、例えばラットに基質であるヘムなどを投与すると、本酵素が著明に誘導されてくることが知られている。我々の行った実験でも、ラットにヘミンを腹腔内投与し、経時的に本酵素活性を調べたところ、対照に比べ約15倍高い活性が得られた。この時に腹腔内に投与したヘミンの動きを、トリプトファンピロラーゼのヘム飽和度を指標として調べてみたところ、ヘム投与後、短時間のうちに全てのトリプトファンピロラーゼがホロ型になり、しかもそれが長時間継続していたので、肝内のヘム濃度が非常に高まっていることが推測された。肝細胞内に入ったヘムが、どの様にして本酵素を誘導しているのか、分子レベルの機構は不明だが、ヘムが引き金になって本酵素を誘導していることは明白である。本酵素はこの様に基質であるヘムにより誘導されるが、動物系ではこの様な直接の基質による誘導の例は数少ない。一方ラット肝臓では、コバルトやカドミウムなどの重金属イオン、あるいはプロモベンゼンなどの有機化合物によっても本酵素活性が著明に増強することが知られている。そこでこれらの薬物がヘムを介して誘導しているのか否かを、トリプトファンピロラーゼのヘム飽和度を指標として検討した。カドミウム投与ラットでは短時間のうちに、またプロモベンゼン投与ラットでは比較的ゆっくりとはあるが、本酵素活性がヘムの場合の4ないし5倍と著明に増加するが、いずれの場合にもトリプトファンピロラーゼのヘム飽和度はむしろ減少しており、肝細胞内のヘム濃度が極端に下っていることが知られた。従ってカドミウム、プロモベンゼンを投与したラット肝では、ヘムとは無関係に本酵素の非常に激しい誘導がかかることが明らかとなった。

本酵素の誘導には、この様に大別して、ヘムを介するものとヘムを介さない機構のものと2つあることが知られた。そこでさらに次の様な点を明らかにすべく実験を行った。即ち、①これらの誘導物質による本酵素活性の増加が、酵素蛋白量の増加によるものか否か、②もしそうであるならば、これらの異なる物質により誘導された酵素が同一のものであるか否か、③これらの物質が、転写や翻訳を含む一連の蛋白合成過程のどこに作用しているのか、という点である。この様な実験を行うには抗体が不可欠であるので、まず本酵素をプロモベンゼン投与ラットから精製し、抗原

とした。この標品の最小分子量は、ヘムやコバルトをラットに投与して得られた精製酵素の分子量と同じであった。この抗原を用いて兎を免疫し、得られた血清から IgG 画分をとりこれを抗体として用いた。

ヘミン、コバルト、カドミウム、プロモベンゼンでラット肝臓に誘導した本酵素及びラット脾臓の本酵素をオクタローニ法及び immunotitration method により、免疫化学的に検討したところ、全く区別がつかず、これらは同一の分子種であることが明らかとなった。誘導をかけたラットでは、³H-ロイシンの取り込みを指標とした本酵素の合成量と、本酵素の活性とがほぼ対応した結果が得られたので、本酵素の誘導が酵素蛋白の増加によるものであることが確認された。本酵素の誘導はアクチノマイシン D の投与により抑えられることから、これらの薬物は転写段階に働いていることが考えられる。そこで、ヘミン、カドミウム、プロモベンゼンを投与したラット肝よりポリゾームを分離し、ウサギ網状赤血球無細胞系で本酵素を合成させた結果、これらの誘導物質は転写段階に作用し、本酵素の mRNA の合成を特異的に促進していることの証拠を得た。

本酵素の合成の場が遊離ポリゾームであるか、結合ポリゾームであるかを知るために、各々のポリゾームを分離して取り出し、前と同様に *in vitro* 系で本酵素を合成させた結果、本酵素は主に遊離ポリゾームで作られていることが明らかとなった。恐らく、本酵素は初めに粗面小胞体に入り込み、次第に滑面小胞体へを移っていくものと思われる。

In vivo 及び、*in vitro* 系で合成された本酵素の最小分子量を比較したところ、共に分子量は 31,000 で両者の間に差はなく、本酵素ではいわゆるプロセッシングは認められなかった。

審 査 結 果 の 要 旨

ヘモグロビンなどのヘム蛋白を構成しているヘムは代謝的に分解されてビリベルジンとなり、哺乳動物ではさらにビリルビンとなって胆汁中に排泄される。生体内でのヘムの分解機構についてはヘムオキシゲナーゼが生理的なヘム分解反応を行っているものと認められているが、その誘導機構については未だ不明の点が多い。

本研究はラット肝を用いてヘムオキシゲナーゼの誘導機構を明らかにする目的で種々検索を行ない、本酵素の誘導にはヘムを介するものとヘムを介さないものとの2つの機構の存在が示唆された。ヘミン、コバルト、カドミウム、プロモベンゾンでラット肝に誘導した本酵素をオクタロニー法および immunotitration 法により検討した結果、本酵素の誘導は酵素蛋白の増加によるものであることが確認された。本酵素の誘導はアクチノマイシンDの投与により抑えられることから、これらの薬物は転写段階に働いているものと考えられた。そこで上記薬物を投与したラット肝よりポリゾームを分離し、ウサギ網状赤血球無細胞系で本酵素を合成させた結果、これらの誘導物質は転写段階に作用し本酵素の mRNA の合成を特異的に促進しているという証拠が得られた。

また、In vivo および in vitro 系で合成された本酵素の最小分子量を比較した結果、共に分子量は 31,000 で両者の間に差はなく、本酵素ではプロセッシングは認められなかった。

以上の研究は、ヘムオキシゲナーゼ誘導機構に関し重要な新知見を提供したものであり、医学博士の授与に値するものと判定された。