

〔総 説〕

プテリジンの生化学，特にセピアプテリンの還元酵素と
フェニルアラニン水酸化酵素に関連して

Biochemistry of Pteridines, with Special Reference to Sepiapterin
Reductase and Phenylalanine Hydroxylase

秋 野 美 樹

MIKI AKINO

158 世田谷区 東京都立大学理学部生物学教室

1976年4月8日受領

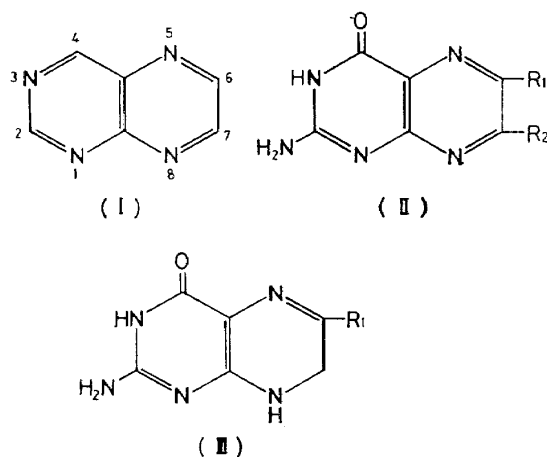
プテリジンとは pyrimido [4,5*b*] pyrazine (I) を基本骨格とする化合物の総称である。現在知られている天然のプテリジン誘導体は大部分，(II, $R_1 = R_2 = H$) の基本構造をもっており，この物質 (2-アミノ-4-オキソプテリジン) をプテリン (AHP) と称し，その誘導体全般を意味する場合にも使われている。構造式 (III) は 7,8-ジヒドロプテリンを示す。天然には少数ながら，2,4-ジオキソプテリジン誘導体が存在しており (たとえば，リボフラビン)，この種の化合物はルマジンと総称される。

プテリジンに関する研究は1800年代の終り，イギリスの Hopkins (1889, 1891, 1895) によるチョウの翅の色素についての報告に端を発する。プテリン (pterin) はギリシャ語の *pteros* (翅) に由来する。チョウの色素の問題は1920年代になってドイツの有機化学者，Wieland とその一門によって再び取りあげられ，広汎かつ精力的な研究が展開された。当時

の分析技術ではプテリンの窒素含有量と分子量の正確な測定が困難であったことが主な原因になって構造決定に長年月を要したが，ようやく1940年に到って，ロイコプテリン (II, $R_1 = R_2 = OH$)，イソキサントプテリン (II, $R_1 = H, R_2 = OH$)，キサントプテリン (II, $R_1 = OH, R_2 = H$) の構造が決定された (Purmann, 1940 a, b, 1941, 1943)。初期のプテリジン研究に関しては Schöpf (1964) の総説がある。それ以来，プテリジンは有機化学者の興味を引き，天然物の構造解析，合成，物理化学的性質などに関し，膨大な数の研究が行なわれてきた。この方面に関しては，Gates (1947)，Albert (1952, 1954)，後藤 (1964)，Viscontini (1968) の総説を参照されたい。一方，ペーパークロマトグラフィー技術の開発と大部分のプテリジンが特徴的な蛍光を発するため微量検出が容易であることから，多くの生物学者が，魚類・両生類・昆虫類などを主な材料として体色発現，突然変異などに関連してプテリジンの研究を行なってきた (Hama, 1963; Viscontini, 1960, 1965; Matsumoto *et al.*, 1971 の総説参照)。

プテリジン研究の歴史にとって画期的な出来事は葉酸* (ビタミンM, プテロイルグルタミン酸) の構造が Angier *et al.* (1945, 1946) によって決定され，それが 6-メチルプテリン (II, $R_1 = CH_3, R_2 = H$) の誘導体であることが判明したことである。いわゆる 'one carbon' 転移反応に関与する補酵素型の葉酸誘導体の生化学と，化学療法剤あるいは制癌

* 一般的にはプテロイルポリグルタミン酸を含めるが，本稿ではプテロイルモノグルタミン酸を意味することにする。



剤として用いられる葉酸誘導体に関しては Blakley (1969) の著者を参照されたい。

葉酸はプテリンの 6-メチルアミノベンゾイルグルタミン酸誘導体であり、その 6 位の側鎖はかなり長い。これに対して、葉酸系列以外の天然プテリンの側鎖は知られている限り炭素数が 3 個またはそれ以下であり、はるかに短い。そのために 'unconjugated pteridine' として葉酸系化合物から区別されている。'unconjugated pteridine' は昆虫の翅、眼、幼虫の表皮、あるいは魚類、両生類などの皮膚に比較的多量に蓄積されており、それらの動物における窒素代謝の単なる最終産物と見なされた時期もあった。しかし、過去何年間かの研究によってプテリジンの分布が以上のような特定の動物に限定されるものではなく、細菌、カビの類から哺乳動物まで広汎に分布していることが示された* (Blakley, 1969; Matsumoto *et al.*, 1971 参照)。以上のようなプテリジンの分布はその普遍的な生物学的意義を示唆するし、実際に、比較的最近の研究によって、'unconjugated pteridine' の生化学的役割がいくつか明らかにされた。一口にいえばその還元型が重要であるということである (上記の文献以外に、Rembold and Gyure, 1972 参照)。

本稿では、プテリジン誘導体の生化学全般について論ずるつもりではなく、過去 10 数年の間に筆者らの研究室においてなされたプテリジン代謝の研究を中心に、芳香族アミノ酸、特にフェニルアラニンの水酸化酵素との関連を重点的に述べ、それから派生するいくつかの問題点を提起したいと思う。

1. セピアプテリンとその還元酵素

1951 年、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の眼色突然変異種 'セピア' の眼に 2 種類の黄色々素が蓄積されていることが報告された (Hadorn and Mitchell, 1951)。のちにそれらの色素はそれぞれセピアプテリン (より量が多い) およびイソセピアプテリンと命名された (Ziegler-Günder and Hadorn, 1958)。セピアプテリンは 'セピア' から Forrest and Mitchell (1954) によって最初に結晶状に得られたが、その構造は Nawa (1960) によって決定された。すなわち、6-ラクチルジヒドロプテリン (III, $R_1 = \text{CO} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_3$) である。イソセピアプテリンはラン藻の一種、*Anacystis nidulans* の培養細胞中に比較的多量に

* 高等植物におけるプテリンの存在は証明されていない。

存在する Compound A と同一物であることがわかり (Forrest *et al.*, 1958), 次いでその構造が 6-プロピオニルジヒドロプテリン (III, $R_1 = \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_3$) であることが示された (Forrest *et al.*, 1959 a, b)。比較的最近, 'セピア' にはもう一種の黄色プテリンが存在することが発見され、その構造は 6-アセチルジヒドロプテリン (III, $R_1 = \text{CO} \cdot \text{CH}_3$) と決定された (Sugiura *et al.*, 1973)。以上 3 種が現在知られている 6-アシルジヒドロプテリンである*。

以上のような 'セピア' の眼色々素の研究とは全く別個に、家蚕の突然変異種、黄体色蚕 'レモン' の幼虫皮膚に黄色蛍光物質の存在が知られ (波磨ほか, 1949), 最初キサントプテリンと記載された。のちにキサントプテリンと異なることがわかり、キサントプテリン B (B は *Bombyx* に由来) と名づけられた (Hirata *et al.*, 1950)。さらにキサントプテリン B はペーパークロマトグラフィー (溶媒, 5% クエン酸ソーダ) により 2 物質に分離することがわかり、それぞれキサントプテリン B₁ ($R_f = 0.27$, 量的に多い) および B₂ ($R_f = 0.32$) と命名された (有賀・吉武, 1954)。キサントプテリン B₁ はセピアプテリンと同一物と推定されていたが (Nawa and Taira, 1954), 'レモン' と 'セピア' からそれぞれ結晶状に得られた標品を比較することにより、両物質の同一性が確認された (津末・秋野, 1965)。キサントプテリン B₂ も 'レモン' から単離され、セピアプテリンに対応するルマジン (2, 4-ジオキソセピアプテリン) と同定された (Goto *et al.*, 1966)。セピアプテリンからそのルマジンへの酵素的変換については後述する。

本題にはいる前にセピアプテリンについていささかつけ加えておきたい。セピアプテリンの完全化学合成法は知られておらず (杉浦・後藤, 1972 参照), それを得るには、ふつう 'セピア' から抽出する方法が取られている。いくつかの抽出方法が発表されているが、筆者らの初期の方法 (津末・秋野, 1965) とその改良法 (Fukushima and Akino, 1968) が比較的好収量を与えられると思われる。改良法は、ECTEOLA-セルロース, P-セルロースおよび Sephadex G-25 を用いるカラムクロマトグラフィーによって分画、精製する方法で、100 g の 'セピ

* Sugiura *et al.* (1973) はイソセピアプテリンがセピアプテリンの構造異性体ではないところから、後者をセピアプテリン A, 前者を B, 6-アセチル体を C と呼ぶことを提案している。

ア' から 30-40 mg のセピアプテリンの結晶が得られる。類似の方法によってイソセピアプテリンの結晶も得られるが、その収量は 1/3 以下である。

セピアプテリンは中性溶媒中で 260 と 420 nm に吸収ピークを示し、420 nm における分子吸光係数は $1.04 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mole}$ であり(津末・秋野, 1965), この値がセピアプテリンの定量に利用される。側鎖は L-ラクチルと考えられるが (Nawa, 1960; 津末・秋野, 1965), 半合成法によって得られるのは DL-体である (杉浦・後藤, 1972)。他の 6-アシルまたは 6-ヒドロキシアルキルプテリンと同様, セピアプテリンは常温でアルカリ性過マンガン酸カリ酸化により容易に 6-カルボキシプテリン (II, $R_1 = \text{COOH}$, $R_2 = \text{H}$) に変わる。この酸化法はこの種のプテリンにおけるプテリジン核の存在と側鎖の位置を決めるためにしばしば使われてきた。セピアプテリンは水溶液中で徐々に 6-カルボキシプテリンに酸化されるが、この反応は酸と光によって著しく促進される。セピアプテリンはまたホウ素の存在下でジヒドロキサンプテリンに分解する (Nawa, 1960)。

一般に、ジヒドロプテリンには、5,6-, 5,8- および 7,8-ジヒドロの 3 種の異性体が考えうるし、後述するようにキノノイドジヒドロ型も存在しうる。Forrest *et al.* (1959a) および Nawa (1960) がそれぞれイソセピアプテリンおよびセピアプテリンの構造を決定した段階では 2 原子の水素の位置は必ずしも明確ではなかった。NMR スペクトルにより、まずイソセピアプテリンが 7,8-ジヒドロ型であることが確認され (Forrest and Nawa, 1962), 次いで、セピアプテリンも 7,8-ジヒドロ型であることが同一手法で確かめられた (Fukushima and Akino, 1968)。表 1 に若干のプテリンの化学シフトを示してあるが、セピアプテリンについて、 τ 値 5.14(s) は環メチレンの存在を証明している。さらに NMR スペクトルの測定を NAOD 中で行ない、経時的にスペクトル像を追うと、6-ラクチルがケト

型 ($\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ -\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ | \\ \text{OH} \end{array}$) からエンジオール型 ($\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ -\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3 \\ | \quad | \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$) に変化することが認められた (Iwanami and Akino, 1975)。セピアプテリンについてはそのマスマスペクトルの解析からフラグメンテーション様式が提出されている (Iwanami and Akino, 1972)。

表 1 プテリンの化学シフト (τ 値)

化 合 物	位 置		
	7	1'	
	ビニル	メチレン	メチル
6-メチルプテリン	1.17		6.99
6-メチル-7,8-ジヒドロ プテリン		5.52	7.54
7,8-ジヒドロキサント プテリン		5.64	
セピアプテリン		5.14	
ジヒドロビオプテリン		5.46	

溶媒, 1N NaOD。外部対照, テトラメチルシラン。Fukushima and Akino (1968) による。

上述のようにセピアプテリンは最初, 'セピア' と 'レモン' についてその存在が記載されたものであるが、他の昆虫類, ある種の魚類, 両生類の皮膚にも存在するし (Matsumoto *et al.*, 1971 参照), 微量ながら人尿の常成分であることも報告されている (Fukushima and Shiota, 1972)。同様にラットやカエル類の尿にも存在する (未発表)。しかし, セピアプテリンの分布に関しては系統的な研究は未だ行なわれていない。

1954年, 筆者らはキサントプテリン B_1 (セピアプテリン) が正常蚕幼虫脂肪体の粗抽出液によって無色無蛍光の物質に変わることを報告した (Aruga *et al.*, 1954)。反応に酵素の関与を推定したが、当時, セピアプテリンの構造が未決定であり, また純品が得られないままにこの研究は一時中断された。その後, Taira (1961a, b) はニワトリ肝およびシヨウジョウバエ幼虫から調製したジヒドロ葉酸還元酵素画分が NADPH の存在下でセピアプテリンを還元することを見だし, この酵素活性に対してプテリン還元酵素という名称を与えた。セピアプテリンと 7,8-ジヒドロ葉酸との構造類似性から還元生成物として, 5,6,7,8-テトラヒドロ-6-ラクチルプテリンを想定した。しかし, プテリン還元酵素とジヒドロ葉酸還元酵素の異同は明確にされなかった。

セピアプテリンの単離のメドがついた段階で, 筆者らはその酵素的還元の問題を再び取りあげた。その第一歩として, セピアプテリンの還元が葉酸ないしはジヒドロ葉酸還元酵素によるものか否かを検討した。この酵素は多くの場合 NADPH を補酵素とし, 葉酸およびジヒドロ葉酸をテトラヒドロ葉酸に還元する, すなわちピラジン環の還元酵素である。

正常蚕5令幼虫の發育段階を追って、脂肪体抽出物(NADPHを加える)の葉酸とセビアプテリンの還元活性を測定したところ、両活性は相互に無関係な消長を示した(図1-a)。また、'レモン'の脂肪体

抽出液にはセビアプテリンの還元活性はほとんど認められないが、葉酸の還元活性は正常蚕のそれとほぼ同程度であった(図1-b)。以上の結果は2物質の還元が別々の酵素によることを強く示唆している

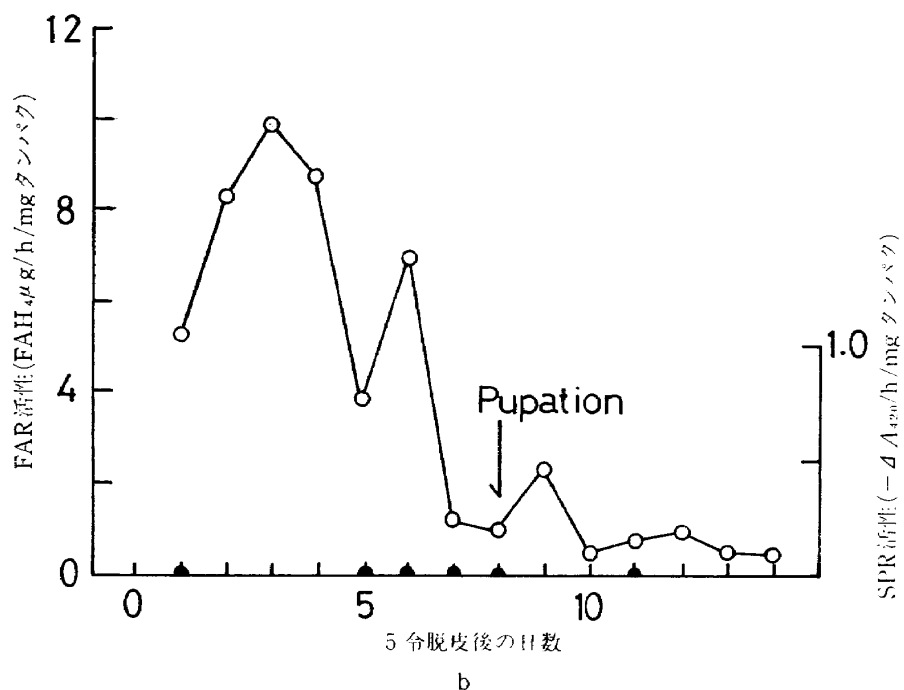
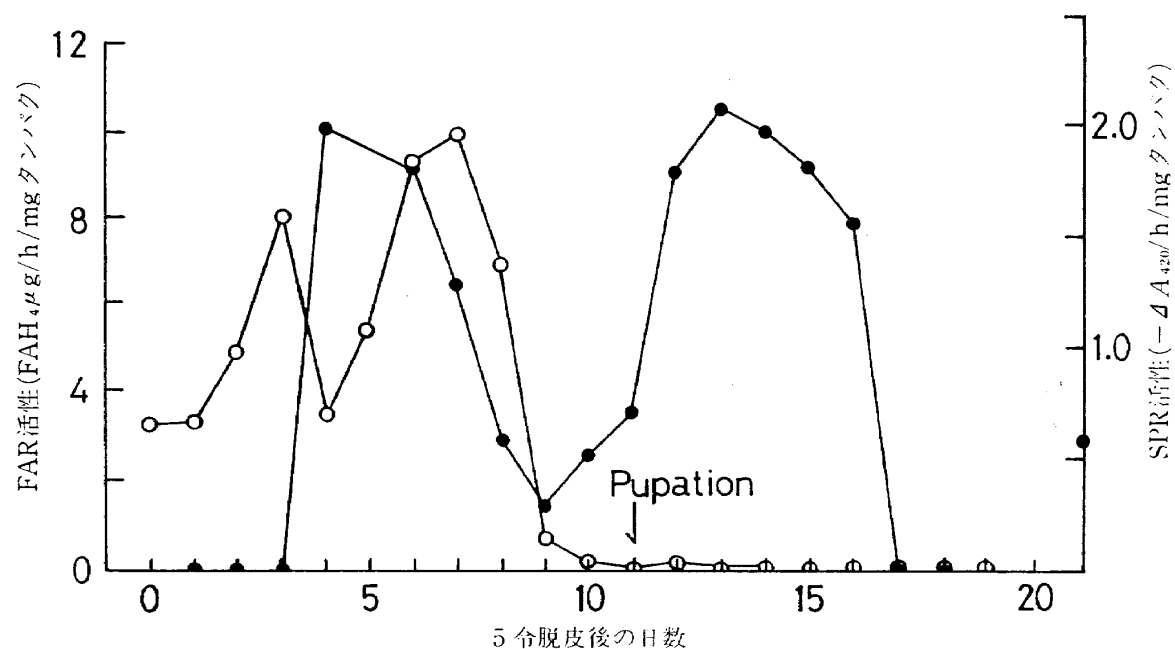


図1 家蚕第5令幼虫脂肪体における葉酸還元活性(FAR)とセビアプテリン還元活性(SPR)の消長。a) 正常蚕, b) 'レモン'。-○-: FAR, -●-: SPR. Matsubara *et al.* (1963) による。

(Matsubara *et al.*, 1963)。次いで、ニワトリ肝抽出液を硫酸によって分画し、3画分を得た。画分 1 (0.18-0.34 硫酸飽和) は NADPH の存在下で強いセピアプテリン還元活性を示すが、葉酸およびジヒドロ葉酸還元活性は大部分画分 2 (0.49-0.60 飽和) に存在し、画分 3 (0.60-0.70 飽和) にはセピアプテリン還元活性は全く認められなかった。さらに葉酸還元酵素は低濃度 (10^{-7} M) のアミノプテリン (4-アミノ葉酸) によって特異的かつ完全に阻害されることが知られているが、ニワトリ肝のセピアプテリン還元活性は 10^{-5} M のアミノプテリンによっても 10% 程度しか阻害を受けない。以上の実験結果から新酵素の存在を確認し、それに対してセピアプテリン還元酵素 (E.C. 1.1.1. 153) という名称を与えた。同酵素の存在はラット・ウマ・ブタ・ウサギ・ウシ肝にも認められた (Matsubara and Akino, 1964)。

さて、以上のようなセピアプテリンの代謝に関する一つのささやかな観察は爾後フェニルアラニンのチロシンへの酵素的水酸化反応の研究と密接な関連をもって進展する。この反応についてはあとでやや詳細に述べるが、1950 年の後半からアメリカ NIH の Kaufman によって推進され、反応系における一つの電子供与体としてテトラヒドロプテリンが必須であることが確証された (初期の研究に関しては Kaufman, 1964a の総説参照)。当初の研究で、6, 7-ジメチルテトラヒドロプテリンのような合成のテトラヒドロプテリンが補酵素として使用されたが、ラット肝の熱水抽出物中に補酵素活性を有する物質が存在していることがわかり、多量のラット肝から有効物質の部分的精製が行なわれ、それがジヒドロビオプテリンと同定された (Kaufman, 1963)。ビオプテリン (6-[L-erythro-1', 2'-ジヒドロキシプロピル]プテリン。II, $R_1 = \text{CHOH} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$) は原虫 *Crithidia fasciculata* の増殖因子として人尿から (Patterson *et al.*, 1955, 1956), またショウジョバエの眼に含まれるプテリンの一つとして単離され (Forrest and Mitchell, 1955), ほぼ同時にその構造が決定された物質である。

合成のテトラヒドロプテリンの場合と異なり、ジヒドロビオプテリンをフェニルアラニン水酸化酵素の電子供与体として用いると、その補酵素活性 (チロシン生成量で表わされる) は酵素標品中のジヒドロ葉酸還元酵素活性に依存し、また水酸化反応はアミノプテリンによって強く阻害される。以上のことから、ジヒドロビオプテリンは予めジヒドロ葉酸還

元酵素によってテトラヒドロ体に還元され、それが直接電子供与体として作用するものと考えられた (Kaufman, 1963)。

このような線に沿った研究で、Kaufman (1962) は 'セピア' から得られるセピアプテリン画分が彼のフェニルアラニン水酸化酵素系において補酵素活性を示すことを報告した。この場合も、チロシン生成量は反応系中のジヒドロ葉酸還元酵素活性に依存する。このことと、前述した Taira (1961b) の研究報告から、Kaufman は、セピアプテリンがまずジヒドロ葉酸還元酵素によって対応するテトラヒドロ体に還元され、それが直接の電子供与体として作用するものと推定した。しかし、この考え方は、当時知られていた条件下ではセピアプテリンはジヒドロ葉酸還元酵素によっては還元されず、別個のセピアプテリン還元酵素が存在するという前述した筆者らの実験事実と相反する。この矛盾を解決すべく、また新酵素の場合はそうするのが当然であるが、酵素的還元によってセピアプテリンから生ずる物質の同定を試みた。

還元生成物の同定はラット肝から部分精製したセピアプテリン還元酵素を用いて行なわれたが、その最初の手がかりは次のような観察から得られた。セピアプテリンの酵素的還元を 420 nm における吸光度の減少と、側鎖のカルボニル基の消失の両面から測定すると、両者の間には完全な並行関係が見られる。このことは 6 位のラクチル基 ($-\text{CO} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_3$) がジヒドロキシプロピオニル基 ($-\text{CHOH} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_3$) に還元されること、すなわち、セピアプテリンがジヒドロビオプテリンに還元されることを示唆する。さらに還元に伴う吸収スペクトルの変化を追跡すると、最初の 260, 420 nm の吸収ピークが時間とともに 280, 330 nm に移行する (Matsubara *et al.*, 1966)。この吸収ピークは当時知られていたジヒドロビオプテリンのそれにはほぼ一致する。次に還元生成物画分を反応混合物から Sephadex G-50 (のちに G-25) のカラムクロマトグラフィーによって集め、濃縮乾固し、水から再結することによって用いたセピアプテリンのほぼ半量に相当する結晶性物質が得られた (Nagai, 1968)。この物質は次のような性質を示す。(1) この物質を 0.5 M 塩酸, 100°C, 暗処で 20 分間処理すると、強い青色蛍光物質とごく少量の黄色蛍光物質とに変化する。両物質を Sephadex G-25 のカラムで分離精製し、その性質を検討した結果、それぞれビオプテリンとイソセピアプテリンと同定された (Katoh

and Akino, 1966 参照)。(2) ヨード滴定法によると、還元生成物 1 モルにつき 2 原子の 'labile hydrogen' が含まれる。(3) 中性溶液 (pH 6.8) における吸収スペクトルは、220, 280, 330 nm にピークを示す。次にセピアブテリンをアスコルビン酸の存在下でハイドロサルファイトで還元し、生成物をカラムクロマトグラフィーによって精製し、ジヒドロセピアブテリンの針状結晶を得た (Nagai, 1968. やや多量の調製については Fukushima and Akino, 1968 参照)。このものの性質と上記の還元生成物の性質とは完全に一致し、従って還元生成物はジヒドロセピアブテリンと結論された。

セピアブテリンの酵素的還元反応においては、セピアブテリン、NADPH の減少量とジヒドロセピアブテリンの生成量 (330 nm におけるジヒドロセピアブテリンの分子吸光係数は $6.2 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{mole}$, 中性) との間には 1:1:1 の関係が成り立つ。またジヒドロセピアブテリンは pH 6.8 でジヒドロ葉酸還元酵素によって還元され、最終的には 300 nm 付近に単一のピークを示す物質に変わる。この際のジヒドロセピアブテリンと NADPH の減少量の比は 1:1 である。この還元生成物はきわめて不安定で単離することはできなかったが、その吸収スペクトルと、フェニルアラニン水酸化酵素系において直接の電子供与体になりうることから、5,6,7,8-テトラヒドロセピアブテリンと推定とされた (Nagai, 1968)。表 2 に、

表 2 セピアブテリンを補酵素とした場合のフェニルアラニン水酸化酵素系における諸酵素要求性

反 応 系	フェニルアラニン依存性の NADPH の酸化 ($-\Delta A_{340}/24\text{分}$)
完全混合系	0.216
— PHase	0
— DPR	0.014
— SPR	0.012
— FAH ₂ R	0.016
— FAH ₂ R, — SPR	0.003
セピアブテリン	0

pH 6.8, 25°C. Matsubara *et al.* (1966) による。

セピアブテリンを補酵素とした場合のフェニルアラニン水酸化反応に必要なとされる諸酵素の要求性を示してある。この実験では、フェニルアラニン水酸

化酵素 (PHase), ジヒドロセピアブテリン還元酵素 (DPR, テトラヒドロセピアブテリンの再生に必要な酵素。後述), ジヒドロ葉酸還元酵素 (FAH₂R), セピアブテリン還元酵素 (SPR) をそれぞれ他の酵素活性がほとんどない程度まで精製し、それらを混合して水酸化酵素系を構成した。反応はフェニルアラニン依存性の NADPH の減少量で表わしてあるが (後述), チロシン生成量を測定しても同様の結果が得られる (Matsubara *et al.*, 1966)。表 2 の結果は上述した事柄から当然期待されることであり、セピアブテリンを補酵素にした場合には、水酸化反応は FAH₂R と SPR の両方を必要とする。

ジヒドロセピアブテリンの中性種は前述のように 330 nm に一つの吸収ピークを示すが、その陽イオンではそれが 360 nm 付近に移動する (Nagai, 1968)。このような深色性シフトは一般に 6-アルキル-または 6-ポリヒドロキシアルキル-ブテリンの 7,8-ジヒドロ型の特徴とされる (Pfleiderer and Zondler, 1966)。このことおよび他の観察から、ジヒドロセピアブテリンはセピアブテリンと同様 7,8-ジヒドロ型と推定されたが (Nagai, 1968), のちに NMR スペクトルによって確認された (表 1)。

セピアブテリン還元酵素はその後 Katoh (1971) によってウマ肝抽出液から高度に精製された (比活性にして約 5,000 倍。ラットをウマに変えたのは単に経済的理由による)。しかし、タンパク質としての均一性にはまだ問題がある。ウマ肝の酵素の分子量は約 47,000 と推定される。補酵素として NADPH, NADH とともに有効であるが、等モルでは前者の活性は後者の約 4 倍である。NADPH の見かけの K_m は $1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$ 。基質としてはセピアブテリンが特異的で ($K_m = 2.1 \times 10^{-6} \text{ M}$), D-ラクタル異性体は作用を受けないと思われる (杉浦・後藤, 1972)。しかし、イソセピアブテリン, キサントブテリン B₃ はわずかながら還元される。セピアブテリンの酵素的還元が可逆的であることは最初 Kaufman (1967) によって報告されたが, Katoh (1971) によってさらに詳細に研究された。逆反応の至適 pH は 10.4 以上, 補酵素として NADP が NAD よりも約 5 倍有効である。25°C における平衡定数は約 10^9 , 自由エネルギーの変化はほぼ -12 kcal であり, 反応は若しく還元方向に傾いている。逆反応に関して, ジヒドロセピアブテリン (L-erythro 型) の 3 種の異性体の基質特異性は調べられていない。比較的合成が容易な構造類似体, ジヒドロネオブテリン (6-[1',2',3'-トリヒドロキシプロピル]-7,8-ジ

ヒドロプテリン, III, $R_1 = \text{CHOH} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_2\text{OH}$) の4種の異性体のうち, L-erythro, L-threo および D-erythro (動物に存在するネオプテリンは主にこの型と思われる) はわずかながら NADP の存在下でセピアプテリン還元酵素によって酸化され, それぞれに対応する黄色の 6-アシルジヒドロプテリンに変わる。D-threo 型は全く酸化されない。

セピアプテリンの還元様式としては少なくとも二つの可能性が考えられる。一つは側鎖のカルボニル基の直接還元であり, 他は, まずピラジン環の 5, 6 位が還元され, 次いで 2 原子の水素が側鎖の C-1' に転移する反応である。前述したように, 還元に際して 420 nm における吸光度の減少とカルボニル基の消失とが並行関係にあること, 逆反応が起こりうること, また後述するように条件によってはセピアプテリンがジヒドロ葉酸還元酵素によって比較的安定な 5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-6-ラクチルプテリンに還元されることを考えあわせると, 第二の可能性は全く否定はできないまでも, 当面第一の還元様式がより妥当と思われる。

酵素化学の立場からすると, セピアプテリン還元酵素の阻害に関する知見は興味深い (Katoh, 1971)。この酵素の阻害剤は 3 グループに区別される。第一のグループはプテリジン誘導体で, 一般には 7, 8-ジヒドロプテリンが対応する酸化型よりも阻害効果が大きいと思われるし, 特にイソセピアプテリンによって強く阻害される。第二のグループは脂肪族および芳香族カルボン酸で, 阻害にはある適当な分子のジメンションが必要と思われる。第三のグループは PCMB, NEM のような SH 試薬である。阻害様式はイソセピアプテリンが混合型で, カルボン酸および 6-カルボキシプテリンが拮抗型である。セピアプテリン還元酵素のタンパク化学的性質を明らかにすることともに, 阻害様式を含めた反応機構の解析は今後に残された研究課題の一つであろう。

ウマ肝では, セピアプテリン還元活性は大部分可溶性画分に認められる。ラットでは, その活性は消化管, 筋肉などを除き, ほとんどすべての組織に分布している。肝のほか, 赤血球に強い活性が存在するのは興味深い。各種哺乳動物の血液における分布に関しては, Katoh *et al.* (1974) の報告がある。哺乳類・ニワトリ・昆虫以外, ショクヨウガエルの幼生肝 (Fukushima, 1970a), カイチウ筋肉 (Fukushima, 1970b), ウニ卵 (未発表) にも酵素活性が存在するが, この酵素の生理的意義に関連して広く生物界におけるその分布を調査することが望

まれる。

2. セピアプテリンのその他の変換

セピアプテリンのジヒドロピオプテリンへの酵素的還元は今まで知られている限り, その最も普遍的な代謝経路と思われるが, それ以外にもいくつかの興味あるセピアプテリンの酵素的あるいは非酵素的変換が知られているので以下にそれについて述べたい。

セピアプテリンがジヒドロ葉酸還元酵素によって還元されないことは以上述べた通りであるが, 実は, 条件 (特に pH) によってはその反応が起こりうる。高度に精製されたニワトリ肝のジヒドロ葉酸還元酵素は酸性側 (pH 4.0 付近) と中性付近 (pH 7.5) に二つの至適 pH をもっている (Kaufman and Gardiner, 1966)。酸化型の葉酸は酸性側のみで還元され, 中性では事実上還元を受けない。ジヒドロ葉酸は両域で還元されるが, その速度は酸性側でのほうがはるかに速い。同様の傾向は 'unconjugated pteridine' についても見られた (長井・長井・秋野, 未発表)。ジヒドロピオプテリンは中性付近でも同酵素によって比較的容易に還元される唯一のプテリンである (しかし, その速度はジヒドロ葉酸の約 1/6)。ピオプテリン, ジヒドロネオプテリン, セピアプテリンなどは中性付近ではほとんどあるいは全く還元されず, 酸性側においてのみ有意の速度で還元を受ける。ニワトリ肝から高度に精製したジヒドロ葉酸還元酵素を用い, pH 4.3 でセピアプテリンの還元を研究した結果, セピアプテリンは同酵素によってテトラヒドロ-6-ラクチルプテリン ('reduced sepiapterin') に変わるものと結論された。この反応の際に, セピアプテリンと NADPH の減少量の比がほぼ 1:1 であること, 420 nm における吸光度は時間とともに減少するが, カルボニル基は全く変化しないこと, 反応液から, 2-メルカプトエタノールの存在下で, Sephadex G-25 のカラムにより, 300 nm 付近に単一ピークをもつ物質を単離できることがその主な根拠である (Katoh *et al.*, 1970)。単離した還元生成物はフェニルアラニン水酸化酵素系において補酵素活性を示すが, 酵素反応によって調製したテトラヒドロピオプテリンと比べると, 等モルでその活性は $1/20$ 以下である。この物質は他のテトラヒドロプテリンと同様, 酸化型チトクロム c によって急速に酸化されるが (後述), NADPH-ジヒドロプテリン還元酵素によっては再還元されないと思われる。

黄色色蚕（‘レモン’）幼虫の皮膚にはセピアブテリン以外にそのルマジン、キサントブテリン B_2 が存在することは前に述べた。家蚕幼虫の脂肪体その他の組織にはセピアブテリンをキサントブテリン B_2 に加水分解的に脱アミノ化する酵素、セピアブテリンデアミナーゼが存在する (Tsusue, 1967, 1971)。この酵素は正常蚕、‘レモン’ のいずれにも見られるが、正常蚕には強いセピアブテリン還元酵素活性があるため、デアミナーゼの精製は‘レモン’の脂肪体を材料にして行なわれた。精製酵素はセピアブテリン・イソセピアブテリンおよび 6-アセチルジヒドロブテリン (Takikawa and Tsusue, 1975) を特異的に脱アミノ化し、他のブテリンは作用を受けないか、あるいは阻害剤として作用する。このような基質特異性と阻害剤に対する挙動からこの酵素は細菌のブテリンデアミナーゼ (Levenberg and Hayaishi, 1959)、また家蚕脂肪体のイソキサントブテリンデアミナーゼ (Gyure, 1974)とも異なる。

きわめて偶発的な出来事から、セピアブテリンは *B. subtilis*, *B. megaterium*, *E. coli*, *Staph. aureus* などの細菌によって代謝されることがわかった。

(Kitayama and Tsusue, 1975)。代謝産物は単離され、その吸収スペクトルが 6-エトキシブテリン (II, $R_1=OC_2H_5$, $R_2=H$) のそれと一致すること、および加水分解によってキサントブテリンを生ずることからその誘導体と考えられるが、側鎖の構造は未決定である。細菌によるセピアブテリンの分解は誘導酵素によるものではなく、増殖静止期においてなんらかの構成酵素(系)によってなされるものと思われる。

以上、筆者らの研究グループによって今まで明らかにされたセピアブテリンの代謝を要約すると図2のようになる。ジヒドロビオブテリンが酸処理によって一部イソセピアブテリンに変わることは以前に述べたが (Katoh and Akino, 1966), 生体内におけるこのブテリンの生成反応については何も知られていない。ジヒドロビオブテリンからイソセピアブテリンへの変換は P-セルロース (または P-Sephadex) などによっても容易に起こる。ジヒドロビオブテリンを含むブテリンの混合試料 (尿, 肝抽出液など) をカラムによって分画する場合に留意すべき点である (Fukushima and Shiota, 1972 参照)。

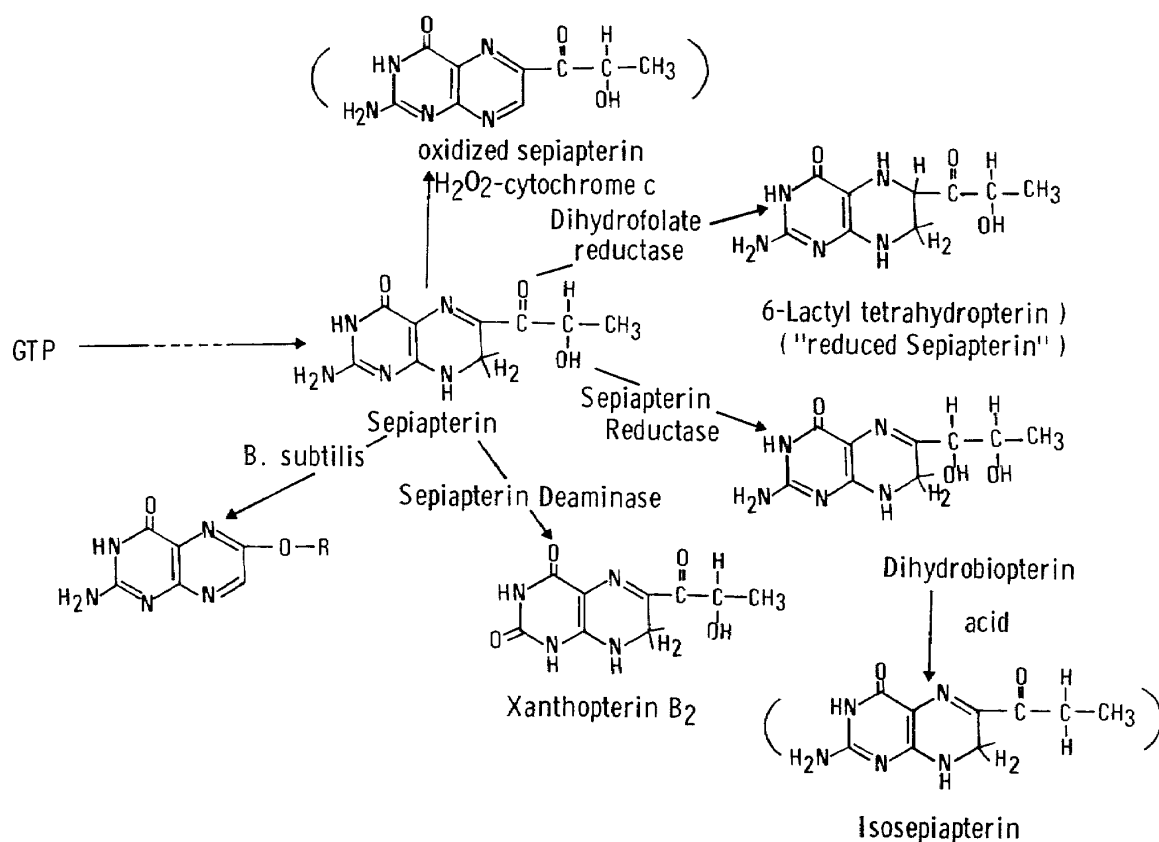


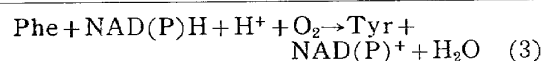
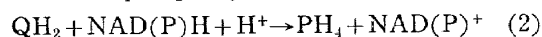
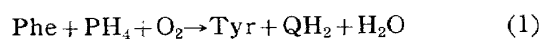
図2 セブアプテリンの代謝変換。()内の化合物は非酵素反応による生成物。

セビアプテリンが側鎖ともども酸化的に分解されることは既に述べたが、条件によってはピラジン環のみを酸化し、6-ラクチルプテリンをうることができる (Kato, Hasegawa, Yamada and Akino, 準備中)。酸化剤としては図2に示してあるようなチトクロム $c\text{-H}_2\text{O}_2$ のほかにヨウ素・臭素でもよい (Kidder and Dewey, 1968 参照)。6-ラクチルプテリンはそのジヒドロ型とは異なり、極度に不安定な化合物で容易に6-カルボキンプテリンに変わる。その生体内における存在は知られていない。

図2のGTPからセビアプテリンへの変換については後述する。

3. フェニルアラニン水酸化酵素とプテリジン補酵素

フェニルアラニンからチロシンへの酵素的な水酸化反応は主に Kaufman とその協力者によってここ10数年間にわたり詳細に研究された (Kaufman, 1964a, 1967a, 1971; Kaufman and Fisher, 1974 の総説参照)。フェニルアラニン水酸化酵素は一原子酸素添加酵素 (monooxygenase) に属し、反応には適当な電子供与体を必要とする。チロシンのパラ位の酸素は分子状酸素に由来する。その反応式は次のように書かれる。



(1) の反応はフェニルアラニン水酸化酵素によるもので、この酵素は主にラット肝から得られている。 PH_4 は電子供与体であり、テトラヒドロプテリンが特異的に有効である。 QH_2 は共役酸化によって PH_4 から生ずるジヒドロプテリンであり、キノノイドジヒドロ型と考えられている (Kaufman, 1964b)。反応(2)は QH_2 の再還元反応であり、これを触媒する酵素は 'sheep liver enzyme' (Kaufman and Levenberg, 1959) と名づけられたが、のちにジヒドロプテリン還元酵素 (Brenneman and Kaufman, 1965) と改称された。この酵素は補酵素として還元型ピリジヌクレオチドを必要とするが、この点については後述する。(3) 式からわかるように、水酸化酵素活性はチロシン生成量または基質に依存する NAD(P)H の減少量で表わされる。微量測定には、 ^3H -(4)-フェニルアラニンを基質とし、いわゆる NIH シフトを利用し、生ずる THO

の放射活性を定量する方法もある (Guroff and Abramowitz, 1967)。

Kaufman の初期の研究で、 PH_4 活性をもつ物質がラット肝熱水抽出物に含まれていることがわかったが (Kaufman, 1958a)、種々の還元型補酵素あるいは還元物質が調べられた結果、接触還元によって調製されるテトラヒドロ葉酸が PH_4 活性をもつことが示された (Kaufman, 1958b)。次いで、6,7-ジメチルテトラヒドロプテリンまたは6-モノメチル体のような 'unconjugated pteridine' がさらに有効であることが認められ (Kaufman, 1959; Kaufman and Levenberg, 1959)、それ以来、特に合成が容易な6,7-ジメチル体がモデル物質として使用され、現在に及んでいる。ラット肝熱水抽出物中の有効物質がジヒドロビオプテリンであること (Kaufman, 1963)、この物質を補酵素とする場合にはジヒドロ葉酸還元酵素がさらに必要であること、またセビアプテリンとの関連については前に述べた。酵素的還元によって得られるテトラヒドロ葉酸に PH_4 活性がほとんどあるいは全くないことがわかり、その原因としてテトラヒドロ葉酸の6位の炭素に関する光学異性が想定された* (Kaufman, 1961)。しかし、接触還元によって得られるテトラヒドロ葉酸の PH_4 活性は大部分不純物として含まれる6-メチルテトラヒドロプテリンによることが示された (Lloyd *et al.*, 1971)。従って今のところ PH_4 は 'unconjugated pteridine' のテトラヒドロ誘導体のみであると考えてもよい。

フェニルアラニン水酸化酵素は最近ラット肝からかなり高度に精製され、そのいくつかの性質が明らかにされた (Kaufman and Fisher, 1970; Fisher *et al.*, 1972)。精製標品は電気泳動的に異なる二つのアイソザイムから成り、それぞれの分子量は51,000—55,000 と推定されている。各単量体は二量体または四量体として存在するという。酵素標品中の金属の化学分析、ESR スペクトル解析から、酵素1分子 (二量体の分子量を100,000 と仮定) につき鉄原子 (三価) が1-2個含まれていることが示された。酵素を *o*-フェナントロリンおよびシステインで処理することにより、30-40% の鉄原子が失われ、同時に酵素は失活するが、第二塩化鉄を加えると再活性化が起こることから、酵素作用には鉄原子の存在が必須と思われるが、その関与の機構は不明である。フェニルアラニン水酸化酵素は比較的

* テトラヒドロプテリンの6位における絶対配置はまだ解明されていない。

不安定で扱いにくい酵素であり、ラット肝から精製されたものでもその純度は85-95%といわれる(Kaufman and Fischer, 1970)。最近, affinity chromatography による精製法が開発されたので(Cotton and Gratton, 1975), さらに純度の高い標品が得られるものと期待される。

フェニルアラニンの酸化と共役して生ずるテトラヒドロプテリンの酸化物は化学量論的研究などからジヒドロプテリンと推定されたが(Kaufman, 1961), ジヒドロプテリンの互変異性体のうち, キノノイドジヒドロプテリンと結論された(Kaufman, 1964b)。キノノイドジヒドロプテリンにはオルトとバラの2種が考えられるが, そのいずれとも目下のところ断定はできない。この型のジヒドロプテリンはきわめて不安定で, 急速により安定な7,8-ジヒドロ型に変わるため, 今のところ単離することができない。

ジヒドロプテリジン還元酵素はキノノイドジヒドロプテリンのみを特異的にテトラヒドロ型に還元するが*, 7,8-ジヒドロプテリンには全く作用しない。この型のジヒドロ体はジヒドロ葉酸還元酵素によってのみ還元される。初期の研究では以上の点に関して若干の混乱が見られたが, Kaufman (1967) および Nagai (1968) の研究によって明確にされた。

ジヒドロプテリジン還元酵素の活性は過剰量のフェニルアラニン(またはチロシン)水酸化酵素の存在下で, チロシン(またはドーパ)の生成量, あるいは NADPH の酸化量で測定されてきた。テトラヒドロプテリンのキノノイドジヒドロプテリンへの酸化はフェニルアラニンの酵素的酸化と共役して起こるだけではなく, ジクロロフェノールインドフェノール(Kaufman, 1961), 酸化型チトクロムc(Katoh *et al.*, 1970; Archer and Scrimgeour, 1970; Harano, 1972) などのような酸化剤, あるいは H_2O_2 -ペルオキシダーゼ(Nielsen *et al.*, 1969) によっても起こることが示された。そこで, テトラヒドロプテリンをそれらの酸化剤ないしは酸化系によって酸化し, キノノイドプテリンを生成させ, それにジヒドロ還元酵素を共役させるという方法によってその酵素の研究が進められた。その結果, 同酵素はヒツジ肝からはほぼ均一なタイバク質として精製された(Nielsen *et al.*, 1969; Scrimgeour and Cheema, 1971; Cheema *et al.*, 1973;

Craine *et al.*, 1972)。精製酵素が二量体であることは彼らの一致した見解であるが, 単量体の分子量については 20,000—27,000 とかなりの幅がある。

フェニルアラニンの水酸化反応に関する初期の研究において Mitoma (1956) は NADH のほうが NADPH よりも有効であるとした。これに対して, Kaufman (1957) は NADPH のほうがはるかに有効という反対の結果を得, その後彼の酵素系ではもっぱら NADPH が使われてきた。しかし, Kaufman 自身の研究を含め, 上述した最近の研究では, ジヒドロプテリジン還元酵素としては NADH のほうがより有効であることが一致して認められている。筆者らの研究室でウシ肝からジヒドロプテリジン還元酵素が結晶状に得られ(二量体の分子量は 50,000), 1分子につき2分子の NADH と複合体をつくること, およびウシ肝抽出液中に同様の複合体が存在が確かめられた(長谷川, 未発表)。

以上のような還元型ビリジンスクレオチドの有効性に関するくいちがいを Kaufman は酵素標品ないしは組織中に含まれるプテリジン補酵素の還元レベルの問題に帰しているが(Craine *et al.*, 1972), 事実はさらに複雑なように思われる。どのようなテトラヒドロプテリンの酸化系とジヒドロプテリジン還元酵素とを組み合わせる場合でも, その共役系におけるキノノイドプテリンの濃度は最初に加えられるテトラヒドロプテリンの濃度, それがキノノイドジヒドロプテリンに酸化される速度およびテトラヒドロプテリンに再還元される速度に依存する(ただし, テトラヒドロプテリンとキノノイドジヒドロプテリンの自動酸化は無視するとして)。従って, この共役系の速度論的解析はきわめて困難であり, 事実, 各研究者によって報告されている kinetic parameter の値はさまざまである。多分, この複雑な事情が反映していると思われるが, テトラヒドロプテリンの人工的な酸化系を用いた場合にはジヒドロプテリン還元酵素の補酵素として確かに NADH のほうが有効であるが, フェニルアラニン水酸化酵素を酸化系として用いた場合には, 少なくともふつう用いられている条件下(フェニルアラニン水酸化酵素活性に比べ, ジヒドロプテリジン還元活性のほうが相対的に強い。in vivo でも類似の状況と思われる)では, NADPH が多少とも NADH より有効である(チロシン生成量の比較。杉山, 未発表)。この点は高度に精製したフェニルアラニン水酸化酵素を用いた実験系により, さらに吟味して見る必要があるように思われる。

* この再還元は比較的高濃度の2-メルカプトエタノールあるいは還元型ビリジンスクレオチドによっても起こる。

フェニルアラニン水酸化酵素の話にもどると、Kaufman (1970) は部分精製した彼のセビアプテリン還元酵素標品中にフェニルアラニン水酸化酵素を活性化するタンパク因子の存在を認め、PHS (phenylalanine hydroxylase stimulator) と名づけた。PHS はその後かなり高度に精製され、分子量は約 51,500, 4 個のサブユニットから成るとされている (Huang *et al.*, 1973)。Kaufman の水酸化酵素系を用い、pH 6.8 あるいは合成のテトラヒドロプテリン (6,7-ジメチルまたは 6-メチル体) を補酵素した場合は、酵素活性と酵素濃度との間にはほぼ直線的な関係が成り立つが、pH 8.0 でテトラヒドロプテリンを補酵素とした場合は、非活性が酵素濃度とともに減少する。PHS を添加するとこの減少は回復する。別の研究で、リゾレンチンのようなリン脂質により水酸化反応 (pH 6.9) の最大速度が約 50 倍促進されることが認められた (Fisher and Kaufman, 1973)。このリゾレンチンの作用は水酸化酵素の conformation を変えることによると思われるが、高濃度の酵素の存在下ではリゾレンチン効果は減少し、PHS によって同様に回復する。以上のことから PHS は生体内におけるフェニルアラニンの水酸化反応に大きな影響を与えるものと考えられる。PHS の活性促進効果の機構は明確にされていない。反応の速度論的解析から、一つの可能性として、テトラヒドロプテリンは共役酸化によって直接キノノイドジヒドロプテリンに変わるのではなく、ある種の間体 (トリヒドロプテリン、遊離基?) がまず生成され、このもののキノノイドジヒドロプテリンへの変換が PHS によって促進されるものと想定されている (Huang and Kaufman, 1973)。重金属を含む酸化酵素の場合には、反応に O_2^- (superoxide radical) が関与する可能性が考えられるが、フェニルアラニンの水酸化反応の場合には SOD (superoxide dismutase) が阻害作用を示さないことからその可能性は否定されている (Kaufman and Fisher, 1974, p. 299)。

生体組織におけるフェニルアラニンの水酸化能は基質濃度、酸素分圧など以外に、少なくとも次のような諸因子によって影響されるものと考えられる。(1) 還元型プテリンのレベル。(2) 還元型ピリジンスクレオチドのレベル。(3) ジヒドロ葉酸およびジヒドロプテリジン還元酵素活性。(4) 水酸化酵素活性。(5) PHS (あるいはリン脂質も) の存在。(1) — (3) は他のプテリン要求性酵素、たとえばチロシン水酸化酵素、トリプトファン水酸化酵素などの場

合にも同様に重要と思われる。以上の諸点のうち少なくともいくつかは、フェニルケトン尿症、カテコールアミン、セロトニンの生合成などを研究する際に留意されるべきであろう。

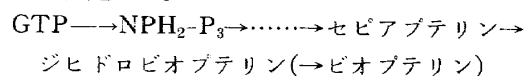
上述した (2) の二つの還元酵素はプテリジン補酵素を有効型 (テトラヒドロ体) として保持する機構にあずかるものと考えられる。(1) の問題に関しては、もう一つの側面、動物におけるプテリン、特にビオプテリンの生合成について触れる必要がある。

動物、特に哺乳類におけるビオプテリンの起源に関しては、ビタミン、葉酸由来という可能性も考えられたが、それらには現在ほぼ完全に否定されている。プテリンの生合成の研究に関しては福島 (1975) の総説があるので詳細はそれに譲るが、目下知られている限りでは、動物におけるビオプテリンの前駆体は、細菌におけるジヒドロ葉酸の場合と同様 GTP と思われる。細菌 (*E. coli*, *L. plantarum*) におけるジヒドロ葉酸の生合成は Brown と Shiota の研究室においてそれぞれ独立に研究され、その経路がほぼ完全に明らかにされた (Brown, 1971; Shiota, 1971)。彼らの研究によると、GTP はシクロヒドロラーゼ* または ジヒドロネオプテリン三リン酸合成酵素によって、D-erythro-7,8-ジヒドロネオプテリン三リン酸 (NPH_2-P_3) に変わる。この反応の際、グアニンの 8 位の炭素はギ酸の形で離脱する。 NPH_2-P_3 は 2 段階の酵素反応を経て、6-ヒドロキシメチル-7,8-ジヒドロプテリン (III, $R_1 = CH_2OH$) に変化し、この中間体は α -アミノベンズイルグルタミン酸と縮合し、ジヒドロ葉酸となる。この反応を触媒するのがジヒドロ葉酸合成酵素である。補助因子として ATP と Mg^{2+} が必要である。

動物における 'unconjugated pteridine' の生合成に関しては、 ^{14}C -化合物を用いる *in vivo* の研究が多数行なわれており、グアニンスクレオチドがその前駆体と考えられてきた (福島, 1975 の総説参照)。この線に沿った研究で、Fukushima (1970) はショクヨウガエルの幼生に ^{14}C -(U)-GTP を注射すると、その放射能が幼生皮膚のビオプテリン、セビアプテリンその他のプテリンに取り込まれることを確認した。その際、セビアプテリンの代謝回転速度がビオプテリンよりも速いこと、セビアプテリンを同時に投与するとビオプテリンへの放射能の取り込みが阻害されることを観察した。さらに、 ^{14}C -(U)-GTP を予め *E. coli* のシクロヒドロラーゼ標品で処理してから幼生に投与すると、ビオプテリン

* 正確にはシクロヒドロラーゼ I

への放射能の取り込みが増加することを認め、以上の結果を総合して、ビオプテリンの生合成経路を次のように推定した。



ビオプテリンの生合成の研究はその後哺乳動物の培養細胞系についても行なわれた (Fukushima and Shiota, 1974; Buff and Dairman, 1975)。さらに最近になり, Syria golden hamster の肝から, GTP を $\text{NPH}_2\text{-P}_3$ (?) に変える無細胞画分が得られた (Fukushima *et al.*, 1975)。その画分中にはシクロヒドロラーゼ活性が存在する。同様の酵素活性がショウジョウバエの粗抽出液中にも認められた (Fan, C.L., and G.M. Brown, Biochem. Genetics, 印刷中。下記 Fan *et al.*, 1975 から引用)。さらに, ショウジョウバエには $\text{NPH}_2\text{-P}_3$ からセピアプテリンを合成する酵素系が存在する (Fan *et al.*, 1975)。 $\text{NPH}_2\text{-P}_3$ がセピアプテリンに変わる際に考慮すべき問題点が少なくとも二つある。(1) $\text{NPH}_2\text{-P}_3$ の6位のトリヒドロシブピロピル側鎖はGTPのD-リボースに由来し, D-erythro型である。これに対して, セピアプテリンの側鎖はL-ラクタルであり, ビオプテリンのそれはL-erythro型である。従って反応経路のある段階でエピマー化が起こる必要がある。(2) $\text{NPH}_2\text{-P}_3$ の三リン酸基はいずれかの段階で切断される必要があるが, NPH_2 の側鎖の末端は $-\text{CH}_2\text{OH}$ であり, セピアプテリンとビオプテリンのそれは $-\text{CH}_3$ である。従って末端基の還元が起こらなければならない。

ビオプテリンの生合成に関する酵素レベルの研究は開始されたばかりであり, その解明には若干の時日を要すると思われる。ともあれ, 今までの研究結果からすると, 葉酸系化合物とビオプテリンの生合成過程においては, $\text{NPH}_2\text{-P}_3$ が分岐点になると思われる。動物においては $\text{NPH}_2\text{-P}_3$ からある反応段階を経てセピアプテリンがまず合成され, それがセピアプテリン還元酵素によってジヒドロビオプテリンに還元され, 動物種によってはそれが酸化型として蓄積されと考えられる。以上のような推定に基づくと, セピアプテリン還元酵素を還元型ビオプテリンの生合成経路の末端近くに位置づけることができるであろう。

さて, Kaufman (1963) の研究以来, ラット肝 (あるいは一般に哺乳動物肝) においてフェニルアラニン水酸化酵素の補酵素はテトラヒドロビオプテリンとされており, チロシンあるいはトリプトファ

ン水酸化酵素の場合も同様と考えられている。しかし, この考え方が生物全般に当てはまるとするのは早計のように思われる。Comamonas Sp. ではフェニルアラニンによってその水酸化酵素が誘導されるが, その際同時に生産される主要プテリンはL-threo-ネオプテリンであり, そのテトラヒドロ体が補酵素と考えられている (Guroff and Rhoads, 1969)。この細菌にもGTPシクロヒドロラーゼの存在が証明されているが (Cone *et al.*, 1974), 一般に細菌に存在するのはネオプテリンであって, ビオプテリンの存在は報告されていない。ジヒドロネオプテリン (D- および L-erythro) は酸性側でジヒドロ葉酸還元酵素によって還元され, その生成物はラット肝のフェニルアラニン水酸化酵素の補酵素として作用する (長井・長井・秋野, 未発表)。同様の結果は接触還元によって得られたテトラヒドロネオプテリンについても得られている (Osanai and Rembold, 1971)。

以上に関連して興味深いのはカエルの成体の皮膚に含まれる主要プテリンの差異である (Blakley, 1969, p.16 参照)。たとえば, *Rana nigromaculata*, *R. catesbeiana* ではビオプテリンであるが, *Xenopus laevis*, *Bufo bufo* ではネオプテリン (D-erythro 型と思われる) である。*Bufo bufo* では幼生型の主要プテリンがビオプテリンで, 成体型ではネオプテリンであるという報告はきわめて興味深い (Hama, 1963)。以上のような皮膚に蓄積されている主要プテリンに対応して肝の主要プテリンもビオプテリンまたはネオプテリンである (蘇, 未発表)。ネオプテリン型の *Xenopus laevis*, *Bufo marinus* 肝にはラット肝にほぼ匹敵するフェニルアラニン水酸化酵素活性が存在するが, 部分精製した酵素標品について測定した限りでは, テトラヒドロビオプテリンとテトラヒドロネオプテリン (D-erythro 型) との間に補酵素活性の差異はほとんどない。この種の動物ではテトラヒドロネオプテリンがプテリジン補酵素と思われる。

プテリン要求性水酸化酵素のうち, グリセリルエーテル (Tietz *et al.*, 1964), あるいはレチニルメチルエーテル (Narindrasorasak and Lakshmana, 1972) を酸化する酵素はラット肝のミクロゾームに局在し, 酵素とプテリジン補酵素は強固に結合していると考えられているが, プテリンの同定は行なわれていない。

その他, 還元型プテリンに関しては, 魚類 *Crenilabrus melops* の稚魚の皮膚にテトラヒドロビオ

プテリン様の物質が存在すること (Ziegler, 1963), またある種のイモリの尾部再生芽中にテトラヒドロビオプテリンの存在が報告され (Kokolis and Ziegler, 1968), 色素胞の出現との関連が論じられている (Hama, 1963 をも参照)。最近, 6,7-ジメチルプテリン (H_4) がラット肝ミトコンドリアの酸素の消費をひき起こし, 同時に ATP が生成されるという報告がなされた (Taylor and Hochstein, 1975)。その際の P: O は約 0.9 であるという。

4. フェニルアラニン水酸化酵素系とフェニルアラニンケトン尿症 (PKU)

PKU は一般的には遺伝的なフェニルアラニン水酸化酵素の欠損ないしは活性低下が原因と考えられている。しかし, 最近, 低フェニルアラニン食を与えてもこの種の疾患に特有な精神障害が依然として進行するといういくつかの症例が報告されている。それらの患者では, フェニルアラニン水酸化酵素, ジヒドロプテリジン還元酵素, PHS 活性およびテトラヒドロプテリンのレベルは正常人とほとんど同程度といわれる (Kaufman *et al.*, 1975)。一方, この型の PKU 患者にテトラヒドロビオプテリンを静注すると血清中のフェニルアラニンレベルが低下したという報告もある (Danks *et al.*, 1975)。また L-ドーパと 5-ヒドロキシトリプトファンを投与すると, 症状が軽減するともいわれる (Bartholomé and Byrd, 1975)。以上の報告はいずれも短報で詳細は不明であるが, 水酸化酵素系以外にもフェニルアラニンレベルを調節する機構が存在することを示唆しているようにも思われる。

5. あとがき

筆者がプテリジンも単なる「鼻くそ」ではないという小文を書いてから既に10年近くになる (秋野, 1967)。その間にプテリジンの生化学はかなり進歩し, 国際シンポジウムも2回開催された (1969年, 鳥羽; 1975年, コンスタンツ)。本稿ではそうした進歩を多少とも跡づけたつもりであるが, 記載が自分の興味本位になったことはいなめない。特に神経化学の立場から昨今おおいに興味をもたれているチロシン水酸化酵素とトリプトファン水酸化酵素の紹介を割愛したのは遺憾である。それらについては, 永津 (1976), 市山 (1972), Kaufman and Fisher (1974) の総説を参照していただきたい。

終わりに, かつて筆者らの研究室に在籍し, プテ

リンの研究に従事された津末玄夫・長井幸史・同雅子・加藤節子・福島健の諸氏に対し深く謝意を表したい。

文 献

- 秋野美樹 (1967) 生物科学 19: 11-18.
 ALBERT, A. (1952) *Quart. Revs. Chem. Soc.* 6: 197-237.
 ——— (1954) *Fortschritte Chem. org. Naturstoff*, ed. by L. Zechmeister, Springer, Berlin, pp. 351-403.
 ANGIER *et al.* (1945) *Science* 102: 227-228.
 ——— (1946) *Science* 103: 667-669.
 ARCHER, M. C. AND K. G. SCRIMGEOUR (1970) *Canad. J. Biochem.* 48: 278-287.
 ARUGA, H., S. KAWASE AND M. AKINO (1954) *Experientia* 10: 336-337.
 有賀久雄, 吉武成美 (1954) 蚕糸学雑誌 23: 27-34.
 BARTHOLOMÉ, K. AND D. J. BYRD (1975) *Lancet*, 1042.
 BLAKLEY, R. L. (1969) *The Biochemistry of Folic Acid and related Pteridines*, North-Holland, Amsterdam.
 BRENNEMAN, A. R. AND S. KAUFMAN (1965) *J. Biol. Chem.* 240: 3617-3622.
 BROWN, G. M. (1971) *Adv. Enzymol.* 35: 35-77.
 BUFF, K. AND W. DAIRMAN (1975) *Mol. Pharmacol.* 11: 87-93.
 CHEEMA, S., S. J. SOLDIN, A. KNAPP, T. HOFMANN AND K. G. SCRIMGEOUR (1973) *Canad. J. Biochem.* 51: 1229-1239.
 CONE, J. E., I. PLOWMAN AND G. GUROFF (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 5551-5558.
 COTTON, R. G. H. AND P. J. GRATTON (1975) *Eur. J. Biochem.* 60: 427-430.
 CRAINE, J. E., E. S. HALL AND S. KAUFMAN (1972) *J. Biol. Chem.* 247: 6082-6092.
 DANKS, D. M., R. H. G. COTTON AND P. SCHLESINGER (1975) *Lancet*, 1043.
 FAN, C. L., G. G. KRIVI AND G. M. BROWN (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67: 1047-1054.
 FISHER, D. B., R. KIRKWOOD AND S. KAUFMAN (1972) *J. Biol. Chem.* 247: 5161-5167.
 FISHER, D. B. AND S. KAUFMAN (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 4335-4353.
 FORREST, H. S. AND H. K. MITCHELL (1954) *J. Am. Chem. Soc.* 76: 5656-5658.
 ——— AND ——— (1955) *J. Am. Chem.*

- Soc. 77: 4865-4869.
- , C. VAN BAALEN AND J. MEYERS (1958) *Arch. Biochem.* 78: 95-99.
- , ——— AND ——— (1959a) *Arch. Biochem.* 83: 508-520.
- , D. HATFIELD AND C. VAN BAALEN (1959b) *Nature, Lond.* 183: 1269-1270.
- AND S. NAWA (1962) *Nature, Lond.* 196: 372-373.
- FUKUSHIMA, K., I. ETO, D. SALIBA AND T. SHIOTA (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 644-651.
- FUKUSHIMA, T. AND M. AKINO (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 128: 1-5.
- (1970a) *Arch. Biochem. Biophys.* 139: 361-369.
- (1970b) *Exp. Parasitology* 28: 473-481.
- AND T. SHIOTA (1972) *J. Biol. Chem.* 247: 4549-4556.
- AND ——— (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 4445-4451.
- 福島 健 (1975) 蛋白質 核酸 酵素 20: 691-699.
- GATES, M. (1947) *Chem. Revs.* 41: 63-95.
- 後藤幹保 (1964) 生化学 36: 849-865.
- GOTO, M., M. KONISHI, K. SUGIURA AND M. TSUSUE (1966) *Bull. Chem. Soc. Jap.* 39: 929-932.
- GUROFF, G. AND A. ABRAMOWITZ (1967) *Analyt. Biochem.* 19: 548-555.
- AND C. A. RHOADS (1969) *J. Biol. Chem.* 244: 142-146.
- GYURE, W. L. (1973) *Insect Biochem.* 4: 113-121.
- HADORN, E. AND H. K. MITCHELL (1951) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 37: 650-665.
- 波磨忠雄, 牧 裕, 有賀久雄 (1949) 動物学雑誌 58: 219-222.
- HAMA, T. (1963) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 100: 977-986.
- HARANO, T. (1972) *Insect Biochem.* 2: 385-399.
- HIRATA, Y., K. NAKANISHI AND H. KIKKAWA (1950) *Bull. Chem. Soc. Jap.* 23: 76-80.
- HOPKINS, F. G. (1889) *Nature, Lond.* 40: 335.
- (1891) *Nature, Lond.* 45: 197.
- (1895) *Phil. Trans. R. Soc.* 186B: 661-682.
- HUANG, C. Y., E. E. MAX AND S. KAUFMAN (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 4235-4241.
- AND S. KAUFMAN (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 4242-4251.
- 市山 新 (1972) 生化学 44: 825-848.
- IWANAMI, Y. AND M. AKINO (1972) *Tetrahedron Letters* 31: 3219-3222.
- AND ——— (1975) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 21: 143-145.
- KATO, S. AND M. AKINO (1966) *Experientia* 22: 793-794.
- , M. NAGAI, Y. NAGAI, T. FUKUSHIMA AND M. AKINO (1970) *Chemistry and Biology of Pteridines*, ed. by K. Iwai, M. Akino, M. Goto and Y. Iwanami, International Academic Printing Co., Tokyo, pp. 226-234.
- (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 146: 202-214.
- , Y. ARAI, T. TAKETANI AND S. YAMADA (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 370: 378-388.
- KAUFMAN, B. T. AND R. C. GARDINER (1966) *J. Biol. Chem.* 241: 1319-1328.
- KAUFMAN, S. (1957) *J. Biol. Chem.* 226: 511-524.
- (1958a) *J. Biol. Chem.* 230: 931-939.
- (1958b) *Biochim. Biophys. Acta* 27: 428-429.
- (1959) *J. Biol. Chem.* 234: 2677-2682.
- AND B. LEVENBERG (1959) *J. Biol. Chem.* 234: 2683-2688.
- (1961) *J. Biol. Chem.* 236: 804-810.
- (1962) *J. Biol. Chem.* 237: PC 2712-2713.
- (1963) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 50: 1085-1092.
- (1964a) *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 26: 977-983.
- (1964b) *J. Biol. Chem.* 239: 332-338.
- (1967a) *Ann. Rev. Biochem.* 36: 171-184.
- (1967b) *J. Biol. Chem.* 242: 3934-3943.
- AND D. B. FISHER (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 4745-4750.
- (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 4751-4759.
- (1971) *Adv. Enzymol.* 35: 245-319.
- AND D. B. FISHER (1974) *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*, ed. by O. Hayaishi, Academic Press, New York, pp. 285-369.
- , S. MILSTIEN AND K. BARTHOLOMÉ

- (1975) *Lancet*, 708.
- KIDDER, G. W. AND V. C. DEWEY (1968) *J. Biol. Chem.* **243**: 826-833.
- KITAYAMA, C. AND M. TSUSUE (1975) *Agr. Biol. Chem.* **39**: 905-906.
- KOKOLIS, N. AND I. ZIEGLER (1968) *Z. Naturforsch.* **23b**: 860-865.
- LEVENBERG, B. AND O. HAYAISHI (1959) *J. Biol. Chem.* **234**: 955-961.
- LLOYD, T., T. MORI AND S. KAUFMAN (1971) *Biochem.* **10**: 2330-2336.
- MATSUBARA, M., M. TSUSUE AND M. AKINO (1963) *Nature, Lond.* **199**: 908-909.
- AND M. AKINO (1964) *Experientia* **20**: 574-575.
- , S. KATOH, M. AKINO AND S. KAUFMAN (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **122**: 202-212.
- MATSUMOTO, J., J. T. BAGNARA AND J. D. TAYLOR (1971) *Exp. in Physiol. Biochem.* **4**: 289-363.
- MITOMA, C. (1956) *Arch. Biochem. Biophys.* **60**: 476-484.
- NAGAI (MATSUBARA), M. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* **126**: 426-435.
- 永津俊治 (1976) 蚕白質 核酸 酵素 **21**: 161-173.
- NARINDRASORASAK, S. AND M. R. LAKSHAMAN (1972) *Biochem.* **11**: 380-384.
- NAWA, S. AND T. TAIRA (1954) *Proc. Jap. Acad.* **30**: 632-636.
- NAWA, S. (1960) *Bull. Chem. Soc. Jap.* **33**: 1555-1560.
- NIELSEN, K. H., V. SIMONSEN AND K. E. LIND (1969) *Eur. J. Biochem.* **9**: 497-502.
- OSANAI, M. AND M. REMBOLD (1971) *Z. Physiol. Chem.* **352**: 1359-1362.
- PATTERSON, E. L., H. P. BROQUEST, A. M. ALBRECH, M. H. VON SALTZA AND E. L. R. STOKSTAD (1955) *J. Am. Chem. Soc.* **77**: 3167-3168.
- , M. H. VON SALTZA AND E. L. R. STOKSTAD (1956) *J. Am. Chem. Soc.* **78**: 5871-5873.
- PFLEIDERER, W. AND H. ZONDLER (1966) *Chem. Ber.* **99**: 3008-3021.
- PURRMANN, R. (1940a) *Ann. Chem.* **544**: 182-190.
- (1940b) *Ann. Chem.* **546**: 98-102.
- (1941) *Ann. Chem.* **548**: 284-292.
- (1943) *Angew. Chem.* **56**: 253-258.
- REMBOLD, H. AND W. L. GYURE (1972) *Angew. Chem. (English ed.)* **11**: 1061-1072.
- SCHÖPF, C. (1964) *Pteridine Chemistry*, ed. by W. Pfeleiderer and E. C. Taylor, Pergamon, Oxford, pp. 3-13.
- SHIOTA, T. (1971) *Comprehensive Biochemistry*, ed. by M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, **20**: 111-152.
- SCRIMGEOUR, K. G. AND S. CHEEMA (1971) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **186**: 115-118.
- 杉浦 桂, 後藤幹保 (1972) 日本化学会誌 (1): 206-208.
- SUGIURA, K., S. TAKIKAWA, M. TSUSUE AND M. GOTO. (1973) *Bull. Chem. Soc. Jap.* **46**: 3312-3313.
- TAIRA, T. (1961a) *Nature, Lond.* **189**: 231-232.
- (1961b) *Jap. J. Genetics* **36**: 244-256.
- TAKIKAWA, S. AND M. TSUSUE (1975) *Zool. Mag.* **84**: 58-60.
- TAYLOR, D. AND P. HOCHSTEIN (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**: 156-162.
- TIETZ, A., M. LINDBERG AND E. P. KENNEDY (1964) *J. Biol. Chem.* **239**: 4081-4090.
- 津末玄夫, 秋野美樹 (1965) 動物学雑誌 **74**: 91-94.
- TSUSUE, M. (1967) *Experientia* **23**: 116-117.
- (1971) *J. Biochem.* **69**: 781-788.
- VISCONTINI, M. (1960) *Industrie Chimique Bilge* **10**: 1181-1192.
- (1965) *Z. Naturforsch.* **20b**: 327-331.
- (1968) *Fortschritte Chem. Forsch.* **9**: 605-638.
- ZIEGLER-GÜNDER, I. AND E. HADORN (1958) *Z. Vereib Lehre.* **89**: 235-245.
- ZIEGLER, I. (1963) *Z. Naturforsch.* **18b**: 551-556.