

Title	ビタミンB6代謝に関する研究
Author(s)	森末, 禎一
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/28203
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	森 末 禎 一 もり すえ てい いち
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1 1 0 号
学位授与の日付	昭和 35 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科生理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	ビタミンB ⁶ 代謝に関する研究
	(主 査) (副 査)
論文審査委員	教授 市原 硬 教授 須田 正巳 教授 今泉 礼治

論 文 内 容 の 要 旨

I Tryptophanase による Pyridoxal 燐酸 (PALP) の定量法

目 的

B₆ 酵素は一般にアポ蛋白と PALP との結合が強く、アポ蛋白のみを得ることは容易でない。所が大腸菌より取った Tryptophanase は PALP が解離し易く、全く作用のないアポ蛋白がたやすく得られ、かつ或範囲内では添加 PALP 量に比例して Indole が形成される。そこで本酵素を用いて PALP の定量法を考案した。

定量方法及び結果

Apo-tryptophanase の調製：乾燥大腸菌 (K-12) を Sonic 抽出後、pH4.4 等電点沈澱、透析にて調製した。検体液の調製：組織をメタ燐酸と混和磨砕し、熱処理の後遠沈し、その上清を 20 倍 (血清の場合は 2 倍) にし、その 1/20 (血清の場合は 1/4) を試料として使用した。

反応条件：上記試料 1ml, Apo-tryptophanase 1ml, 硫安 250 μ M, L-Tryptophane 10 μ M, を pH8.0 で 37°C 5 分 (血清の場合には 15 分間) 反応し、30% トリクロル酢酸 1ml にて反応を止めた。

Indole 測定：生成 Indole は後藤氏法により、石油エーテルにて 2 回抽出し、Ehrlich の Aldehyde 試薬により発色させ、比色計で 10mm の液槽を用い、Filter S₃₅ にて定量した。

標準曲線：既知 PALP を試料調製と同様に処置し、反応後 Indole を測定し標準曲線を描き、これから求め再現率及測定可能範囲：家兎肝の再現率は 95% であり、本法による測定可能範囲は 0.01~0.5 μ g であった。臓器 PALP 含有量：本法により健康家兎臓器含有量は平均、腎 2.78 脳 1.62 肝 4.56 μ g/g で、人血清は平均 0.023 μ g/ml である。

総 括

PALP の定量法としては従前よりの Tyrosine 脱炭酸酵素を用いる方法に比し、本法はアポ酵素の調

製が容易で, Pyridoxine (PIN), Pyridoxal (PAL), Pyridoxamine (PAM) も反応に影響なく, 更に測定限界値も高い。種々測定した臓器の中で, 肝臓に最も多くの PALP が含まれていた。

II Pyridoxine 磷酸 (PINP) Oxidase について

目 的

PIN より PALP の合成経路として (A) PIN→PAL→PALP の経路と (B) PIN→PINP→PALP の2つの経路が考えられる。著者は先の PALP 定量法を用いてこれを検討し, (B) の経路の方が重要であることを明らかにし, 更に PINP→PALP の酵素を精製し性質を調べた。方法: PINP の合成: (1) PIN を POCl_3 で磷酸化 (2) PALP を NaBH_4 にて還元 (3) Pyridoxamine 磷酸 (PAMP) に亜硝酸を働かす。以上の3通りの方法により合成した。

酵素による PALP の定量: 生成 PALP は, 反応液を沸騰水につけ反応を止め Apotryptophanase にて定量した。吸光度による PALP, PINP の定量: 反応液をトリクロル酢酸除蛋白後, 苛性ソーダにてアルカリ性にし, $E_{388}=5700$ より PALP を, $E_{310}=7300$ より PINP を定量した。

4-Deoxypyridoxine 磷酸 (DPINP) の合成: 4-Deoxypyridoxine (DPIN) を POCl_3 で磷酸化した。PAL の定量: 家兎肝の精製 Aldehyde Oxidase で PAL を 4-Pyridoxine 酸 (PIC) にし, 蛍光にて定量した。

結 果

家兎肝抽出液の PALP 形成: 肝臓は Aldehyde Oxidase の活性が強く, PAL は容易に酸化されて, $\text{PAL}+\text{ATP}$ でも PALP の形成は非常に少ない。所が $\text{PIN}+\text{ATP}$ で可成り PALP が形成された。然も PIN から PAL, PIC の生成もない。そこで PALP 合成は (B) の経路によって, PINP を経て進むと考えられる。家兎肝抽出液における合成 PINP から PALP の生成: 合成 PINP を基質にすると, 反応液から Mg^{++} , ATP を抜いておいても容易に PALP を生成した。然もこの反応は, 嫌気性になると進まなかった

PINP Oxidase の精製: 家兎肝より等電点処理, 硫酸分割, Alcohol 分割, Ca-Gei 吸脱着, A1-Cr 吸脱着により約60倍に精製し, PAMP Oxidase を幾らか分離した。

精製 PINP oxidase の性質: 至適 pH は 8~9 にあり, PINP に対する $K_m=20 \times 10^{-5} \text{M}$ で, DPINP にて拮抗的に阻害され $K_i=35 \times 10^{-4} \text{M}$ であった。

この酵素は PIN→PAL の反応は起らぬ。

PINP Oxidase の電子受容体: 嫌気性下 Methylene blue を脱色し, 酸性硫酸処理にて FMN にて賦活された。PINP→PALP の化学量論: *Pseudomonas* を用いて Warburg 検圧計により酸素消費 (0.84 酸素原子) を, 反応液を除蛋白し $310 \text{m}\mu$ の吸光度より PINP の減少量 ($0.83 \mu\text{M}$) を, $388 \text{m}\mu$ の吸光度より PALP の形成量 ($0.81 \mu\text{M}$) を求めた。又 Alcohol 添加により酸素消費が倍加した。

PINP Oxidase, PAMP Oxidase の活性分布: 家兎臓器活性は, 両者共に肝, 腎, 血球, 脳の順に強い。

S. faecalis の PINP Oxidase 活性: *S. faecalis* は PAL, PAM でよく成長するが PIN では成長しない。これは PINP Oxidase を欠いているために PIN より PALP が形成されないことが判った。

総 括

PIN より PALP の形成を調べた。PIN→PAL に比し、PINP→PALP の活性が非常に強い。又肝では PAL+ATP より PIN+ATP の方が PALP の形成は大である。従って生理的には PALP はPIN→PINP→PALP の経路によって合成されると考えられる。

又、PINP Oxidase を精製し、種々性質を調べ Flavin 酵素であることを明らかにした。

PINP Oxidase 反応機構を調べ、反応は $\text{PINP} + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{PALP} + \text{H}_2\text{O}$ と進む。

DPINP により PINP Oxidase は強く拮抗的に阻害される。そこで DPINP の動物 B₆ 阻害機構の一端はこの酵素阻害にあるものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

I Tryptophanase による Pyridoxal 燐酸の定量法

本論文の要旨は昭和31年10月、第29回日本生化学会に於て発表。大阪医学会雑誌11巻29号5731頁（昭和34年12月）に掲載。

一般に B₆ 酵素はアポ蛋白と Pyridoxal 燐酸との結合が強く、アポ蛋白のみを得ることは容易でない。所が大腸菌より調製した Tryptophanase は両者の解離が甚だ容易で pH4.4 等電点処理、透析によりアポ蛋白がたやすく得られ、且つ一定範囲内では添加した Pyridoxal 燐酸量に比例して Tryptophan より Indole を形成する。そこで本酵素を用いて Tryptophan に作用させ、形成 Indole を比色することによって Pyridoxal 燐酸の定量法を考案した。

本法による測定可能範囲は 0.01~0.5 μg で家兎肝臓を用いての再現率は 95% である。また Pyridoxal, Pyridoxine, Pyridoxamine 及び ATP は測定値に影響しなかった。

本法を用いて健常家兎臓器の Pyridoxal 燐酸及び人血清の Pyridoxal 燐酸を定量した。家兎腎では平均 2.78 $\mu\text{g}/\text{g}$ 脳では 1.62 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、肝では 4.56 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、又人血清では平均 0.023 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の結果を得た。

II Pyridoxine 燐酸化酵素について

本論文の要旨は昭和33年7月、第31回日本生化学会、昭和34年7月、第11回酵素化学シンポジウムに於て発表。大阪医学会雑誌、11巻29号5735頁（昭和34年12月）に掲載。

Pyridoxal 燐酸が生体内で Pyridoxine より形成される経路として A) Pyridoxine→Pyridoxal→Pyridoxal 燐酸の経路と、B) Pyridoxine→Pyridoxine 燐酸→Pyridoxal 燐酸の経路との2つの可能性が考えられる。そこで前記 Tryptophanase による Pyridoxal 燐酸の定量法を用いて、この可能性を検討した。

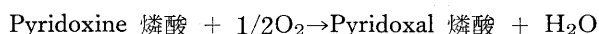
家兎肝抽出液を用いて ATP、Mg⁺⁺ の存在下に Pyridoxine より Pyridoxal 燐酸を生成するが、Pyridoxal を基質とした場合には Pyridoxal は酸化されて Pyridoxine 酸となり、ATP と共に反応しても Pyridoxal 燐酸の形成は少い。

この事から B) の可能性が考えられるので Pyridoxine 燐酸を化学的に合成した。この合成 Pyridoxine 燐酸に家兎肝抽出液を働かせると ATP、Mg⁺⁺ がなくても Pyridoxal 燐酸が合成され、し

かもこの反応は嫌気性になると進行しなかった。従って Pyridoxine より Pyridoxal 燐酸の形成は生理的には B) によって進むものと考えられる。

この Pyridoxine 燐酸から Pyridoxal 燐酸を形成する酵素 (Pyridoxine 燐酸酸化酵素) を精製して性質を検討した。至適 pH は 8~9 にあり, Pyridoxine 燐酸に対する $K_m=2.0 \times 10^{-5}M$ で, 4-Deoxypyridoxine 燐酸により拮抗的に阻害され, $K_i=3.5 \times 10^{-4}M$ であった。この酵素の電子受容体としては, 嫌気性下に, Methylene blue の脱色, 酸性硫酸処理による FMN の賦活, ethanol 添加による酵素消費の倍加の点から Flavine の関与が考えられる。

Pyridoxine 燐酸→Pyridoxal 燐酸の反応の化学量論を *Pseudomonas* を用いて調べた結果, 反応は



に進行することが明らかになった。

家兎及ネズミの臓器における Pyridoxine 燐酸酸化酵素と, Pyridoxamine 燐酸酸化酵素の分布を調べ, 家兎肝に最もその活性が強いことを認めた。

Streptococcus Faecalis は Pyridoxal 燐酸にてよく成長するが, Pyridoxine 燐酸にて全く成長しない原因を調べ, この菌は Pyridoxine 燐酸酸化酵素を欠くためであることを明らかにした。

以上 Pyridoxal 燐酸の定量法を考案し, Pyridoxal 燐酸の形成には Pyridoxine 燐酸を経て合成される経路が生理的に極めて重要であり, 且つこの酸化酵素が種々の生物学的現象上, 大きな役割を演じていることを明らかにした。

〔略字〕 Pyridoxine (燐酸) =PIN (P), Pyridoxal (燐酸) =PAL (P), Pyridoxamine (燐酸) =PAM (P), 4-Deoxypyridoxine (燐酸) =DPIN (P), 4-pyridoxine酸=PICの略字を使用した。