

Title	各種Vitamin B6-燐酸エステルに対する酸性およびアルカリ性Phosphataseの作用
Author(s)	岡田, 尚武
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/28681
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	岡田尚武 おか だ なお たけ
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 548 号
学位授与の日付	昭和 39 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	各種 Vitamin B ₆ —燐酸エステルに対する 酸性およびアルカリ性 Phosphatase の作用
	(主査) (副査)
論文審査委員	教授 萩原文二 教授 坂本幸哉 教授 山野俊雄

論 文 内 容 の 要 旨

発表機関第 9 回日本生化学会近畿地方部会 (昭和 37 年 6 月 30 日)

大阪大学医学雑誌 15 211 (1963)

〔目 的〕

Vitamin B₆ の各種燐酸エステルに対する Pase* の作用については、現在まで十分な研究はなされていない。

このため、私は各種の Pase を精製し、B₆-燐酸エステル三型に対する作用を系統的に研究した。

なお、本研究の結果を応用して、中原は B₆ 六型の酵素的分別定量法を考案し、既に発表している。

〔方 法〕

渡辺らの方法により甘藷の酸性 Pase (精製度約 370 倍), Morton の方法により仔牛小腸粘膜のアルカリ性 Pase (精製度約 50 倍), Garen らの方法により大腸菌のアルカリ性 Pase (精製度約 350 倍) Rogers らの方法により同じく大腸菌の酸性 Pase I 型および II 型 (精製度それぞれ約 50 倍および約 20 倍) を精製し実験にはこれら精製酵素の最終標品を用いた。

Pase 活性の測定には、基質より遊離する無機燐酸を燐—Vandomolybden 酸法で測定する方法と、p-NPP* を基質として用い、生じた p-NP* をアルカリで発色させて測定する方法の両者を併用した。

〔成 績〕

1 甘藷の酸性 Pase および仔牛小腸のアルカリ性の Pase の作用

甘藷の酸性 Pase の至適 pH は 6.0 附近にあり、PALP*, PINP* および p-NPP はよく分解するが、PAMP* に対してはその作用の弱いことがわかった。一方小腸のアルカリ性 Pase は至適 pH は 9.0 附近にあり、PINP が一番速く、PALP と PAMP はやや弱いが発色速度で分解されることが明らかとなった。

次に甘藷の酸性 Pase に対する PAMP あるいは PAM* の阻害作用をしらべたが、基質と同程度の濃度では殆んど両者とも PINP または PALP の水解に対し阻害作用を示さなかった。

2 大腸菌のアルカリ性 Pase の作用

至適 pH は10~11で、B₆-リン酸エステル三型のうち PINP と PAMP はほぼ等速度で、PALP はその約3%の速さで分解される。しかしこの酵素活性は pH 5.0 附近でも僅かに存在しているので酵素を非常に大量用い、かつ反応時間を延長して pH 5.0 における B₆-リン酸エステル三型に対する相対速度を調べると PAMP に対する活性が一番強く酸性 Pase の場合とは異った結果を得た。

なお、B₇-リン酸エステル以外に種々の Monophosphate に対する活性を測定したが、後記の酸性 Pase の場合とは著しく異っていて、(第1表参照) 基質の構造により相対速度には多少の差はあるが、いずれも比較的良好に分解することがわかった。

3 大腸菌の酸性 Pase の作用

Rogers らの報告によると大腸菌の酸性 Pase はその種類が複雑で約5種類の isoenzyme が存在することが知られている。私も Rogers らの方法に従って酸性 Pase I および II と命名された分割の酵素について、B₆-リン酸エステル三型およびその他の基質に対する活性を測定した。至適 pH は I 型では、p-NPP, PINP, PALP および PAMP に対しそれぞれ5.0, 6.0, 4.5および6.0であり、II 型では G-I-P に対し5.5と7.5の二つの山を示し、PINP, PALP および PAMP に対し、それぞれ6.0, 4.5および6.0である。又各種基質に対する水解速度比は第1表に示す如くであった。

これら両酵素の B₆-リン酸エステル型に対する作用はともに PALP, PINP は確かに水解するのに対し、PAMP は殆んど分解し得ない。また PAMP と同様、PO₄ 基に NH₂ 基が近接しているような種々の化合物、例えば P-Serine, P-Threonine, P-Choline なども殆んど全く水解されなかった。

第1表 大腸菌酸性およびアルカリ性の各種基質に対する水解速度比

基 質	アルカリ性 Pase		酸 性 Pase			
			I 型		II 型	
	水 解 速 度 比	Km	水 解 速 度 比	Km	水 解 速 度 比	Km
		×10 ⁻³ M/L		×10 ⁻³ M/L		×10 ⁻³ M/L
β-Gly-P	100	4.5	0		3	
p-NPP	139	5.7	100	1.8	14	
G-I-P	106		0		100	1.5
PINP	143	2.5	2	3.7	16	25
PALP	79	1.9	5	3.6	4	9.1
PAMP	126	2.8	0		0	
P-Serine	84		0		0	
P-Ethanolamine	57		0		0	
P-Threonine	65		0		0	
P-Choline	62		0		0	
Ga-6-P	49		4		88	

〔総 括〕

1. 甘藷および大腸菌より酸性 Pase を、また仔牛小腸粘膜および大腸菌よりアルカリ性 Pase を精製し、Vitamin B₆-燐酸エステル三型に対する水解の能力を調べた。アルカリ性 Pase は B₆-燐酸エステル三型ともによく水解するが、酸性 Pase は PINP と PALP に比して PAMP は水解し難い。

2. 大腸菌の酸性 Pase は PAMP 以外でも、NH₂ 基と PO₄ 基の近接しているような基質（例えば P-Serine, P-Threonine など）は水解し難いが、大腸菌のアルカリ性 Pase はこれらの基質をよく水解する。

3. Vitamin B₆-燐酸エステルすべてを能率よく脱燐酸するには、アルカリ性 Pase が酸性 Pase より有効である。

*次の略号を用いた。Pase=Phosphatase, PAM=Pyridoxamine, P=燐酸エステル基, PINP=Pyridoxine-5'-Phosphate, PALP=Pyridoxal-5'-phosphate, PAMP=Pyridoxamine-5'-Phosphate, p-NP=para-Nitrophenol, G-1-P=Glucose-1-phosphate β -Gly-P= β -Glycerophosphate, Ga-6-P=Glucosamine-6-phosphate.

論文の審査結果の要旨

天然の Vitamin B₆ 作用を有するものとしては、本来の B₆ 即ち Pyridoxine (PIN) 以外に Pyridoxal (PAL), Pyridoxamine (PAM) およびそれらの5'の位置が燐酸化された Pyridoxine phosphate (PINP), Pyridoxal-phosphate (PALP), Pyridoxamine phosphate (PAMP) の六型がある。

この中、Vitamin B₆-燐酸エステル三型に対する Phosphatase の作用については、重要な問題があるにもかかわらず、現在まで十分な研究はなされていなかった。著者は各種の Phosphatase を精製し、これら三型に対する作用を系統的に研究した。

酸性 Phosphatase としては、甘藷より370倍、また大腸菌から Rogers らの分類によるⅠ型を50倍、Ⅱ型を20倍精製した。アルカリ性 Phosphatase としては、仔牛小腸粘膜より50倍、大腸菌より350倍精製した。

これら精製酵素標品の B₆-燐酸エステル三型に対する水解能力を調べたところ、アルカリ性 Phosphatase は三型いずれをもよく水解するのに反し、酸性 Phosphatase は PINP と PALP を水解するが、PAMP には殆んど作用しないことがわかった。

更に、B₆-燐酸エステル三型以外の種々の Monophosphate に対しても、アルカリ性 Phosphatase は、一般にいずれをもよく水解するが、酸性 Phosphatase は、PAMP と同様に PO₄ 基に NH₂ 基の隣接しているような構造をもつ物質—例えば Phospho serine Phosphothreonine 等—には作用し難いことがわかった。その理由の一部は、酸性領域では PO₄ 基と NH₂ 基との間で、分子内塩を形成しているためであろうと考えられる。

以上のことから、B₆-燐酸エステル三型を能率よく脱燐酸するには、酸性 Phosphatase よりもアルカリ性 Phosphatase の方が適していることがわかった。この業績は、すでに B₆ 六型の分別定量法にも応用されており、その他の B₆ 研究分野にもかなり貢献するものと考えられる。