

Title	ビタミンB6代謝酵素系について-Pyridoxine dehydrogenase及isopyridoxal reductase-
Author(s)	森野, 能昌
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/28409
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

【 34 】

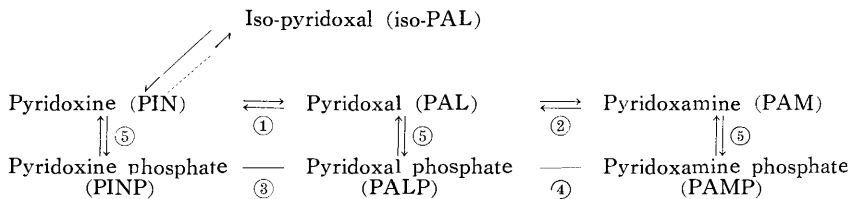
氏名・(本籍)	森野能昌 もり の よし まさ
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 303 号
学位授与の日付	昭和 37 年 3 月 27 日
学位授与の要件	医学研究科 生理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	ビタミン B ₆ 代謝酵素系について -Pyridoxine dehydrogenase 及 isopyridoxal reductase-
	(主査) (副査)
論文審査委員	教授 早石 修 教授 須田 正巳 教授 今泉 礼治

論文内容の要旨

〔目的〕

ピリドキサル燐酸 (PALP) がアミノ酸の種々代謝酵素の coenzyme としてきわめて重要な役割を演じていることは周知の事実であるが、その生合成系路については明らかでなかった。

Vitamin B₆ 各型の代謝相関を示すと次のごとくである。



この中、⑤の燐酸化は自然界に広く分布する Kinase によって触媒されることはすでに明かである。しかしながら PALP が PIN から形成される場合は ①および ⑤を経るか、あるいは ⑤および ③を経るかについてはなお不明であったが、和田および著者らは兎の組織を用いた実験から動物体内では PIN はまず PINP に燐酸化される経路 (⑤ および ③) が PALP 形成の主道であることを証明した。著者はさらに PIN→PAL なる代謝過程を検討し、動物組織の PIN 酸化酵素系については Pyridine nucleotides 要求性も flavine 酵索性格も明らかにしえなかったが、パン酵母およびビール酵母抽出液が TPNH 存在下に PAL を PIN に還元する酵素活性を有することを認め、これを Pyridoxine dehydrogenase (PDH) と命名した。

本研究はパン酵母抽出液より PDH を精製し、その諸性格並びにその自然界における分布について検討する目的で行ったが、PAL の異性体である ISO-PAL の還元を触媒する酵素活性をも見出したので併せて報告する。

〔方法並びに成績〕

PIN から TPN 存在下に形成された PAL 量をもって PDH 活性とした。PAL は酸性溶液中で作る 2,4-dinitrophenylhydrazon の $410 m\mu$ における吸光度から測定した。

iso-PAL から TPNH (または DPNH) 存在下に形成される PIN は ATP, Mg^{++} 存在下に Kinase (ビール酵母より精製) により PINP とし, これを PINP Oxidase (*Pseudomonas aeruginosa* から精製) によって PALP となし, これを Apotryptophanase (*E. coli*) によって定量した。この方法では標準曲線は PIN $1.0 m\mu mole/ml$ まで直線である。

PDH の精製は乾燥パン酵母の autolysate より硫酸分劃 (55~66%), アルミナ C γ ゲル, さらに硫酸を用いて約 60 乃至 70 倍に精製した。TPN 存在下に PIN から PAL が形成されることは吸収曲線並びにペーパークロマトにより確認した。

本反応の至適 pH は PIN の酸化において 9.5 にある。PDH は TPN に特異的で DPN は全く無効である。PIN および TPN に対する K_m はそれぞれ $1.6 \times 10^{-3} M/L$, $6.0 \times 10^{-4} M/L$ である。

次に TPNH generating system 存在下に逆反応即ち PAL の PIN への還元について検討した。この場合にもやはり TPNH のみ有効で PAL に対する K_m は $4.4 \times 10^{-5} M/L$ であった。なお pH 9.0 における平衡恒数 $\frac{[TPNH][PAL][H^+]}{[TPN][PIN]}$ は約 10^{-11} であった。従って生理的条件下では本反応の平衡は著しく PIN 側に片寄っているといえる。

基質特異性を調べたところ, PIN, PAL の他に 5-deoxy-PAL が充分基質となりうるということがわかった。5-deoxy-PAN に対する K_m は $3.7 \times 10^{-4} M/L$ で PAL に対する K_m より大きい。4-deoxy-PIN は基質になり得ないし, また PIN の酸化を阻害もしなかった。iso-PAL は TPN および PDH 存在下に酸化されなかった (ペーパークロマトで iso-PAL 以外の spot を認めない)。なお TPNH 存在下に減少し新たに PIN を形成したがその活性は非常に低い。PINP, PALP は基質となり得なかった。

ここで PDH が Pyridoxine の 4 位の $-CH_2OH$, $-CHO$ 間の酸化還元を特異的に行なうものであるか, または iso-PAL のごとく 5 位の $-CHO$ をも同様に還元するものか否かを検討するため, 両活性についてパン酵母抽出液の硫酸による分劃および酸, 熱に対する態度を調べた。その結果, 両活性の完全なる分離には成功しなかったが, 上述の各酵素標品における両活性の比が明らかに異なること, さらに後述するごとく両酵素の自然界における分布が全く異なることより 5 位置換基の酸化還元と 4 位のそれとは別箇の酵素によって触媒されることが明らかとなった。5 位の $-CHO$ の還元を行う酵素を仮に iso-PAL reductase と名付けた。なお本酵素反応には, DPNH は TPNH の約 1/2 有効であった。PDH は Co^{++} ($2.0 \times 10^{-5} M$), Mg^{++} ($2.0 \times 10^{-3} M$), Mn^{++} ($2.0 \times 10^{-4} M$) によってそれぞれ 80%, 60%, 20% の活性化をうけるが Ni^{++} ($5 \times 10^{-4} M$), Zn^{++} ($5 \times 10^{-4} M$) によって著しく阻害された。なお $10^{-3} M$ の EDTA, α, α' -dipyridyl, o-phenanthroline はほとんど影響を与えなかった。

P-CMB ($5 \times 10^{-5} M$) によって完全に阻害され, GSH ($2 \times 10^{-3} M$) によって約 130% の活性化をうけた。なお P-CMB による阻害は TPN によって protect されるが PIN によっては protect されなかった。GSH は当然 protect したのみならず P-CMB 阻害を回復した。PDH はパン酵母以外にビール酵母, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Lactobacillus casei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* 等に存在するが兎およびラットの脳, 肝, 腎, 筋肉組織には何れも証明できなかった。iso-PAL reductase 活性は, パン酵母, *E. coli*, *Saccha-*

romyces carlsbergensis にのみ存在した。

〔総括〕

本研究によりパン酵母その他に pyridoxine の 4 位置換基の酸化還元を行う TPN-specific な PDH および 5 位置換基の還元用 iso-PAL reductase が存在することが明らかとなった。

論文の審査結果の要旨

アミノ酸の種々代謝酵素の助酵素としてめわめて重要な役割を演ずるピリドキサルリン酸がピリドキシリンよりいかにして形成されるかは不明であった。

そこで著者はピリドキシリンのピリドキサルエの酸化系路について検討した結果、パン酵母その他は TPN (Triphospho-pyridine nucleotide) 存在下にピリドキシリンを脱水素してピリドキサルに変換する酵素活性を発見しこれをピリドキシリン脱水素酵素と命名した。パン酵母より精製した本酵素は助酵素として TPN を特異的に要求して DPN では代用できない。本酵素反応は可逆性であり、生理的条件下では反応の平衡は圧倒的にピリドキシリン側に片寄っている。本酵素はピリドキシリンの 4 位の置換基の酸化還元を特異的に触媒する。

上述酵素とは別にイソピリドキサールの 5 位の -CHO を還元してピリドキシリンを生ずる酵素がパン酵母中に存在することを証明した。本酵素は助酵素としては同じく TPNH を要求するが DPNH でも約 1/10 の活性を有する。

以上 2 種の酵素の自然界における分布を調べ従来より知られている栄養実験のいくつかについて酵素レベルより裏付けることができた。