

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | ビタミンB6の酵素的分別定量法とその応用  |
| Author(s)    | 中原, 伊左雄   |
| Citation     |   |
| Issue Date   |   |
| Text Version | none  |
| URL          | <a href="http://hdl.handle.net/11094/28494">http://hdl.handle.net/11094/28494</a> |
| DOI          |   |
| rights       |   |
| Note         |   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

|         |  |
|---------|--|
| 氏名・(本籍) | 中 原 伊 左 雄<br>なか はら い さ お                           |
| 学位の種類   | 医 学 博 士  |
| 学位記番号   | 第 396 号  |
| 学位授与の日付 | 昭 和 38 年 3 月 25 日                                  |
| 学位授与の要件 | 医 学 研 究 科 生 理 系<br>学位規則第 5 条第 1 項該当                |
| 学位論文題目  | ビ タ ミ ン B <sub>6</sub> の 酵 素 的 分 別 定 量 法 と そ の 応 用 |
| 論文審査委員  | (主 査) 教 授 萩 原 文 二 (副 査) 教 授 須 田 正 巳 教 授 坂 本 幸 哉    |

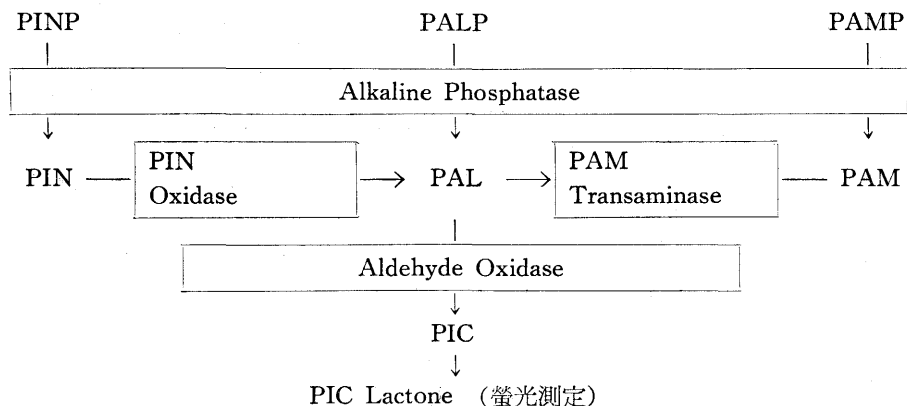
論 文 内 容 の 要 旨

〔研究目的〕

従来ビタミン B<sub>6</sub> の分別定量法としては微生物学的定量法, GIBBS 試薬による比色定量法或は化学的に PIC\* に変換してそのラクトンの螢光を測定する方法等が用いられている。しかしいずれの方法も操作が繁雑で時間を要し, ビタミン B<sub>6</sub> 6 型を完全に分別定量することは困難である。そこで私はビタミン B<sub>6</sub> 代謝に関与する種々の酵素の組合せにより燐酸エステル型をも含めた全ての型のビタミン B<sub>6</sub> を酵素的に PIC に変換し, そのラクトンの螢光を測定する方法を考案した。

更に, この定量法を用いて種々の動物臓器に於けるビタミン B<sub>6</sub> 6 型の含量を測定したところ, 常に微量ではあるが PINP の存在が示唆された。そこで自然界における PINP の存在を一層明確なものとするため鶏肉より PINP の分離を試み, その存在を証明した。

〔研究方法〕



測定方法は図に示したように各型の測定に必要な酵素の組合せにより行なう。例えば PIN の測定には PIN Oxidase と Aldehyde Oxidase の両者を作用させて得た (PIN+PAL) 値から Aldehyde Oxidase のみを作用させた PAL 値を差し引いて PIN 値とする。燐酸エステル型の測定には Alkaline Phosphatase により遊離型にした後に測定を行なうので、あらかじめ存在する遊離型の値を差し引かねばならない。各種酵素の調製法としては、PIN Oxidase と PAM Transaminase は *Pseudomonas M.A.* の抽出液を硫酸分割、熱処理、更にアルミナ Cr ゲルの吸脱着を行なって分離精製し、Aldehyde Oxidase は豚肝より Gordon—Mahler の方法で、Alkaline Phosphatase は仔牛小腸粘膜より Morton の方法でそれぞれ調製した。これらの酵素を充分に試料に働かせて後、ラクトン化は終末 IN の HCl 中で 100°C 15 分間加熱して行ない、pH9.0 における螢光の強さを Farrand Spectrofluorometer で測定した。

#### 〔成 績〕

##### 1. 酵素的分別定量法

著者の用いた条件下では純品の PAL, PIN, PAM 及び各々の燐酸エステル型は何れも測定可能で、その範囲は 0.02~1.0 $\mu$ g である。又 PAL, PIN 及び PAM 3 者混在時の検出率はそれぞれ独立にほぼ 100% である。このことはこの定量法がビタミン B<sub>6</sub> 各型を同時に含む試料について充分適用し得ることを示している。次にラツテの種々の臓器よりの抽出液にビタミン B<sub>6</sub> 6 型を各々 0.5 $\mu$ g/ml 添加してその回収率を測定したが何れも 94% 以上であった。

##### 2. ラツテ各種臓器のビタミン B<sub>6</sub> 6 型の含量

ラツテの種々の臓器に於けるビタミン B<sub>6</sub> 6 型の含量を上述の方法で測定したが、遊離の型は非常に少なく、燐酸エステル型では既に知られているように各臓器共に PALP 次いで PAMP が多く、それ以外にごく少量の PINP の存在が認められた。このことは私共の教室が以前より動物組織内に於ける PIN より PALP の生成には PINP を中間体とする主張している事実を支持するものと考えられ、更に自然界における PINP の存在を確認するため次の実験を行なった。

##### 3. 鶏肉よりの PINP の分離精製及びその確認

鶏肉 1.2kg よりメタ燐酸抽出を行なって後バリウム、エタノール処理 (モノ燐酸エステル分割の分離)、更に Dowex 1 (Cl<sup>-</sup>型) 及び IRC—50 (H<sup>+</sup>型) の両イオン交換樹脂でクロマトを行なった (PALP 及び PAMP を分離するため)。その後合成 PINP 分割に相当する部分を 4.2ml に濃縮し、全量を帯状にペーパークロマトグラフィーで展開、螢光帯部を水で抽出し、この抽出液について紫外部吸収スペクトル及び 2 種の溶媒でのペーパークロマトグラフィーでの態度を調べた。その結果は全く合成 PINP のそれと一致し、更に上述の酵素的定量法及び別種の PINPOxidase と Apotryptophanase を組合せた方法でも PINP であることが確認された。

#### 〔結 論〕

1. ビタミン B<sub>6</sub> 代謝に関与する種々の酵素の組合せによりビタミン B<sub>6</sub> 6 型を分別的に定量する方法を考案した。その測定可能範囲は 0.02~1.0 $\mu$ g である。
2. この方法によりラツテ各臓器のビタミン B<sub>6</sub> 6 型の含量を測定し、PINP の存在が示唆された。
3. 鶏肉より PINP を分離精製しその存在を確認した。

\* 次の略号を用いた。

PIN=Pyridoxine,  
PAL=Pyridoxal,  
PIMP=Pyridoxine-5'-phosphate,  
PALP=Pyridoxal-5'-phosphate,  
PAMP=Pyridoxamine-5'-phosphate,  
PIC=4 Pyridoxic acid.

#### 論文の審査結果の要旨

従来、ビタミン B<sub>6</sub> 三型即ちピリドキシン、ピリドキサール及びピリドキサミンの分別定量法として用いられて来た方法は、いずれも操作が繁雑で時間を要し、しかも、各々の磷酸エステル型をも含めたビタミン B<sub>6</sub> 六型を完全に分別定量することは困難であったが、このビタミン B<sub>6</sub> 代謝に関与する種々の酵素の組合せによる酵素的分別定量法は操作は比較的簡単で、しかも回収率、感度もよく、磷酸エステル型をも含めたビタミン B<sub>6</sub> 六型を分別的に定量することが出来る。

更に、本定量法を用いて、ラットの種々の臓器におけるビタミン B<sub>6</sub> 六型の含量を測定中僅かではあるがピリドキシン磷酸が各臓器にあることが証明され、次いで鶏の筋肉より、このピリドキシン磷酸を分離確認した。この事実は従来本生化学教室で主張して来た、ビタミン B<sub>6</sub> の活性型であるピリドキサール磷酸の生合成経路がピリドキシン磷酸を経て行なわれることを裏付けするもので、重要な意義を有する。