



|              |  |
|--------------|--|
| Title        | 各種Vitamin B6-磷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     | 大阪大学, 1964, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/28681">https://hdl.handle.net/11094/28681</a>  |
| rights       |  |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|         |   |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 岡田尚武  |
| 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 <sub>6</sub> —磷酸エステルに対する<br>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 B<sub>6</sub>の各種磷酸エステルに対するPase\*の作用については、今まで充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、B<sub>6</sub>-磷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B<sub>6</sub>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PaseⅠ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磷酸を磷—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はやや弱いが殆んど等速度で分解されることが明かとなった。

次に甘諸の酸性 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、  $B_6$ -磷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  $B_6$ -磷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、  $B_7$ -磷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、いずれも比較的よく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 と命名された分画の酵素について、  $B_6$ -磷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  $B_6$ -磷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、  $PO_4$  基に  $NH_2$  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 速 度 比    | Km                  | 水 速 度 比 | Km                  | 水 速 度 比 | Km                  |
|                |            | $\times 10^{-3}M/L$ |         | $\times 10^{-3}M/L$ |         | $\times 10^{-3}M/L$ |
| $\beta$ -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 B<sub>6</sub>-磷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 B<sub>6</sub>-磷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、NH<sub>2</sub> 基と PO<sub>4</sub> 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 B<sub>6</sub>-磷酸エステルすべてを能率よく脱磷酸するには、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=磷酸エステル基, PINP=Pyridoxine-5'-Phosphate, PALP=Pyridoxal-5'-phosphate, PAMP=Pyridoxamine-5'-Phosphate, p-NP=para-Nitrophenol, G-1-P=Glucose-1-phosphate,  $\beta$ -Gly-P= $\beta$ -Glycerophosphate, Ga-6-P=Glucosamine-6-phosphate.

## 論文の審査結果の要旨

天然の Vitamin B<sub>6</sub> 作用を有するものとしては、本来の B<sub>6</sub> 即ち Pyridoxine (PIN) 以外に Pyridoxal (PAL), Pyridoxamine (PAM) およびそれらの 5' の位置が磷酸化された Pyridoxine phosphate (PINP), Pyridoxal-phosphate (PALP), Pyridoxamine phosphate (PAMP) の六型がある。

この中、Vitamin B<sub>6</sub>-磷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、今まで充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 B<sub>6</sub>-磷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、B<sub>6</sub>-磷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、一般にいづれをもよく水解するが、酸性 Phosphatase は、PAMP と同様に PO<sub>4</sub> 基に NH<sub>2</sub> 基の隣接しているような構造をもつ物質一例えは Phospho serine Phosphothreonine 等一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 PO<sub>4</sub> 基と NH<sub>2</sub> 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、B<sub>6</sub>-磷酸エステル三型を能率よく脱磷酸するには、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 B<sub>6</sub> 六型の分別定量法にも応用されており、その他の B<sub>6</sub> 研究分野にもかなり貢献するものと考えられる。