

マウスならびにラット肝 tryptophan oxygenase の特性上の差異について

宮尾 陟・出来俊昭*・石黒 茂

(家畜薬理学研究室)

昭和53年8月21日 受理

Characteristic Differences of Tryptophan Oxygenase in Mouse and Rat Livers

Noboru MIYAO, Toshiaki DEKI* and Shigeru ISHIGURO

(Laboratory of Veterinary Pharmacology)

緒 論

tryptophan (以下 Try) の主要代謝経路の初段階に働く tryptophan oxygenase (EC 1.13.1.12, 以下 TO) は, ラット肝についての多くの研究で, 鉄 porphyrin 酵素であることが明らかにされている^{12,16,21,28)}. また肝 TO の基質, ホルモンによる誘導, その他の種々の物質による誘導, 阻害の研究は, ほとんどラットについて行われており, マウス肝についての報告はあまりみられない. マウスでは毒素, 腫瘍などを中心にして研究が行われており^{2,4,34)}, ラットで行われているような特性上の研究はなされていない. しかもこれらマウスについての観察は, ホロ TO 活性のみを測定して考察しているものであり, マウス肝 TO とラットのそれとの性質の差異については, 全く考慮されていない. 著者らはたまたまほかの目的でマウス肝 TO を測定したところ, マウス肝 TO が hematin 添加によって活性がほとんど上昇しないことをはじめ, ラット肝 TO とは非常に異なる性質がいくつかみられたので, 両者について特性上の差異を検討した.

材料と方法

1. 実験動物

80~90日齢のマウス (ICR-JCL) とラット (Wistar) の雄を使用した. マウスは日本クレアのマウスケージ No.3 で5匹飼い, ラットは日本クレアのエコンケージ A で4匹飼いとす. 飼料は固型飼料 (日本クレア CE-2) を使用し, 水とともに自由に与えた. 副腎摘

出は常法どおり行い, 実験には摘出後3~4日のものを使用した.

2. 使用化合物とその投与法

L-Try (半井化学薬品) 0.1~1 g/kg, hemin (Bovine Crystalline Type 1, SIGMA, NaOH で溶解後 HCl で pH 7~8 に修正) 10 mg/kg, histamin dihydrochloride (半井化学薬品) 100 mg/kg, hydrocortisone acetate (和光純薬工業) 20 mg/kg, L-histidine dihydrochloride (和光純薬工業) 100 mg/kg, 5-hydroxytryptamine (和光純薬工業, 以下 5-HT) 100 mg/kg, DL-ethionine (半井化学薬品) 40 mg/kg をいずれも腹腔内投与した.

3. TO 活性の測定

断首放血後, すみやかに肝臓をとり出し (マウスの場合, 胆のうは除去した), 直ちに氷冷して, 0.01 g まで正確に重量を測定, 冷却下で7容の KCl 溶液を加え, UL-TRA-TURRAX, TP 18-10型 homogenizer で homogenate (約12.5%肝) を作製した. その 1.0 ml を homogenate 酵素試料として測定に供した. さらに cell sap 酵素試料の調製には, 65P 型日立分離用超遠心機を用い, 型どおりに連続遠心分離を行った. 酵素活性は Knox²⁹⁾ に準じて測定したが, 基質濃度は結果のところ後述するように変更した. 反応組成液は L-Try 溶液 0.5 ml, 酵素試料 (homogenate あるいは cell sap) 1.0 ml (一部 homogenate 1.0 ml と 2.0 ml を比較した), その他目的に応じて, 16 μ M hemin 0.5 ml, 0.168~0.416 mg/ml globin 1.0 ml, ミトコンドリア (以下 Mt) 画分 1.0ml, マイクロゾーム (以下 Ms) 画分 1.0 ml, 1.32 M adenosine 1.0 ml, 1.32 M AMP 1.0 ml, 1.32 M allopurinol 1.0 ml あるいは種々の単位 (後述) の xanthine oxidase (以下 XO) 溶液 1.0 ml を加えたが, いずれの場合も蒸留水で全量 4 ml

本論文の要旨は第84回日本獣医学会において発表した,
*シー・エス・ケー実験動物研究所伊那リサーチ Research Laboratories C.S.K. Laboratory Animal Co., Ltd. Ina Research

としたものを incubate した。酵素活性は kynurenine 量/肝湿重量/1時間 ($\mu\text{M/g/h}$) で表わした。

4. 肝 protoporphyrin の定量

断首放血後、肝をとり出し、その約 15 g に酢酸エチル混液 (酢酸エチル:氷酢酸 4:1) 60 ml を加え、わずかに温めながら homogenize する。一夜放置後濾過し、残渣を 15 ml ずつの酢酸エチル混合液で 3 回洗滌して得た全濾液について、Dresel and Falk⁹⁾ に準じて定量した。

5. 肝 xanthine oxidase の測定

Litwack ら³¹⁾ に準じて測定し、単位は 1 時間 incubate 後の肝 1 g 当たり xanthine の消失量 ($\mu\text{M/g/h}$) で表わした。

結 果

1. マウスにおける TO 活性値の検討

(1) Knox の方法による TO の測定

まず Knox の方法²³⁾ にしたがって、酵素試料 (homogenate) 1.0 ml と 2.0 ml を用い測定した場合、ラットでは酵素量に比例した kynurenine 生成がみられるが、マウスの場合はそのような比例した生成がみられず、2 ml を用いたときは 1 ml の場合の約 2.8 倍の生成量であった。活性値としてみると Table 1 のとおりで、ラットでは homogenate 1.0 ml と 2.0 ml を用いた場合差はないが、マウスでは 2.0 ml を用いた場合、明らかに高い活性値を示した。

(2) Michaelis 定数 (K_m) の検討

(1) の結果から、マウスでは酵素量に比較して、基質濃度の低いほうが活性が高くなるため、一定酵素量 (homogenate 1.0 ml) に対する種々の基質濃度を検討した。Fig. 1 に示すように、基質濃度 $0.5 \times 10^{-3} \text{M}$ で最大活性値が得られ、 $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$ まで徐々に減少し、それ以後急速に減少した。これより K_m 値を求めると $1.5 \times 10^{-4} \text{M}$ となり、Knox²³⁾ が同じ測定条件で示

Table 1. Tryptophan oxygenase activity assayed as described by Knox in the rat- and mouse-liver

Animal	Tryptophan oxygenase activity (μM kynurenine/g/h)	
	A: Homogenate 1.0ml	B: Homogenate 2.0ml
Rat	2.08 ± 0.20	2.09 ± 0.29
Mouse	$1.47 \pm 0.17^*$	2.07 ± 0.14

Results are given as the mean \pm standard deviation of ten or more animals.

*Significantly different from B ($P < 0.001$)

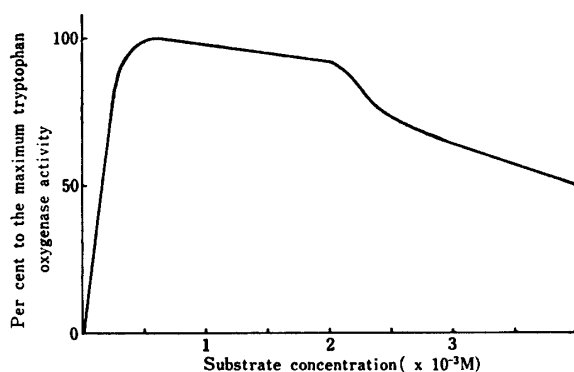


Fig. 1. Mouse liver tryptophan oxygenase activity in various substrate concentrations.

しているラットの K_m 値 $4 \times 10^{-4} \text{M}$ に比べて相当低い値であった。

(3) 基質濃度と反応時間

最大活性を示す基質濃度 $0.5 \times 10^{-3} \text{M}$ と、活性値が急速に減少し始める $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$ について、反応時間と TO 活性の関係を検討した。 $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$ を採用したのは、活性値が急激に低下する直前の段階であることのほか、最大活性値と比較的 plateau にあること、Knox の方法²³⁾ による基質濃度が $2.25 \times 10^{-3} \text{M}$ であることなどのためである。結果は Fig. 2 のとおりで、基質濃度 $0.5 \times 10^{-3} \text{M}$ の場合、30分ごろから60分すぎまでは直線的に増加するが、それ以後は減少した。しかし $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$ の場合は、120分までは直線的増加

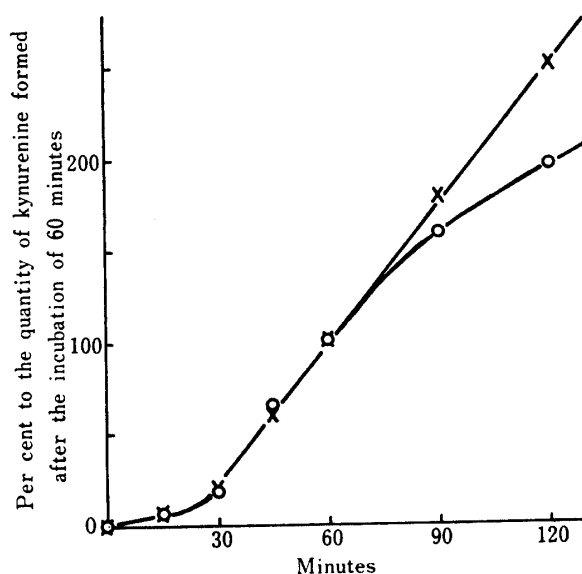


Fig. 2. The time course of the conversion of tryptophan to kynurenine when incubated in substrate concentration of $0.5 \times 10^{-3} \text{M}$ (\circ — \circ) and $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$ (\times — \times).

Table 2. Effects of hemin in vivo (10 mg/kg body wt.) and in vitro (2 μ M) on rat- and mouse-liver tryptophan oxygenase activity

Animal	Enzyme	Tryptophan oxygenase activity (μ M kynurenine/g/h)		
		Control	One hour after hemin injection	Two hours after hemin injection
Rat	Holo	2.24 \pm 0.18	4.28 \pm 0.68* ¹	7.02 \pm 0.31* ¹
	Total	3.72 \pm 0.41	4.81 \pm 0.64	6.73 \pm 0.13
	Holo/apo	1.51	8.06	—
Mouse	Holo	2.11 \pm 0.46	3.33 \pm 0.61* ²	2.85 \pm 0.26* ³
	Total	2.08 \pm 0.45	3.19 \pm 0.47	2.86 \pm 0.34
	Holo/apo	—	—	—

The activities are given as the mean \pm standard deviation of 6 to 10 animals.

*¹Significantly different from the control (P<0.001)

*²Significantly different from the control (P<0.01)

*³Significantly different from the control (P<0.05)

を示した。以上の結果から、以後の肝 TO 活性測定の際の基質濃度として、 2.0×10^{-3} M を採用することにした。なお 2.0×10^{-3} M の場合の TO 活性値は 0.5×10^{-3} M の場合の約93%であった。

2. in vivo ならびに in vitro における hemin の影響

前述のように、ラット肝 TO は hemein 系統が賦活物質とされており、in vitro で hemein の添加により、アポ酵素がホロ酵素化して、活性の上昇が認められる。また porphyrin とみなされるいくつかの物質の注射後のラット肝 TO 活性の上昇が観察されている^{3,10}が、直接 hemein を注射した例はみられない。そこで反応液に 2μ M の hemin を加えた場合の総酵素活性、ならびに hemin 注射後1時間と2時間におけるホロ酵素と総酵素活性などを、ラット肝とマウス肝について比較した。

結果は Table 2 に示すとおりで、対照(無処置)の場合、ラットでは hemin 添加により酵素活性が増加するが、マウスでは全く増加がみられなかった。hemin 注射1時間後の活性値はどちらも増加しているが、マウスの場合、生理食塩液注射後1時間の値は $3.01 \pm 0.45 \mu$ M/g/h なので、この活性値とは有意の差はみられない。また hemin 添加による酵素活性の増加も認められない。ラットではホロ酵素とアポ酵素の比率が非常に変化し、ホロ酵素の著しい増加すなわちアポ酵素のホロ酵素化が認められる。hemin 注射2時間後の活性値も、ラット、マウスとも対照値に比べて増加しているが、マウスの場合、生理食塩液注射2時間の値は $2.40 \pm 0.32 \mu$ M/g/h であり、この活性値との間では有意の差は認められなかった。

無処置ラット肝 TO では、基質と TO との反応初期に不応期が認められているが²⁰、この不応期は hemin の反応液中への添加により消失すること、基質投与ラット肝 TO でも、この不応期が認められないことが観察されている¹⁷ので、マウスについてこの点を追試した。結果は Fig. 3 のとおりで、Try 投与肝 TO では不応期の消失が認められるが、無処置肝 homogenate への hemin 添加は何ら影響を与えなかった。

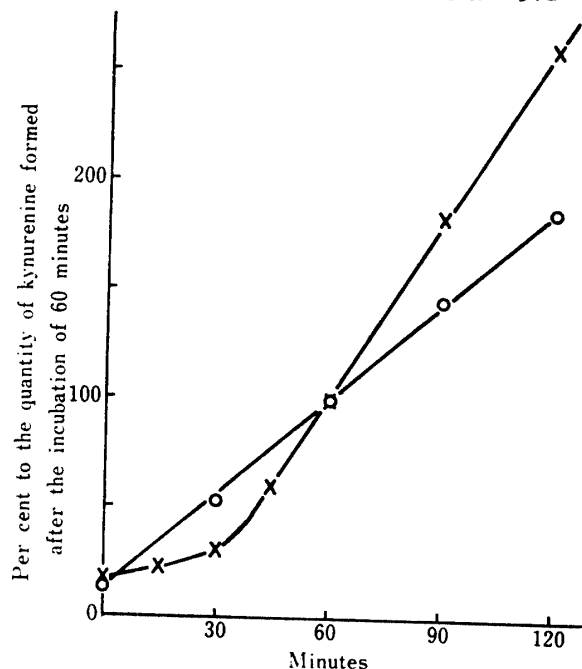


Fig. 3. The time course of the conversion of tryptophan to kynurenine in mouse liver homogenates.

○—○, Whole liver homogenate from mice injected with tryptophan of 200 mg/kg body wt.
 ×—×, Whole liver homogenate from intact mice, assayed in the presence of 2μ M hemin

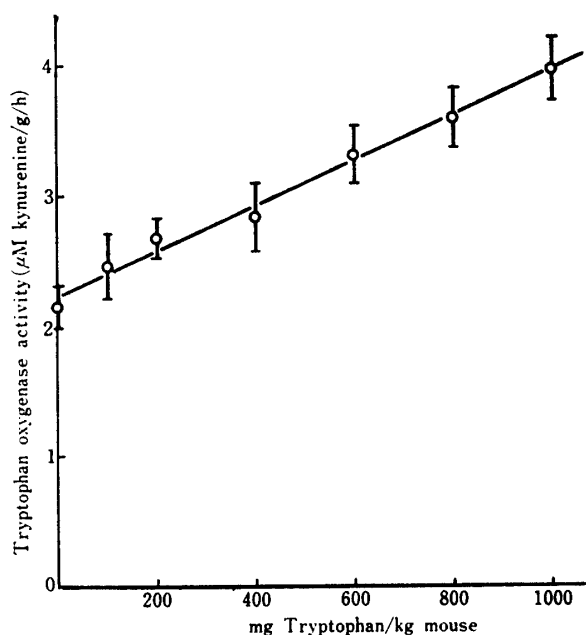


Fig. 4. Tryptophan oxygenase activity in mice 5 hours after intraperitoneal injection of amounts of tryptophan shown. Each point represents the mean of ten or more animals and vertical bars do the standard deviation.

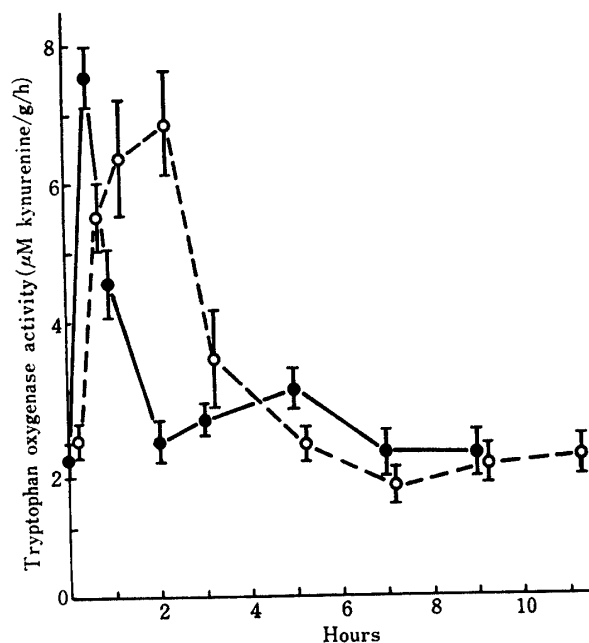


Fig. 5. Changes of liver tryptophan oxygenase activity in intact or adrenalectomized mice after the injection of L-tryptophan (500 mg/kg body wt.). ●—● intact, ○—○ adrenalectomized. The other notes are the same as in Fig. 4.

3. 種々の化合物による酵素誘導

(1) 種々の Try 量によるマウス肝 TO の誘導

種々の量の Try をマウスに腹腔内注射した後 6 時間における TO 活性値を測定した結果は, Fig. 4 のとおりで, L-Try 0~1,000 mg/kg の投与により, 投与量に比例した活性の増加がみられた。

(2) 無処置ならびに副腎摘出マウスにおける Try 投与後の TO 活性値の変動

L-Try 500 mg/kg をマウスに腹腔内注射した後, 約 10 時間までの肝 TO 活性値の変動を調べた。無処置マ

ウスでは, 投与後 30 分で第 1 のピークが現われ, 2 時間後に対照値 (0 時間) 近くまで減少し, 5 時間後に再びわずかなピークが出現して, 7 時間後には対照値にもどった (Fig. 5)。ところが副腎摘出マウスでは, 投与後 2 時間でピークがみられ, それ以後徐々に減少して, 7 時間後に対照値以下になり, 11 時間後に対照値にもどった。次に無処置マウスの 2 つのピークが, ethionine 投与によって阻害されるか否かを検討した。Table 3 に示すように, 30 分後の活性値では阻害がわずしかみられないが, 5 時間後のものでは約 30% の

Table 3. Inhibition of adaptive formation of tryptophan oxygenase in intact mice by ethionine

Hours after injection	Tryptophan oxygenase activity (μM kynurenine/g/h)		Per cent inhibition of adaptation
	Treatment		
	Tryptophan (500 mg/kg body wt.)	Tryptophan (500 mg/kg body wt.) and Ethionine (40 mg/kg body wt.)	
0.5	7.26 ± 0.62	7.00 ± 0.93	3.6
5	3.05 ± 0.56	2.14 ± 0.20*	29.8

Results represent the mean ± standard deviation of ten or more animals.

*Significantly different from mouse liver given tryptophan alone ($P < 0.001$)

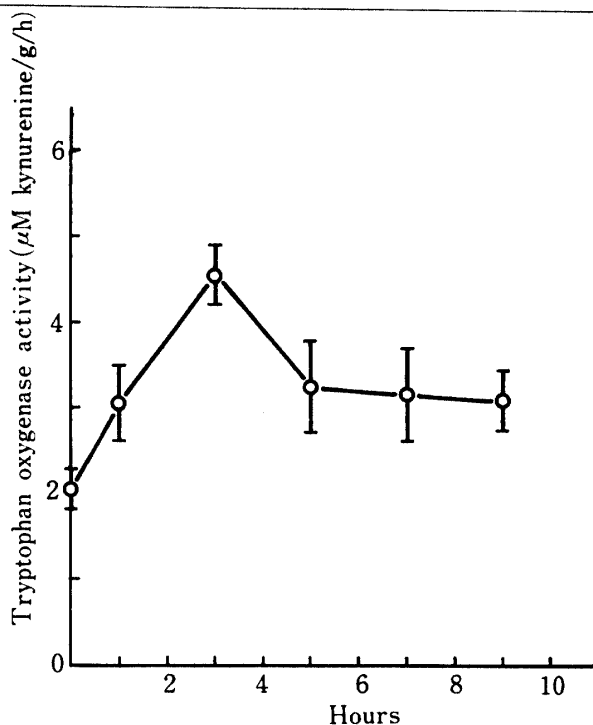


Fig. 6. Time course of tryptophan oxygenase activity in intact mice injected with hydrocortisone (20 mg/kg body wt.) Vertical bars represent the standard deviation.

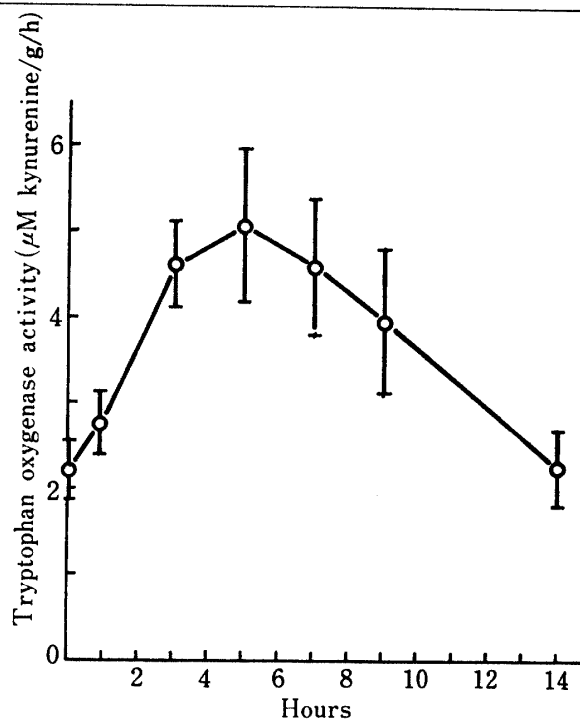


Fig. 7. Time course of tryptophan oxygenase activity in adrenalectomized mice injected with hydrocortisone (20 mg/kg body wt.) 3 or 4 days after the operation. Vertical bars represent the standard deviation.

阻害が認められた。この値は ethionine を投与しない対照値 (Try のみ投与) とは有意の差が認められるが、マウス肝正常値 (Table 2 の 2.11 ± 0.46) とでは有意の差は認められない。

(3) hydrocortisone による誘導

マウス肝 TO はラットに比べて正常活性値がやや低いこと、ガービル肝 TO は hydrocortisone によって誘導されないという観察¹⁵⁾があることなどから、マウス肝 TO の hydrocortisone による誘導の程度を調べた。

Fig. 6 に示すように、無処置マウスでは hydrocortisone acetate 20 mg/kg 投与後 3 時間で、投与前の約 2.3 倍のピークがみられ、その後減少するが、9 時間までは約 1.6 倍程度の活性値で推移した。副腎摘出マウスでは、無処置マウスの場合と同程度のピークが 5 時間後に現われ、その後徐々に減少して、14 時間後に投与前の値にもどった (Fig. 7)。

hydrocortisone 投与 5 時間後の活性値を、無処置ならびに副腎摘出マウスとラットで比較した結果は Table 4 のとおりで、hydrocortisone 処置による TO 活性増加の割合は、ラットのほうがマウスに比べて著

Table 4. Tryptophan oxygenase activity 5 hours after injection of hydrocortisone (20 mg/kg body wt.) in intact or adrenalectomized mice and rats

Animal	Treatment	Tryptophan oxygenase activity (μM kynurenine/g/h)		Per cent increase
		Control	Hydrocortisone injection	
Mouse	Intact	2.04 ± 0.28	$3.22 \pm 0.55^*$	158
	Adrenalectomized	2.24 ± 0.36	$4.91 \pm 0.86^*$	187
Rat	Intact	2.13 ± 0.18	$7.17 \pm 0.84^*$	337
	Adrenalectomized	1.77 ± 0.13	$9.14 \pm 0.40^*$	516

Hydrocortisone was injected 3 or 4 days after the operation. Results represent the mean \pm standard deviation of ten or more animals. *Significantly different from the control ($P < 0.001$)

Table 5. The effect of immobilization on mouse liver tryptophan oxygenase

Treatment	Tryptophan oxygenase activity (μM kynurenine/g/h)	Per cent increase
Intact	2.04 \pm 0.28	
Immobilized	5.29 \pm 0.48*	259

Results represent the mean \pm standard deviation of ten or more animals.

*Significantly different from intact animals ($P < 0.001$)

しく大であった。また副腎摘出によって、マウスの TO 活性は減少しないが、ラットのそれは有意の減少を示した。したがってマウスはラットに比べて副腎皮質の反応性が鈍いことが予想されるので、副腎を介したストレス作用による酵素誘導の指標の1つとして、

固定による TO 活性の変動を検討した。固定は直径 2.5cm の金網製の円筒に入れて行い、5時間後の TO 活性を測定した。Table 5 に示すように約 2.6 倍の増加がみられ、Curzon and Green⁹⁾ のラットにおける結果に比べて、やや低い増加率であった。

(4) 5-HT, histamine, histidine による誘導

Try の代謝経路の1つである 5-HT, 類似の炎症関連物質である histamine, その前駆体の histidine による TO 誘導を検討した。Table 6 に示すように、5-HT と histamine 投与 5 時間後の TO 活性は、正常値と有意の差はみられなかったが、histidine 投与後の活性は、有意の増加を示し、これは副腎摘出マウスでも同様であった。ただ正常マウスでは、副腎摘出によって TO 活性はむしろ高い値を示すが、histidine 投与の

Table 6. Effects of 5-hydroxytryptamine, histamine and L-histidine on liver tryptophan oxygenase activity in intact or adrenalectomized mice

Treatment	Tryptophan oxygenase activity (μM kynurenine/g/h)			
	Control	5-HT	Histamine	L-Histidine
Intact	2.04 \pm 0.28	2.13 \pm 0.34	1.97 \pm 0.26	3.08 \pm 0.61* ¹
Adrenalectomized	2.24 \pm 0.36	—	—	2.81 \pm 0.38* ²

The activities are the mean \pm standard deviation of ten or more animals.

*¹Significantly different from the control ($P < 0.001$)

*²Significantly different from the control ($P < 0.01$)

場合は副腎摘出マウスのほうがやや低い値を示した。

しかしどちらも有意の増減ではなかった。

4. マウスならびにラット肝の各細胞分画における TO 活性

結果は Table 7 のとおりで、ラット、マウスとも酵素の存在部位は cell sap で、Mt, Ms 画分には存在していない。しかしラットの場合 cell sap 中の活性は homogenate 中のそれと比べて非常に小さいが、マウスでは homogenate と同程度の活性が認められた。ラットでは homogenate 中にホロ酵素とアポ酵素は同じ位存在するが、マウスではアポ酵素が極端に少なく、これが cell sap になるとアポ酵素の割合が増加しており、ホロ酵素とアポ酵素の比率は 1/7 程度に減少していた。cell sap に Mt 画分を加えても、影響のみられないことはラットと同様であるが、Ms 画分を加えると、homogenate の酵素活性からみてラットより著しい酵素活性の増加がみられた。しかもマウスの場合、加える Ms 画分の 1~4 eq. によって活性の差はほとんどみられないが、ラットでは Ms 画分 1~3 eq. の添加によって活性は徐々に増加し、4 eq. の添加では

3 eq. 添加の場合と大体同じ活性値であった。さらに cell sap+Ms 画分では、homogenate と比べてアポ酵素の割合が低下している。また Mt 画分まで遠沈した上清 (cell sap+Ms 画分) の活性が、cell sap まで分画して後から Ms 画分を加えた場合と同じであるか否かを調べたが、Table 8 のとおりで活性値に差は認められなかった。

5. アポ酵素と hemtalin の結合に影響する物質の検討

(1) 肝 protoporphyrin 量

マウスは 8 匹をプールしたものを、ラットは 2 匹をプールしたものを、それぞれ 5 例について測定したが、マウスで 0.49 $\mu\text{g/g}$ 、ラットで 0.25 $\mu\text{g/g}$ で、マウス肝はラット肝の約 2 倍の protoporphyrin を含んでいた。

(2) in vitro における globin の TO に及ぼす影響

反応液中に globin を添加すると、ラットでは homogenate, cell sap の両方とも、0.042, 0.104 mg/ml の globin 濃度で、TO に対する阻害作用が認められるが、マウスでは 0.104 mg/ml 濃度においてのみ阻害がみられた (Fig. 8,9)。しかもラットに比べて阻害作用

Table 7. Subcellular distribution of mouse and rat liver tryptophan oxygenase activity

	Mouse		Rat			
	Tryptophan oxygenase activity (μM kynurenine/g/h)		Holo/apo ratio	Tryptophan oxygenase activity (μM kynurenine/g/h)		Holo/apo ratio
	Holo enzyme	Total enzyme		Holo enzyme	Total enzyme	
Whole homogenate	1.81	1.93	15.01	2.05	3.90	1.11
Cell sap	1.74	2.39	2.68	0.62	1.76	0.54
Mitochondria, 4 eq.	0	0	—	0	0	—
Microsomes, 4 eq.	0	0	—	0	0	—
Cell sap and mitochondria, 1 eq.	1.75	2.18	4.07	0.60	1.77	0.51
Cell sap and microsomes, 1 eq.	3.87	3.97	38.70	2.94	3.89	3.09
Cell sap and microsomes, 2 eq.	3.97	4.20	17.26	3.38	4.51	2.99
Cell sap and microsomes, 3 eq.	3.90	4.21	12.58	3.71	4.56	4.36
Cell sap and microsomes, 4 eq.	4.05	4.14	45.00	3.78	4.29	7.41

The preparations used were obtained from a pool of 40 normal mouse livers or 8 rat ones. One equivalent is the amount of particles isolated from 1.0 ml of liver homogenate. The enzyme activity was determined in either the absence (holo enzyme activity) or the presence (total enzyme activity) of added hemin ($2\mu\text{M}$). The apo enzyme was calculated by difference.

Table 8. Mouse liver tryptophan oxygenase activity in cell sap after the addition of microsomal fraction and $12,000 \times g$ supernatant fraction

	Tryptophan oxygenase activity (μM kynurenine/g/h)		Holo/apo ratio
	Holo enzyme	Total enzyme	
Cell sap	1.48	1.86	3.89
Cell sap and microsomes, 1 eq.	4.48	4.81	13.58
$12,000 \times g$ Supernatant fraction	4.30	4.66	11.94

Notes are the same as in Table 7.

が弱く、阻害されるかもしれないが、ラット肝 TO ほどではないといえる。したがって内因性 hematin によるアポ酵素のホロ酵素化の globin による阻害が、マウスよりラットのほうが大きいことが考えられるが、これに外因性の hematin が加わった場合の globin の阻害作用の回復の程度を両動物で比較した。hemin の添加によりラット (Fig. 10)、マウス (Fig. 11) とも、homogenate, cell sap の両方で globin 阻害作用の回復が認められる。しかしこの hemin の効果は、マウスではラットほど強くなかった。両者とも hemin 濃度 0.5 mM から値の逆転がみられ、またラットでは homogenate より cell sap での効果が強いが、マウスの場合は同程度であった。

6. in vitro における purine 誘導体の TO 活性に及ぼす影響ならびに肝 XO 活性

purine 誘導体のうち、すぐ入手することができた adenosine, AMP について in vitro でマウス, ラット肝 cell sap の TO に及ぼす影響を調べた。結果は

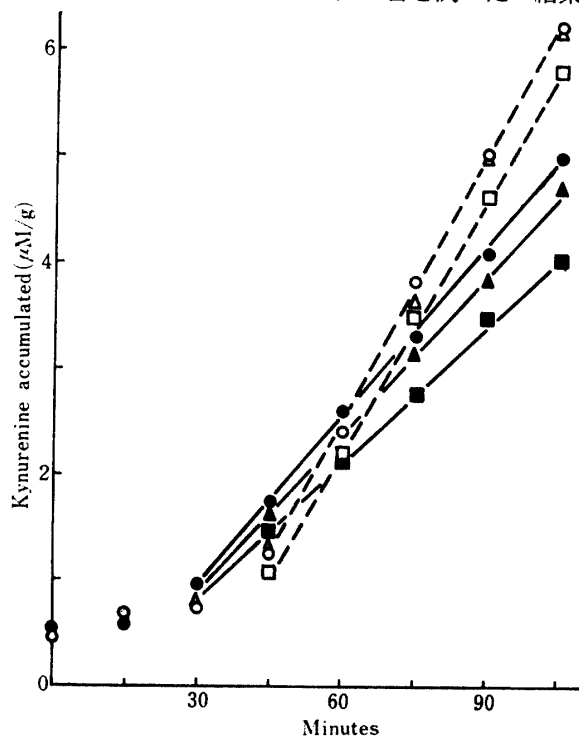


Fig. 8. Inhibitory effects of globin on tryptophan oxygenase in rat and mouse liver homogenates. Tryptophan oxygenase activity was determined in the absence (rat, ●—●; mouse, ○---○) and presence of 0.042 mg/ml (rat, ▲—▲; mouse, △---△) or 0.104 mg/ml (rat, ■—■; mouse, □---□) of globin.

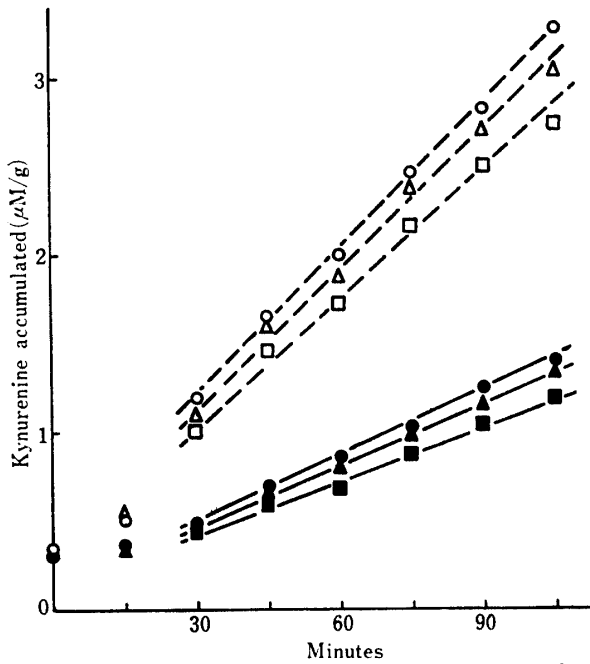


Fig. 9. Inhibitory effects of globin on tryptophan oxygenase in rat and mouse liver cell saps. Tryptophan oxygenase activity was determined in the absence (rat, ●—●; mouse, ○—○) and presence of 0.042 mg/ml (rat, ▲—▲; mouse, △---△) or 0.104 mg/ml (rat, ■—■; mouse, □---□) of globin

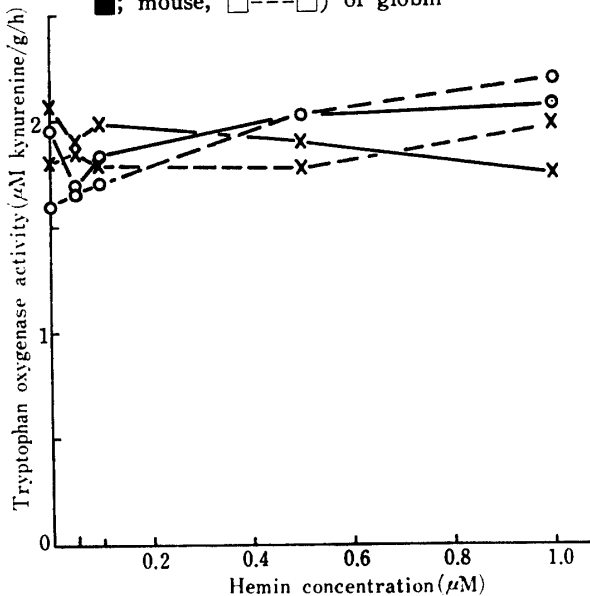


Fig. 11. Inhibition of mouse liver homogenate and cell cap tryptophan oxygenase by globin and its reversal by hemin.

Tryptophan oxygenase was determined in various hemin concentrations in the absence (homogenate, x—x; cell sap, x--x) and presence (homogenate, ○—○; cell sap, ○--○) of 0.1 mg/ml of globin.

Table 9 のとおりで、両 purine 誘導体によってマウス、ラットとも増加がみられるが、マウスのほうが増

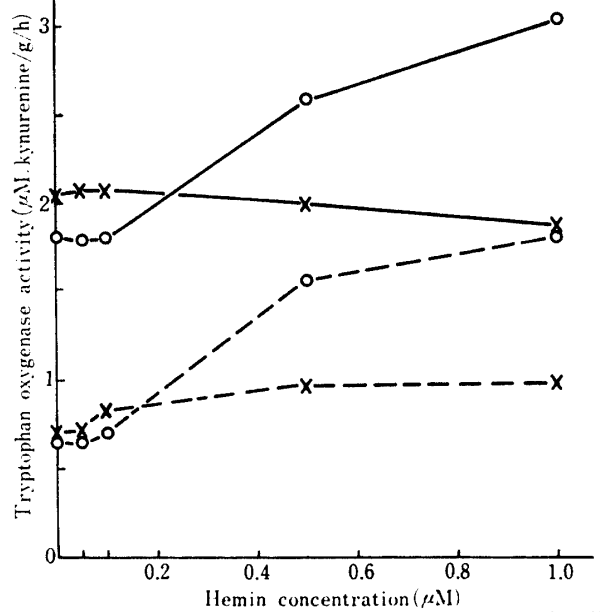


Fig. 10. Inhibition of rat liver homogenate and cell sap tryptophan oxygenase by globin and its reversal by hemin.

Tryptophan oxygenase was determined in various hemin concentrations in the absence (homogenate, x—x; cell sap, x--x) and presence (homogenate, ○—○; cell sap, ○--○) of 0.1 mg/ml of globin.

加が大きく、Chytil⁹⁾ が hydrocortisone 処置ラット肝上清で観察している増加と大体同程度であった。またアポ酵素の割合は、マウスでは増加しているが、ラットでは逆にやや減少した。

肝 XO 活性は雄ではラット 11.20 ± 1.64 、マウス $8.24 \pm 1.24 \mu\text{M/g/h}$ で両者に有意の差を認めた ($P < 0.025$) が、試みに雌についても測定したところ、ラット 7.74 ± 0.58 、マウス $8.48 \pm 0.50 \mu\text{M/g/h}$ で、両者に差を認めなかった。

7. in vitro における XO とその阻害剤 allopurinol の TO に及ぼす影響

Table 10 に示すように、XO の添加によってマウス、ラットともに活性増加がみられなかった。すなわち 4.194×10^{-4} 単位以下の添加では影響がなく、それ以上ではやや阻害が認められた。

allopurinol の添加によって、マウスでは活性増加が認められた。ラットでは約半分に減少し、Chytil⁹⁾ の観察と同程度の減少を示した (Table 11)。

考 察

多くの研究者によって行われている Knox の方法²³⁾ を用いて、マウス肝 TO 活性を測定したところ、ラットでは酵素量に比例した kynurenine 生成がみられる

Table 9. Effects of adenosine and AMP on tryptophan oxygenase activity in mouse and rat cell saps

Compound added	Mouse			Rat		
	Tryptophan oxygenase activity (μM kynurenine/g/h)		Holo/apo ratio	Tryptophan oxygenase activity (μM kynurenine/g/h)		Holo/apo ratio
	Holo enzyme (per cent activity)	Total enzyme (per cent activity)		Holo enzyme (per cent activity)	Total enzyme (per cent activity)	
None	1.96 (100)	2.12 (100)	12.25	0.69 (100)	1.82 (100)	0.61
Adenosine	4.32 (220)	4.83 (228)	8.47	1.27 (184)	2.68 (147)	0.90
AMP	3.35 (171)	3.92 (185)	5.88	1.07 (155)	2.31 (127)	0.86

The preparation used was obtained from a pool of 16 normal mouse livers or 4 rat livers.

Table 10. The effect of xanthine oxidase on tryptophan oxygenase activity in mouse and rat cell saps

Xanthine oxidase added (Units)	Tryptophan oxygenase activity (μM kynurenine/g/h)	
	Mouse	Rat
0	1.92	0.74
2.097×10^{-4}	1.92	0.76
2.796×10^{-4}	1.87	0.72
4.194×10^{-4}	1.91	0.72
2.097×10^{-3}	1.83	0.69
2.097×10^{-2}	1.79	0.61

The note is the same as in Table 9.

のに、マウスではそれが全くみられず、基質濃度過剰による酵素阻害が出現することが見いだされた。このことと、マウス肝 TO が hematin 添加によって活性上昇を示さないことが、本研究を実施する端緒となったが、Km 値を検討したところ、 $1.5 \times 10^{-4} \text{M}$ であり、同じ測定条件におけるラット肝 TO の場合の 4×10^{-4}

M²³⁾ より、マウスにおいては明らかに低いことがわかった。したがって Knox²³⁾ のラット肝 TO 測定における基質濃度 $2.25 \times 10^{-3} \text{M}$ を、そのままマウス肝に適用することは適当でないと考え、最大活性値を示す基質濃度 $0.5 \times 10^{-3} \text{M}$ における酵素活性と反応時間との関係を、結果の 1 の(3)で述べた理由で $2 \times 10^{-3} \text{M}$ 濃度の場合と比較したところ、 $0.5 \times 10^{-3} \text{M}$ では直線性が得られず、 $2 \times 10^{-3} \text{M}$ では30分から120分にわたって良好な直線性が得られた。この基質濃度では60分保温後の活性値は、 $0.5 \times 10^{-3} \text{M}$ の場合とほとんど同じであり、最大活性値もその約93%程度で、あまり差がないことから、マウス肝 TO 活性測定の基質濃度を $2 \times 10^{-3} \text{M}$ とした。この濃度では homogenate 1.0ml と 2.0 ml とで測定した場合も、大体同じ測定値が得られる。

ラット肝 TO が hem 酵素であることは広く知られており^{11,12,16,21,28)}、反応液に hematin を添加することにより、反応液中のアポ酵素が hematin と結合してホロ酵素となるため、添加しないときのホロ酵素活

Table 11. The effect of allopurinol on tryptophan oxygenase activity in mouse and rat cell saps

Compound added	Mouse			Rat		
	Tryptophan oxygenase activity (μM kynurenine/g/h)		Holo/apo ratio	Tryptophan oxygenase activity (μM kynurenine/g/h)		Holo/apo ratio
	Holo enzyme (per cent activity)	Total enzyme (per cent activity)		Holo enzyme (per cent activity)	Total enzyme (per cent activity)	
None	1.96 (100)	2.12 (100)	12.25	0.69 (100)	1.82 (100)	0.61
Allopurinol	2.72 (139)	3.35 (158)	4.32	0.41 (59)	0.93 (51)	0.79

The note is the same as in Table 9.

性に比べて相当の活性増加を示す。両者の差がアポ酵素であり、正常ラットの場合、動物の状態、測定条件によって異なるが、0.9~1.8程度のホロ/アポの比率が認められている^{3,25,32)}。本研究でも正常ラットでは1.51という値が得られたが、正常マウスではホロ活性と総活性は、それぞれ2.11と2.08であり、hemin添加による活性の上昇は全く認められない。ラット肝TOでは、porphyrinの前駆体であるdeltaaminolevulinic acid (ALA) や、二次的にALA合成酵素を誘導することによってhem生産を増加せしめることが知られているallylisopropyl acetamide¹⁰⁾、その他 porphyrin とみなされる3,5-dioxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine、抗真菌物質の griseofulvin⁹⁾ 投与によって、ホロ酵素活性の増加と、それ以上の総酵素活性の増加が観察されているが、本実験で直接heminを投与した場合、ラットでは、1時間後に対照値の2倍近いホロ酵素が、2時間後には3倍以上のホロ酵素が観察されたが、総酵素活性の増加はそれほどでなく、2時間後にはホロ活性よりむしろ減少しており、外因性heminがアポ酵素を相当ホロ酵素化することが予想される。しかしマウスではある程度の増加は示すが、この増加は生理食塩液を投与した場合の増加と同程度であり、外因性heminがアポ酵素をホロ酵素化するとは考えられず、生理食塩液投与の場合も5時間後には正常値にもどっている。この増加はむしろストレス性のものと考えたい。in vivo, in vitroでのheminの効果が認められないことから、マウスTOがhematinをcofactorとしないのではないかという疑問が生ずる。ラット肝TOにおける基質と酵素間の反応初期における不応期が、Try投与でもheminの反応液への添加によっても消失する¹⁷⁾のに、マウスの場合Try投与では消失するが、無処置肝homogenateへのhemin添加では影響がみられないことは、一層この感を深くするが、この点については後に否定的考察を加える。

マウス肝TOの基質による誘導は、Tryの腹腔内注射5時間後で、投与Try量に比例する結果が得られたが、この結果はKnoxの方法をそのまま用い、投与4時間後のマウスで測定しているBerry and Smythe⁹⁾の結果と大体一致している。しかしラットの場合は、研究者によって必ずしも一致しておらず、Schor and Frieden³³⁾はTOの誘導が投与量と直線関係になく、少量のほうが大量より効果的であることを示しており、Lee²⁹⁾は酵素の形成率はTry量に関係なかったが、最大の酵素レベルとそれが得られる時間

は、いずれも投与Try量に直線的に関係することを観察している。またマウスにおける基質誘導は、Knox²²⁾に代表されるラットのそれと比べて著しく弱く、Try 1 g/kgの大量投与でも約2倍の誘導しかみられない。さらにTry 500 mg/kg投与によるタイムコースは、ラットでは投与5時間で約8倍に活性増加がみられ、10時間後に正常値にもどっている⁷⁾。しかしマウスでは30分と5時間にピークが現われる二相性の変化を示しており、30分のピークは正常値の3.5倍程度であるが、5時間のそれは1.5倍程度にすぎない。副腎摘出後ではピークは一つとなり、しかもTry投与2時間でみられている。したがって時間のズレはあるけれども、正常マウスのいずれかのピークはストレス性のものであることが予想される。ラット肝TOの基質による誘導が、ethionine投与により阻止されることがLee and Williams³⁰⁾により見いだされているので、ethionine投与の影響を調べたところ、大きく障害を受けるのは5時間の活性値のみで、30分後のピークはほとんど影響を受けていない。この点では5時間後のわずかなピークが、副腎摘出マウスの2時間後にみられるピークに相当するものと思われ、30分後のピークは副腎摘出によって消失するものと考えたい。またCiven and Knox⁷⁾の観察では、TOの基質誘導は血中Try濃度の動きより相当遅れており、この点からも本実験の30分のピークが基質誘導によるものとは考えにくい。ただストレス性のものとする、後述のようにマウスはラットに比べて副腎皮質の反応性が鈍いと思われること、また生理食塩液投与後の活性値に比べて非常に高い活性値であることなどの問題が残る。また副腎摘出マウスではピークが無処置マウスの5時間に比べて早くなること、活性値が非常に大きいことなども疑問であるが、副腎摘出による生体内ホルモンの不均衡、副腎摘出により不活性化ホロ酵素を活性化する何らかの要因が加わること、さらに投与後7時間で正常以下に活性値が低下するのは、生体内ホルモンの不均衡の結果生じる代償性の作用ではないかということなどが考えられるが、いずれにしろこれらの点は今後の追求課題といえよう。

hydrocortisone 20 mg/kgの投与によるマウス肝TO活性のタイムコースは、ラットの場合⁷⁾と同様、投与後3時間にピークがみられるが、ラットの3.5~4倍位の活性増加に比べて、2.3倍程度であり、基質誘導の場合ほどではないが、ラットに比べて誘導が小さい。副腎摘出マウスでは、活性値は無処置の場合と同程度であるが、そのピークが2時間遅れて5時間後に出現

し、7~9 時間の値も無処置のものより高く、14時間後には正常値にもどっている。無処置の場合の正常値にもどる時間はみていないが、一般的に副腎摘出によって、活性上昇の形式も回復の形式も、無処置の場合より鈍い感じを与える。したがってマウスでも副腎皮質が TO 活性に役割を演じていることは確かであるが、Table 4 に示されるように、マウスではラットに比べて副腎皮質ステロイドによる誘導能が低いことも確かである。すなわちラットより副腎皮質の反応が鈍いと考えられる。固定によるストレスによっても、ラット⁸⁾ほど増加がみられないこともその裏付けの一つである。さらに炎症関連物質である histamine によっても、Knox²²⁾ と異なり活性増加がみられないし、薬理作用的に類似物質である 5-HT (in vitro ではラット肝 TO に強い阻害作用をもつといわれる¹³⁾) によっても、活性増加が認められなかった。ラットにおける histamine などの活性増加作用も、非特異的なストレス作用と考えられており、この点もマウスの副腎皮質の反応性の鈍さを証明するものであろう。ただ同じストレス作用によってラット肝 TO 活性を増加せしめることが知られている histidine の場合のみ、マウス肝 TO 活性を増加せしめたが、副腎摘出マウスでも、Knox²²⁾ と異なり有意の増加を示しているの、histidine はマウス肝 TO に対して何らかの特異的 direct 作用ないし基質に類似した作用を示すのではないかとと思われる。

副腎摘出によって TO レベルが低下することは、ラットでは Knox and Auerbach²⁴⁾、Schor and Frieden³³⁾ らが、マウスでは Berry and Smythe⁴⁾ が認めているが、本実験では低下が認められず、有意の差こそみられないが増加の傾向さえ認められることは、マウスにおける副腎皮質の反応性の鈍さとともに、ラットでいわれているのと異なり、副腎皮質ホルモンが必ずしも TO レベルの維持に必要ではないのかもしれないが、マウスの場合 40% 前後存在するといわれている副副腎の存在も考えられるので、断定はできない。なお Berry and Smythe⁴⁾ との違いは測定条件の違いが影響しているかもしれない。

各細胞分画の TO 活性では、Mt, Ms 画分に活性が存在しないことはラットの場合と同様であり、これは Feigelson and Greengard¹¹⁾ のラットでの観察と一致している。ただ cell sap の酵素活性が、ラットでは homogenate のそれと比べて約 1/3 に低下しているのに、マウスでは homogenate と同程度の活性が cell sap にもみられ、cell sap に Mt 画分添加では全く変化がないが、Ms 画分を添加すると、その量に関係な

く homogenate のもつ活性の 2 倍以上の活性を示している。ラットでは、cell sap に Mt 画分を加えた場合に変化がないことはマウスと同様であるが、Ms 画分の添加により、その量が多いほど活性値が上昇する傾向を示している。Feigelson and Greengard¹¹⁾ は、ラット肝の homogenate, cell sap, cell sap+Mt 1 eq., cell sap+Ms 1 eq., cell sap+Ms 2 eq., cell sap+Ms 3 eq., cell sap+Ms 4 eq. で、それぞれ 4.6, 1.6, 2.4, 3.2, 5.0, 5.4, 5.9 という活性値を示しており、cell sap+Mt 1 eq. で 1.5 倍の活性上昇がみられる点を除いては、大体本実験の結果と同様と思われる。マウスの場合も cell sap に Ms 画分を加えることにより、活性は著しい上昇を示すから、Ms 画分に賦活物質が存在することは確かであると思われる。それがラットと同様 metalloporphyrin の系統とすると homogenate ならびに cell sap+Ms 画分では、hemin 添加による活性の上昇がみられないのに、cell sap ではある程度の上昇が認められるから、Ms 画分に hematin とアポ酵素との結合を妨げる物質が存在することを予想せしめる。また cell sap に Mt 画分を加えても、hemin 添加による活性の上昇が Ms 画分ほどではないにしてもおさえられるから、マウス肝では Ms 画分に賦活物質が存在すると同時に、それとアポ酵素との結合を妨げる物質が顆粒成分に存在するものと考えられる。

hematin とアポ酵素との結合を妨げる物質としては、アポ酵素蛋白と hematin との結合中心を競合する protoporphyrin, globin, albumin などが知られている^{11,12)}。その一つとしてマウス肝はラットに比べて protoporphyrin が非常に多いのではないかと予想して測定したところ、ラットの倍量含むことが認められた。したがって protoporphyrin がラットより以上に、hematin とアポ酵素の結合を妨げていることは考えられる。globin, albumin については特に検討しなかったが、血中の hemoglobin 量はラットで 14.7 g/dl²⁰⁾、マウスで 14.0 g/dl¹³⁾ という観察があり、マウス肝では脱 hem が著しく、globin がラット肝に比べて相当多いということも考えられない。

globin の TO 阻害効果を in vitro で比較した結果では、ラットでは明らかに阻害が認められるが、マウスではやや認められるけれども、ラットほどではなく、またこの阻害効果が、ラットでは hemin 濃度が多くなると速かに減少するが、マウスではラットほど減少しなかった。これらの結果は、globin の活性阻害効果や hemin によるその回復効果が、マウス肝はラット肝より劣ることを示すものであるが、前述のようにマ

ウス肝 Ms 画分に強力な TO 賦活作用のあることも確かであり、またアポ酵素と hematin との結合を妨げる protoporphyrin の多いことも確かであるけれどもマウス肝では Ms 画分の賦活物質が hematin でなく、他の物質であるということよりも、ラット肝に比べてアポ酵素が非常に少ないと考えるほうが妥当であろう。

アポ酵素が少ないとすると、いわゆる不活性なホロ酵素（あるいは潜在型 TO）が多いのではないかと考えられる。ラット肝 TO が cyclic-AMP によって影響を受ける酵素であることは、Chytil and Skrivanova⁶⁾, Gray¹⁴⁾, Knox ら²⁷⁾によって認められ、cyclic-nucleotide の効果は、不活性なホロ酵素を活性化型に変えることであると考えられた。その後 Chytil⁵⁾はより詳細な研究を行い、cyclic-AMP のみならず、AMP, IMP, adenosine など種々の purine 誘導体によって、ラット肝 TO の活性が上昇することを認め、この活性には XO によって作られる hypoxanthine の存在が必要であること、XO の阻害剤である allopurinol はこの活性化をブロックすること、purine 誘導体の効果が hematin の効果とは関係がないことなどを認めて、潜在型 TO は hematin 添加を必要とするアポ酵素とは異なることを示唆し、また catalase が hypoxanthine による TO 活性化を低下せしめることから、XO による purine 誘導体の活性化効果に H₂O₂ が参画する可能性を示唆している。さらに purine 誘導体と hemoglobin を同時に加えると、TO 活性が強まることをみて、潜在型 TO がまずアポ酵素になり (XO によって生成される H₂O₂ による) として、その補欠分子族を受け入れる可能性を示唆した。その後さらに allopurinol による阻害実験で¹⁹⁾, XO をその抗体で除去すると、purine 誘導体による不活性なホロ酵素の活性化がなくなること、purine 誘導体による活性化が hemoglobin の添加に依存しないことなどから、XO は不活性なホロ TO の内因性活性化物質であるとしている。Knox and Piras²⁶⁾ は基質の有無によって、活性ホロ酵素（還元型）と不活性ホロ酵素（酸化型）の可逆的变化があるとし、後者は基質、methemoglobin, ascorbate によって前者に活性化されるとしている。XO との関係についてはふれていないので、彼らのいう不活性なホロ酵素と Chytil ら^{5,18,19)}のいう不活性なホロ酵素（あるいは潜在型 TO）が同一のものであるかどうかは、はつきりしないけれども、一応 adenosine と AMP を添加した場合の活性は、マウス、ラットともに増加がみられ、マウスのほうが増

加率が高く、両方ともアポ酵素の比率に変化がみられる。このことは、マウス肝ではアポ酵素が少なく、不活性なホロ酵素（あるいは潜在型 TO）が多い証拠の一つと考えられる。またマウスでアポ酵素の割合が増加することは、Chytil⁵⁾のいう潜在型 TO のアポ酵素化が示唆されるが、ラットでは逆にやや減少しており、いささか疑問である。

XO が不活性なホロ酵素を活性化する要因¹⁹⁾の一つであれば、マウス肝ではラット肝に比べて XO 活性が低いのではないかと、また in vitro で添加した場合、マウスではラット以上に活性上昇がみられるのではないかと考えたが、XO 活性は雄ではマウスのほうが有意の差で少なかったが、雌では差がなかった。in vitro では XO 添加によって活性増加はみられなかった。雄に関するかぎり、不活性ホロ酵素の多い一うらづけになるが、雌では差がないから断定的なことはいえない。in vitro で予想どおりでなかったことは、添加した XO がバターミルク由来のため、肝に存在する XO とは作用が異なること、また硫酸アンモニウムに溶解してあるので、その影響等が考えられる。allopurinol によっては、ラットで約半分に活性低下がみられるが、マウスでは阻害が認められなかった。Jurian and Chytil¹⁹⁾によると、allopurinol は XO が不活性なホロ酵素を活性化するのを妨げることになるが、Badawy and Evans³⁾ はアポ酵素と hem との結合を妨げることによって TO を阻害するとしており、この点もマウス肝ではアポ酵素が少なく、不活性なホロ酵素の多い一証拠であろう。しかしマウスで、allopurinol が活性増加を示すのは疑問であり、今後追求すべき問題である。なおその後、結果のところではふれなかったが、Knox and Piras²⁶⁾ に準じてマウス肝の ascorbate 添加の場合を試みた（ホロならびに総活性を測定したので、methemoglobin は用いなかった）ところ、ascorbate を添加しない場合、ascorbate 添加で予備保温しない場合、予備保温する場合で、ホロ活性はそれぞれ 2.41 ± 0.42, 4.07 ± 0.36, 5.32 ± 0.40 総活性は 2.59 ± 0.48, 5.19 ± 1.41, 5.86 ± 0.64 という値が得られており、この点からもマウス肝はアポ酵素が少なく、不活性なホロ TO が多いことは間違いないであろう。したがってマウスを実験材料とする場合、不活性なホロ酵素との関連に注意しないと、結論を誤まるおそれがあるものと思われる。

要 約

マウス肝 TO をラット肝 TO と比較検討した結果、

著しく異なる所見が得られた。

1. マウス肝 TO の Km 値はラットのそれと比較して低く、 $0.15 \times 10^{-3} M$ である。
2. マウスにおいては基質誘導、ホルモン誘導ともにラットに比較して弱い。
3. in vitro で hemin を添加することにより、ラットでは活性が上昇するが、マウスでは活性増加がほとんどみられない。また hemin の注射により、ラットではかなり活性が上昇し、アポ酵素のホロ酵素化が認められる。マウスでも活性は上昇するが、生理食塩液を注射した場合の増加活性値と同じであり、アポ酵素がホロ酵素化するというよりも、ストレス性の増加であることを示唆する結果が得られた。
4. 基質と TO との反応初期にみられる不応期は、基質を投与したマウス肝 TO では消失するが、in vitro で homogenate に hemin を添加した場合には、消失が認められない。
5. 基質による TO の誘導はラットでは少量のほうが効率が良いことが観察されているが、マウスでは投与量に比例した活性値が得られた。
6. Try 注射後のタイムコースは、ラットでは5時間後にピークをもつ一過性の変化であるが、マウスでは30分と5時間後にピークをもつ二相性の変化を示し、5時間後のピークは ethionine 投与により約30%阻害されるが、30分後のピークはほとんど阻害されない。また副腎摘出マウスでは、ピークは一つとなり、Try 投与2時間後に認められた。
7. hydrocortisone 注射後、無処置マウスでは投与3時間後に、副腎摘出マウスでは5時間後にピークが認められた。
8. 副腎摘出によりラットでは TO 活性値の低下が認められるが、マウスでは認められなかった。
9. マウスを固定した後5時間の TO 活性値は、約2.6倍に増加した。
10. 炎症関連物質である histamine, 5-HT によって、マウス肝 TO は影響されないが histidine は活性を上昇せしめ、この上昇は副腎摘出マウス肝でも認められた。
11. マウス肝 TO 活性が Mt, Ms 画分に存在しないことはラットと同様であるが、cell sap の活性は、ラットでは homogenate の約 1/3 であるのに対して、マウスではほとんど同程度の活性を示した。
12. cell sap に Mt 画分を加えても活性に影響はないが、Ms 画分を加えることにより活性は著しく上昇する。また cell sap では、hemin 添加により活性の

上昇がある程度認められるが、cell sap に Ms 画分を加えると、homogenate と同様、hemin 添加による活性の上昇は認められなくなった。

13. マウス肝にはラット肝の約倍量の protoporphyrin が存在する。
14. in vitro における globin のマウス肝 TO 阻害作用は、ラットに比べて弱く、globin の阻害作用に対する hemin の回復効果もラットに比べて弱い。
15. マウス、ラット肝の cell sap に AMP, adenosine を添加することにより、活性増加が認められ、その増加率はマウスのほうが大であった。
16. 肝 cell sap への XO の添加は、TO 活性に影響を示さなかった、またマウス肝 XO 活性は、雄ではラットに比べて有意で低かったが、雌では差がなかった。
17. 肝 cell sap への allopurinol の添加により、ラットでは、TO 活性阻害が認められるが、マウスでは逆に活性増加が認められた。

以上の結果から、正常マウス肝はラット肝に比較して、アポ TO が極めて少なく、不活性なホロ TO (あるいは潜在型 TO) の多いことが示唆された。

謝 辞

分離用超遠心機の使用に御便宜をいただいた農産化学工学教室竹田靖史助教授、xanthine oxidase の測定を担当された学生浜保敬志 (現大学院生)、和佐敏君に感謝します。

文 献

- 1) Adams, D.H.: The effect on mouse-liver catalase activity and blood haemoglobin level of a milk diet deficient in iron, copper and manganese. *Biochem. J.*, **54**, 328-336 (1953)
- 2) Agarwal, M.K.: Analysis of the influence of selected neurotropic agents on hepatic metabolism in relation to endotoxigenesis. *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2577-2584 (1974)
- 3) Badawy, A.A.-B. and Evans, M.: The effects of chemical porphyrins and drugs on the activity of rat liver tryptophan pyrrolase. *Biochem. J.*, **136**, 885-892 (1973)
- 4) Berry, L.J. and Smythe, D.S.: Effects of bacterial endotoxins on metabolism VI. The role of tryptophan pyrrolase in response of mice to endotoxin. *J. Exp. Med.*, **118**, 587-603 (1963)
- 5) Chytil, F.: Activation of liver tryptophan oxygenase by adenosine 3',5'-phosphate and by other purine derivatives. *J. Biol. Chem.*, **243**, 893-899 (1968)
- 6) Chytil, F. and Skrivanova, J.: Reactivation of cortisone-induced liver tryptophan pyrrolase by boiled liver cell sap and by cyclic adenosine 3', 5'-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 164-166 (1963)

- 7) Civen, M. and Knox, W.E.: The independence of hydrocortisone and tryptophan inductions of tryptophan pyrrolase. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1787-1790 (1959)
- 8) Curzon, G. and Green, A.R.: Effects of immobilization on rat liver tryptophan pyrrolase and brain 5-hydroxytryptamine metabolism. *Brit. J. Pharmac.*, **37**, 689-697 (1969)
- 9) Dresel, E.I.B. and Falk, J.E.: Studies on the biosynthesis of blood pigments 2. Haem and porphyrin in formation in intact chicken erythrocytes. *Biochem. J.*, **63**, 72-79 (1956)
- 10) Feigelson, P. and Greengard, O.: The activation and induction of tryptophan pyrrolase during experimental porphyria and by amino-triazole. *Biochim Biophys. Acta*, **52**, 509-516 (1961)
- 11) Feigelson, P. and Greengard, O.: A microsomal iron-porphyrin activator of rat liver tryptophan pyrrolase. *J. Biol. Chem.*, **236**, 153-157 (1961)
- 12) Feigelson, P. and Greengard, O.: Regulation of liver tryptophan pyrrolase activity. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1908-1913 (1962)
- 13) Frieden, E., Westmark, G.W. and Schor, J.M.: Inhibition of tryptophan pyrrolase by serotonin, epinephrine, and tryptophan analogues. *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 176-182 (1961)
- 14) Gray, G.D.: Tryptophan pyrrolase activity: Effects of cyclic-AMP, purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides. *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**, 502-504 (1966)
- 15) Green, A.R., Sourkes, T.L. and Young, S.N.: Liver and brain tryptophan metabolism following hydrocortisone administration to rats and gerbils. *Brit. J. Pharmac.*, **53**, 282-292 (1975)
- 16) Greengard, O. and Feigelson, P.: The activation of the inducible enzyme, rat-liver tryptophan pyrrolase. *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 191-192 (1960)
- 17) Greengard, O. and Feigelson, P.: The activation and induction of rat liver tryptophan pyrrolase in vivo by its substrate. *J. Biol. Chem.*, **236**, 158-161 (1961)
- 18) Jurian, J. and Chytil, F.: A two-step metabolism for the regulation of tryptophan pyrrolase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **35**, 734-740 (1969)
- 19) Jurian, J. and Chytil, F.: Participation of xanthine oxidase in the activation of liver tryptophan pyrrolase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 1161-1168 (1970)
- 20) Kaldor, I.: Studies on intermediary iron metabolism 4. Haemoglobin value, serum iron and iron binding capacity in normal and castrated rats. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **32**, 437-440 (1954)
- 21) Kawachi, T.: Studies on liver tryptophan pyrrolase of tumor bearing rats. *Kyushu J. Med. Sci.*, **13**, 285-298 (1962)
- 22) Knox, W.E.: Two mechanisms which increase in vivo the liver tryptophan peroxidase activity: Specific enzyme adaptation and stimulation of the pituitary-adrenal system. *Brit. J. Exp. Path.*, **32**, 462-469 (1951)
- 23) Knox, W.E.: Tryptophan oxidation. In Colovic, S.P. and Kaplan, N.O. (eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 2, p. 242-244, Academic Press, N.Y. (1955)
- 24) Knox, W.E. and Auerbach, U.H.: The hormonal control of tryptophan peroxidase in the rat. *J. Biol. Chem.*, **214**, 307-313 (1955)
- 25) Knox, W.E. and Ogata, M.: Effects of peroxide, catalase, and hematin in the assay of liver tryptophan pyrrolase. *J. Biol. Chem.*, **240**, 2216-2221 (1965)
- 26) Knox, W.E. and Piras, M.M.: A reinterpretation of the stabilization of tryptophan pyrrolase by its substrate. *J. Biol. Chem.*, **241**, 764-767 (1966)
- 27) Knox, W.E., Piras, M.M. and Tokuyama, K.: Tryptophan pyrrolase of liver I. Activation and assay in soluble extracts of rat liver. *J. Biol. Chem.*, **241**, 297-303 (1966)
- 28) Knox, W.E. and Tanaka, T.: The mechanism of tryptophan oxidation to formylkynurenine. *Med. J. Osaka Univ.*, **8**, 15-23 (1958)
- 29) Lee, N.D.: The induced increase in the tryptophan peroxidase-oxidase activity of rat liver: Time studies. *J. Biol. Chem.*, **219**, 211-220 (1956)
- 30) Lee, N.D. and Williams, R.H.: Inhibition of adative formation of tryptophan peroxidase in rats by ethionine. *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 698 (1952)
- 31) Litwack, G., Bothwell, J.W., Williams, J.N. JSC. and Elvehjem, C.A.: A colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.*, **200**, 303-310 (1953)
- 32) Sardesai, V.M. and Provido, H.S.: The effect of ethyl alcohol on rat liver tryptophan oxygenase. *Life Sci.*, **11**, Part II, 1023-1028 (1972)
- 33) Schor, J.M. and Frieden, E.: Induction of tryptophan peroxidase of rat liver by insulin and alloxan. *J. Biol. Chem.*, **233**, 612-618 (1958)
- 34) Wood, S. Jr., Rivlin, R.S. and Knox, W.E.: Biphasic changes of tryptophan peroxidase level in tumor-bearing mice and in mice subjected to growth hormone and stress. *Cancer, Res.*, **16**, 1053-1058 (1956)

Summary

By comparing liver tryptophan oxygenase in normal mice with that in rats, remarkably different findings were obtained. The results are summarized as follows.

1. The Km of mouse liver tryptophan oxygenase is $0.15 \times 10^{-3} M$ in the assay described, which is lower, in comparison, than that in rat as shown by Knox²³⁾.
2. Both the substrate and the hormone-induced enzyme increases are smaller in mice than those in rats.
3. The incubation with hemin elevates the enzyme activity in the rat liver homogenate, but this does not happen in the case of mouse. Furthermore, although significant increases of the activity showing a conversion of apoenzyme into holoenzyme were obtained in rats after hemin injection, only slight increases almost the same as those after saline and suggesting rises by stress rather than by conversion of apoenzyme into holoenzyme, were

observed in mice after hemin injection.

4. A lag phase observable in normal rats at the beginning of the reaction between tryptophan oxygenase and its substrate was not to be found in liver-homogenate of mice treated with tryptophan, but was to be found when normal mouse liver homogenate was incubated with hemin.

5. Although it was observed by Shor and Frieden³³⁾ that in rats the induction of the enzyme by tryptophan was not a linear function of dosage injected, and that small doses were more efficient than large ones, in mice it was ascertained to be proportional to the amount of injected dosage.

6. Although it was found by Civen and Knox⁷⁾ that in rats the tryptophan oxygenase level showed an increase showing a peak at 5 hours after tryptophan injection, in mice the level showed a biphasic increase showing two peaks 30 minutes and 5 hours after injection. By ethionine injection the peak appearing 5 hours after injection was inhibited by about 30 percent, but at the one appearing 30 minutes after, almost no inhibition was noted. In adrenalectomized mice the peak was reduced into one, which was reached 2 hours after tryptophan injection.

7. The peak of activity observable after hydrocortisone injection was reached 3 hours after injection in intact mice, and 5 hours after in adrenalectomized ones.

8. Adrenalectomy caused a lowering of tryptophan oxygenase activity in rats, but this did not happen in mice.

9. After immobilization mouse liver tryptophan oxygenase activity increased approximately 2.6-fold.

10. Although histamine and 5-HT related to inflammation had no effect on mouse liver tryptophan oxygenase, histidine raised the activity. This rise was found in adrenalectomized mice, too.

11. In the mouse liver no tryptophan oxygenase activity was found in mitochondria and microsomal fractions as in case of the rat. However, concerning the activity in cell sap, in rats it was approximately one third of that in the homogenate, but in mice it was almost the same as that in the homogenate.

12. Although the resuspension of mitochondria showed no effect on the activity of cell sap, the resuspension of microsomes considerably stimulated the activity. The activity in cell sap was increased in some degrees by the addition of hemin *in vitro*, but this increase by hemin was made to be unobservable when microsomes were resuspended, as it was unobservable in the homogenate.

13. The mouse liver showed approximately double protoporphyrin level in case of the rat.

14. The inhibitory action of globin *in vitro* on tryptophan oxygenase was weaker in the mouse liver than in the case of rat and the same tendency was shown in the reversal effect of hemin on this action, too.

15. The enzyme activity was activated by the addition of AMP or of adenosine to cell sap fractions of mouse and rat livers. The rate of activation was larger in the mouse liver than in case of the rat.

16. The addition of xanthin oxidase to cell sap fraction showed no effect on tryptophan oxygenase activity. In the male, mouse liver xanthin oxidase activity was significantly lower than that in the rat liver, but in the female it was not so significant as in the male.

17. Although in rats the addition of allopurinol to the cell sap fraction inhibited tryptophan oxygenase activity, in mice the activity was made to be increasing more or less by the addition.

From these results, it was suggested that the normal mouse liver is supplied with remarkably less apo tryptophan oxygenase and with more inactive holoenzyme (or latent form enzyme) than it is in case of the rat liver.