

Title	ビタミンB1誘導体と蛋白質との反応に関する研究
Author(s)	河野, 啓一
Citation	大阪大学, 1965, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/29004">https://hdl.handle.net/11094/29004</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名・(本籍)	河 野 啓 一 こう の けい いち
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 7 8 1 号
学位授与の日付	昭 和 40 年 9 月 20 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	ビタミン B <sub>1</sub> 誘導体と蛋白質との反応に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 川崎近太郎 (副査) 教授 青木 大 教授 上原喜八郎 教授 青沼 繁

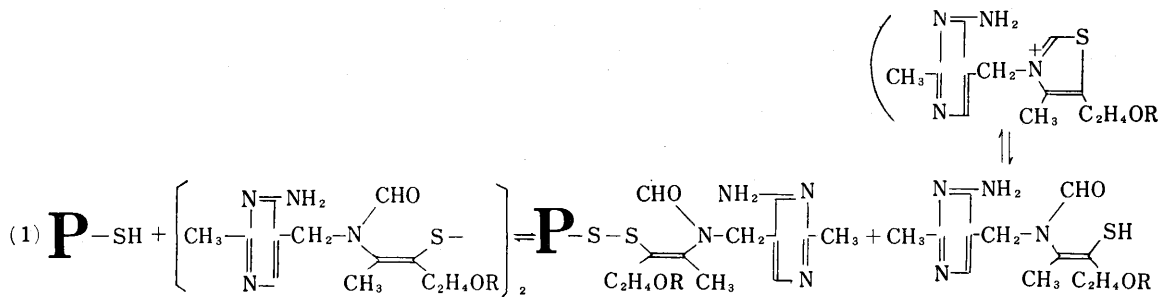
論 文 内 容 の 要 旨

ビタミン B<sub>1</sub> 誘導体と蛋白質との結合物生成現象およびその機作にかんする報告は従来数少なく定説というべきものを見出しえなかった。著者は種々の観点からみたこの問題の意義にかんがみ新誘導体 O-Benzoylthiamine disulfide (BTDS) の一特性の追求を端緒として、B<sub>1</sub> 誘導体の蛋白結合性を化学的相互作用の見地から解明する目的で一連のモデル実験を行なった。

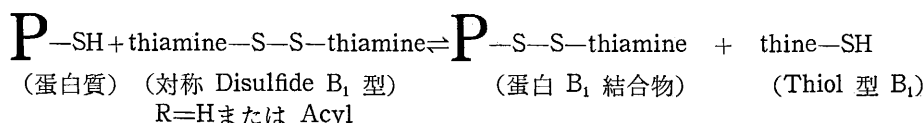
第 1 篇 Disulfide 型 B<sub>1</sub> 誘導体と蛋白質 SH 基との反応

第 1 章 対称 Disulfide 型 B<sub>1</sub> 誘導体と蛋白質との反応による複合体の形成

O-Benzoylthiamine disulfide (BTDS) または Thiamine disulfide (TDS) のような対称 Disulfide 型構造をもつ B<sub>1</sub> 誘導体はすべて、蛋白質の反応性 SH 基と式 1のごとく反応して、遊離型 B<sub>1</sub> と蛋白結合 B<sub>1</sub> とを生成することを明らかにした。



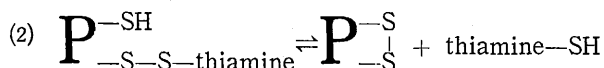
または、



このような蛋白結合  $B_1$  は、変性卵アルブミン、未変性あるいは変性血清アルブミンなどと Disulfide 型  $B_1$  との反応混液 (pH 7.3, 37°C, 1時間) から濾紙クロマトグラフィー、ゾーン電気泳動、平衡透析などの方法によって検出され、いずれの方法によっても両成分に分離しないが還元処理すると遊離型の  $B_1$  を放出する。また、SH 試薬により蛋白質 SH 基を封鎖した場合、あるいは BTDS, TDS の代わりにその構成々分である O-Benzoylthiamine (OBT),  $B_1$  を反応せしめた場合には結合物の生成しないことを確認した。

## 第2章 複合体生成反応の性質

反応混液に蛋白沈澱剤としてメタ磷酸を加え、反応を停止させるとともに生成物を分別、定量する方法を設定した。これを用いてまず反応 pH の影響を検討し、既知の低分子 Thiol-Disulfide 交換反応と同じく、蛋白 SH 基が Mercaptide イオンとして作用することを認めた。つぎに生成物が反応温度および時間とともに増加し反応初期では擬一次反応式が適合することを明らかにした。BTDS と熱変性卵アルブミンとの反応においてその活性化エネルギーは約 12 Kcal/mole となり、明らかに化学反応のレベルにあることが確認された。また蛋白結合  $B_1$  と遊離型  $B_1$  との生成比率は、Disulfide 型  $B_1$  と蛋白質との初濃度比に左右されることを見出し、前記式 1 ならびに式 2 の二つの平衡関係の存在することを示唆した。



## 第3章 非対称 Disulfide 型 $B_1$ 誘導体と蛋白質 SH 基との反応

Thiamine benzyl disulfide (TBzD), Thiamine propyl disulfide (TPD) のような非対称 Disulfide 型構造をもつ  $B_1$  誘導体は、蛋白質 SH 基との反応において遊離型  $B_1$  を生成するにもかかわらず、蛋白結合  $B_1$  を生成しないことを見出した。その原因としては、交換反応にさいし、S-Alkyl 残基が優先的に蛋白結合物をつくるものと推定した。そこで  $\text{HgCl}_2$  との反応を利用した Alkylmercaptan の微量定量法を案出し、TBzD と蛋白質との反応物からシステインによる還元処理によって結合 Benzylmercaptan (BzSH) を分離抽出して定量した結果卵アルブミン、血清アルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリンなどとの反応物について、いずれの場合にも遊離型  $B_1$  生成量にほぼ対応する量の蛋白結合 BzSH が検出された。したがって非対称 Disulfide 型  $B_1$  誘導体と蛋白質 SH 基との反応様式は式 3 のごときものと結論される。

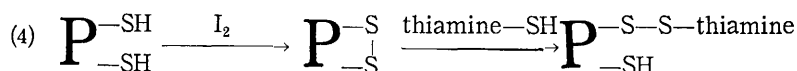


## 第2篇 Thiol 型 $B_1$ 誘導体と蛋白質 S-S 基との反応

### 第1章 Thiol 型 $B_1$ 誘導体とヨウ素酸化卵アルブミンとの反応

アルカリ性で Thiol 型構造をとることが知られている  $B_1$ , または O-Benzoylthiamine (OBT) は

ヨウ素酸化した卵アルブミン(SH基→S-S基)と式4のような機作によって結合することを見出した。

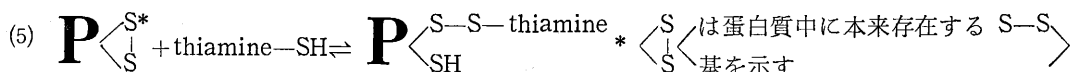


結合物は中性以上の pH で 37°C 1時間の反応で生成し、また反応 pH と結合量との関係は、既知の pH と Thiol 型 B<sub>1</sub> 平衡濃度との関係によく一致することを認めた。OBT は B<sub>1</sub> よりも常に高い結合性を示したが、弱アルカリ域におけるポーログラムを比較した結果、結合性の差異の少なくとも一部は両者の Thiol 型平衡濃度の差によることが明らかとなった。

式1の反応同様、本反応も時間とともに進行し、かつより高い活性化エネルギーを要することがわかった。また、卵アルブミンのヨウ素酸化の前後における変性処理の影響についても、式1の場合と比較して検討を加えた。

## 第2章 Thiol 型 B<sub>1</sub> 誘導体と血清アルブミン S-S 基との反応

S-S 基を多量に含む天然蛋白質、血清アルブミンあるいは γ-グロブリンにたいする Thiol 型 B<sub>1</sub> の反応性を検討し、人工的な蛋白 S-S 基の場合(式4)と同様に結合 B<sub>1</sub> の生成を認めることができたが、その量はごく限られたものに過ぎなかった。

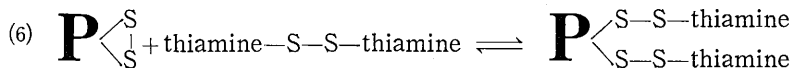


血清アルブミンをシステインによって還元処理すると(S-S基→SH基)結合量は著しく低下したので、蛋白質 S-S 基との反応によるものであることは確実と考えられる。しかし、好氣的条件下では、B<sub>1</sub> の空気酸化により副生する TDS のため次篇式6の反応との区別が困難であった。

## 第3篇 Disulfide 型 B<sub>1</sub> 誘導体と蛋白質 S-S 基との反応

### 第1章 対称 Disulfide 型 B<sub>1</sub> 誘導体と蛋白質 S-S 基との反応

Thiamine disulfide (TDS), O-Benzoylthiamine disulfide (BTDS) と蛋白質 S-S 基との反応性を検討し、高濃度のこれら Disulfide 型 B<sub>1</sub> の存在下比較的長時間を要して式6のような結合物生成反応が進行することを見出した。



すなわち、SH 基を封鎖した血清アルブミンまたはヨウ素酸化した卵アルブミンに大量の TDS を加え pH 9 で24時間温置すると、前者では約4モル、後者では約0.5モル、の蛋白結合 B<sub>1</sub> が検出された。この反応が微量の Thiol 類(Thiol 型 B<sub>1</sub> またはシステイン)により促進され、SH 試薬によって阻害される二つの特徴をもつことを明らかにし、低分子 Disulfide 相互間の反応と同様微量の Thiol によって触媒される Disulfide-Disulfide 交換であると推定した。

### 第2章 非対称 Disulfide 型 B<sub>1</sub> 誘導体と蛋白質 S-S 基との反応

Thiamine benzyl disulfide (TBzD), Thiamine propyl disulfide (TPD) について簡単に試験した結果、上記のような条件下では、対称 Disulfide 型誘導体の場合と類似の反応様式をとることを認めた。

## 第4篇 Thiamine disulfide 類による蛋白ならびに低分子 SH 基の微量定量法

### 第1章 低分子 Thiol 類の定量

得られた知見の一応用面として、Thiamine disulfide (TDS) との反応で生成する遊離  $B_1$  量を指標として蛋白質 SH 基を微量定量する方法を確立するため、まず数種の低分子 Thiol 類について基礎条件を求めた。

0.002~0.2  $\mu$  mole の Thiol をその5~50倍モルの TDS と Ethylenediamine tetraacetate (EDTA) の共存下 pH 6~9, 30°C に5~60分間反応させる条件で安定な定量が可能なることを見出した。また SH 特異性も良好であった。

### 第2章 蛋白質 SH 基の定量

上記の方法を数種の蛋白質に適用した結果、未変性の状態では反応しないものが多かったが、尿素、グアニジン、Na-dodecylsulfate (SDS) などで変性すると定量値を増し、最終的には p-Chloromercuribenzoate (pCMB) による分光滴定法と一致する値を得た。Disulfide 型  $B_1$  としては、TDS のほかに数種の対称型および非対称型誘導体が同様に使用可能であった。また、非対称 Disulfide 型  $B_1$  類は未変性血清アルブミンとの反応性が著しく大きいことを見出した。

以上の実験結果から、ビタミン  $B_1$  誘導体が蛋白質の SH 基あるいは S-S 基との間に三種類の交換反応を起こすことが明らかとなった。すなわち、Disulfide 型  $B_1$  誘導体は蛋白質 SH 基と(式1)、Thiol 型  $B_1$  誘導体は蛋白質 S-S 基と(式4, 5)、また条件によっては Disulfide 型  $B_1$  誘導体と蛋白質 S-S 基も反応して(式6)、いずれも  $B_1$ -蛋白質混合 Disulfide を生成する。ただし非対称 Disulfide 型  $B_1$  誘導体については、蛋白質 SH 基との反応で専ら Alkylmercaptan-蛋白質混合 Disulfide を生成することが見出された(式3)。これら諸反応の性質は低分子 Thiol-Disulfide 間、あるいは Disulfide 相互間のそれと本質的に全く類似することが明らかとなった。なお、附随して検討した Disulfide 型  $B_1$  誘導体を用いる蛋白質 SH 基定量法については、その高い検出感度、広い適用 pH 範囲、限られた反応性などの種々の特徴を明らかにした。

## 論文の審査結果の要旨

本研究は Disulfide 型ビタミン  $B_1$  誘導体と蛋白質との反応ならびに反応成績体の解明を行なったもので蛋白質-SH または-S-S- とビタミン  $B_1$  誘導体との交換反応としてつぎの新知見を得た。

- 1) 変性卵アルブミン、血清アルブミンと O-Benzoylthiamine disulfide (BTDS) または Thiamine disulfide (TDS) との反応により  $B_1$  と蛋白質との結合が起こり Thiamine benzyl disulfide (TBZD) または Thiamine propyl disulfide (TPD) と蛋白質との反応で S-Alkyl 基と蛋白質との結合が起こり、それぞれ  $B_1$  が遊離された。
- 2) Thiamine または O-Benzoylthiamine と -S-S- 結合を有する蛋白質(酸化卵アルブミン、ガンマ・グロブリンその他)とをアルカリ性で反応せしめると  $B_1$ -蛋白質の結合が証明されたが、1)の場合に比べ反応速度がおそい。

- 3) TDS または BTDS と  $-S-S$  結合を有する蛋白質との反応は 1) 2) に比べ最も困難であったが、微量の  $-SH$  化合物 (システインまたは Thiamine) によりアルカリ性で促進され交換反応が起こり  $B_1$  蛋白質の結合が証明された。TBZD または TPD を用いても同様に交換反応が起こるが、S-Alkyl- 蛋白質の結合が  $B_1$  蛋白質の結合より多く生成された。
- 4) 1) で得られた成績を利用して Ethylenediamine tetraacetate の共存下で pH 8 の TDS と反応せしめ遊離する  $B_1$  を測定することにより  $-SH$  基の定量反応とした。システイン, グルタチオン, アルブミン, グロブリン等について測定したところ pCMB 法とほぼ一致する成績を得た。
- 以上の知見によりビタミン  $B_1$  誘導体と蛋白質との反応において 3 種の交換反応が起こり, 反応成績体を解明したのみでなく,  $-SH$  基の微量定量法をも開発したので, 本論文は薬学博士の学位論文として充分価値あるものと認める。