

Title	ビタミンK3の酵素化学的研究
Author(s)	蒔田, 政見
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/28447
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【12】

氏名・(本籍)	藤田政見 まさ た まさ み
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 222 号
学位授与の日付	昭和36年7月20日
学位授与の要件	薬学研究科薬品化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ビタミン K ₃ の酵素化学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 上原喜八郎 (副査) 教授 川崎近太郎 教授 羽野 寿

論文内容の要旨

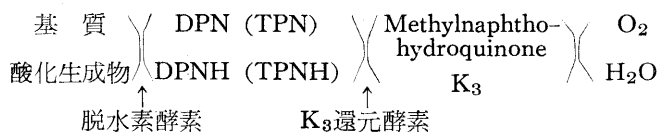
ビタミンK（以下“ビタミン”を略し単にKと記す。また同様な意味でK₁, K₂, K₃を用いる。）は周知のように血液凝固促進因子として発見せられたビタミンであり、従来その作用機作に関する研究は専らKを直接血液凝固反応と関係づけようという観点から行なわれてきた。しかし現在Kと血液凝固反応との関係はなお明らかでなく、ただKがプロトロンビンの生成と関係をもっていると推察されているにすぎない。

一方K₁, K₂をはじめ、これらと構造の類似したキノン化合物の分布は、生物界に普遍的であって、血液凝固反応と全く関係のない植物や微生物にもおよんでいる。このことはKやキノン化合物が各種の生物に共通した何か重要な生理的意義をもっていて、高等動物における血液凝固促進作用はむしろこのようなKの本質的な作用から派生する二次的な現象ではないかということを示唆する。

1953年著者は上原教授の御指導のもと、糖代謝に関する研究に従事していたが、たまたま微量のK₃の添加によって酵母抽出液によるグルコース-6-リン酸グルコン酸-6-リン酸の酵素的酸化が著明に促進されることを認めた。著者らはこの現象はKの作用機作を解明するうえに重要ないとぐちを与えるものと考え、ここにK₃の酵素化学的研究に着手した。

まずi) K₃と構造の類似した二、三のナフトキノン誘導体もK₃と同様にグルコン酸-6-リン酸の酸化を促進する。ii) K₃濃度と酸化促進効果との関係においてK₃があまり高濃度になるとむしろ阻害的となる。iii) K₃は酵母抽出液による糖のリン酸エステルの酸化のみならず、同じく酵母抽出液によるアルコール、結核菌抽出液によるグルコン酸-6-リン酸および動物組織酵素標品によるアルコール、乳酸、コハク酸の酸化をも促進する。しかし動物組織酵素標品によるD-アミノ酸の酸化は少しも促進しない等のことを明らかにした。この場合、K₃の酸化促進作用はどのような機作で行なわれるかが問題となるか。i)の結果からK₃の酸化促進作用はそのナフトキノン核の酸化還元に基づくもので、K₃は酸化酵素系で水素伝達体となって基質の酸化を促進するものと推察し、その作用位置について検討した。その結果アルコールの酸化の場合

についていえば、アルコールの酸化が速かに起るためには、アルコール脱水素酵素 Diphospho pyridine-nucleotide (DPN), K_3 および酵母抽出液から分離したフラビンを作用団とする一種の黄色酵素が必要であることが判った。また還元型 DPN (DPNH) の溶液と K_3 水溶液とを混じただけでは DPNH の酸化は全く起きないこと、ロイコフラビンの酸化が K_3 によって行なわれること、および Methyl-naphthoquinone は容易に自働酸化を行なうことを認めた。したがって DPN や Triphosphopyridinenucleotide (TPN) を必要とする脱水素酵素系における K_3 の作用位置を図示すると次のようになる。



すなわち脱水素酵素の作用で、基質から遊離した水素は、まずピリジヌクレオチッド (DPN あるいは TPN) に移行し、還元型ピリジヌクレオチッド (DPNH あるいは TPNH) を生じる。このものから、 K_3 への水素の伝達は一種の黄色酵素 (K_3 還元酵素と命名した) によって行なわれ生じた Methyl-naphthoquinone は直ちに直接酸素と反応し容易に K_3 にもどる。このような反応が繰り返されることによって基質が酸化されるのである。

ついで著者は K_3 と生体酵素系との関係をさらに究明するために上記の還元型ピリジヌクレオチッドによる K_3 の還元を促進する K_3 還元酵素の精製を試み、一連の精製操作すなわち鉛、バリウム塩処理、熱処理、硫酸分割、酸性処理、エタノール分割、アクリノール処理、塩基性炭酸銅吸脱着、再度のエタノール分割等の操作により粗抽出液の約5000倍の比活性をもつ極めて純度の高い酵素標品を得ることに成功した。

この酵素標品を用いて K_3 還元酵素の性状を詳細に検討し次の諸点を明らかにした。

- 1) 精製酵素液はやや緑色味をおびた黄色をしていて、その吸収曲線を測定したところ、可視部375m μ および445m μ に黄色酵素特有の吸収極大が認められた。この酵素液のフラビン含有率を445m μ の吸光度から計算し、これから算出したこの酵素の分子量は約44,000である。
- 2) 比活性 1.04×10^7 の酵素液は、超遠心分離的にほぼ単一蛋白質組成をもち、その沈降定数は約2.86Sであった。これから算出した分子量は38,000~46,000であり、フラビン含有率から求めた値とほぼ一致する。
- 3) 水素供与体としては DPNH および TPNH のいずれもが有効であるが、最高反応速度を比較した場合、TPNH を水素供与体とした時は DPNH の時の約1.3倍である。
- 4) 水素受容体としては、 K_3 の他に各種ナフトキノン誘導体および p-Benzoquinone 等が有効であるが、メチレン青 Brilliant cresol blue チトクロームCおよび分子状酸素等は水素受容体とならない。
- 5) 精製酵素液の煮沸上清液のペーパークロマトグラフィーならびに、酸性硫酸沈澱処理を行なった酵素のフラビン要求性から、この酵素の作用団は Flavinmononucleotide であると結論した。
- 6) 酵素活性は pH 4.0~4.5で最大となる。
- 7) この酵素は非常に安定であり、0~4° で数ヶ月間保存してもほとんど失活しない。また pH 7.0では70° 10分間の加熱に耐える。
- 8) 重金属イオンやモノヨード酢酸等の酵素の Thiol 基に作用する阻害剤はこの酵素に顕著な阻害作用

を示さない。終濃度 $3.3 \times 10^{-4}M$ で Dicumarol は酵素活性の約75%を阻害する。

9) 酵素液に光照射 (30w距離3cm2時間) を試みたが、失活は認められなかった。

このような諸種の性状から判断して、この酵素は既知の黄色酵素とは別個の K_3 やキノン化合物に強い親和性を有する活性の極めて強力な酵素であるといえる。

生物界におけるKやその類似体の分布が普遍的であり、またこのような K_3 やキノン化合物の還元を行なう強力な酵素が細胞中に存在している事実は、Kの酸化還元的な役割を示唆するものである。著者はここにKが生細胞内で酸化還元酵素系の助酵素として重要な酵素化学的意義を有するものと確信する。

本研究の発端よりすでに数年余の年月が経過した今日、上述の著者の研究と並行して諸外国の研究者もまた独自の立場から著者の推論の裏付けともいふべき数々の興味ある研究結果を発表し、漸くKの酵素化学的意義は注目されるに至ったわけである。

現在なおこのようなKの酵素化学的意義と血液凝固促進作用とを結びつけることはできないが、将来これらの知見が基礎となり、Kの血液凝固促進作用の機作が解明されるものと期待する。

論文の審査結果の要旨

本論文の内容はビタミン K_1 及び K_2 の作用機構を明らかにする目的でこれらのビタミンと構造の極めて類似しているビタミン K_3 (2-methyl-1, 4-naphthoquinone) に関して行った酵素化学的研究に関するものである。

ビタミンの作用機構に関する研究は水溶性のものについては著しく発展しているが脂溶性のものに関しては未だ多くの例を見ないのが現状である。

本研究は酵母の抽出酵素系によって glucose-6-phosphate, 6-phosphogluconate などの酸化がビタミン K_3 によって促進されることを発見したことに端を発し、動植物組織を用いて普遍的にビタミン K_3 が呼吸酵素系の活性を増強することを認め、その作用部位が dehydrogenase system と cytochrome-cytochrome oxidase system の中間に於いて、両酵素系の作用を連結する役割を演じていることを推察させるに至った。

この一連の研究の中で特にビタミン K_3 の還元が一種の黄色酵素の作用によって行われることを明らかにしたことは著しい業績であり、その黄色酵素の精製を行い、極めて高純度のものを得ることに成功するとともに、その性状を明らかにしてこの酵素がこれまでに知られている黄色酵素とは異なるものであることを明らかにした点は細胞呼吸酵素系の研究及びビタミン K_1 及び K_2 の作用機構の研究の発展に一大寄与をなしたものである。上述の理由から本論文は博士論文として充分の価値のあるものと認める。