



Title	かんしょの紫色酸性ホスファターゼの精製と性質に関する研究
Author(s)	藤本, 貞毅
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31055
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【5】

氏名・(本籍)	藤 本 貞 毅
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 2983 号
学位授与の日付	昭和48年12月27日
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	かんしょの紫色酸性ホスファターゼの精製と性質に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 上原喜八郎 (副査) 教 授 近藤 雅臣 教 授 岩田平太郎 教 授 三浦 喜温

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

ホスファターゼは非常に古く発見された酵素のひとつであり、その精製法や性状、分布などに関してはよく研究されているが、いくつかのものを除いてはその存在の意義が明らかでない。

ホスファターゼは高等、下等を問わず、動物界にも植物界にも非常に広く存在しており、生命現象のあるところ必ずホスファターゼが存在しているといっても過言ではないと思うと、生命現象に共通した基本的な化学反応に関係しているのではないかと考える。

著者はこのような考えからホスファターゼの基本的な役割を究明することを目的として本研究を計画した。

この計画を実行するに際して研究の対象としては比較的単純な生体であること、1年を通じて比較的一定した状態の組織として容易に入手出来ることを考えてかんしょをとりあげた。

本研究はホスファターゼの生理的機能を究明するに先だち、まずその第1段階としてかんしょのホスファターゼを精製し、その性状を明らかにすることを目的としたものである。

かんしょのホスファターゼ含有量は必ずしも多くないが幸いにこれを超遠心分離的、電気泳動的、カラムクロマトグラフィーの面から均一のたん白質として分離、精製することに成功した。加えてこのホスファターゼが加水分解酵素としては全く例外的なことであるが、紫色のたん白質であることを発見した。精製されたかんしょのホスファターゼの諸性質を検べ、本酵素は物理化学的にも、酵素としても、既に知られている数多くのホスファターゼには認められない特異な性質を持つことを明らかにした。

本 論

〔1〕 紫色酸性ホスファターゼの単離

かんしょ（高系14号）搾汁からアセトン分画、硫酸分画、酸処理を行なったのち、セファデックス G-100カラムによるゲル濾過、ジエチルアミノエチルセファデックス A-50カラムクロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー、さらにジエチルアミノエチルセファデックス A-50カラムクロマトグラフィーを行ない、紫色酸性ホスファターゼを精製単離した。この方法で、かんしょ30kgから最終的に得られた酵素が約7mg、活性収率は搾汁より約5%、比活性は約2,400倍であった。

この酵素標品は電気泳動的にも超遠心分離的にも単一であることが確認された。なお、電気泳動および超遠心分離を行なった際、紫色はたん白質と同じ挙動を示した。

〔2〕 紫色酸性ホスファターゼの分光学的性質

本酵素溶液は明瞭な紫色を呈しており、その中性溶液は555m μ 附近に比較的中広い吸収極大を示した。この吸収極大は0.1N水酸化ナトリウム溶液中においては完全に消失した。さらに、本酵素を尿素変性、ドデシル硫酸ナトリウム変性、および熱変性させたときにも555m μ における吸収が不可逆的に消失した。紫外部においては中性溶液中で281m μ 附近に吸収極大を、292m μ 附近に小さな肩を示した。リン酸緩衝液（pH6.0）中で本酵素の280m μ および555m μ における吸光係数（ $E_{1\%}^{1cm}$ ）はそれぞれ25.2および0.56であった。

紫色が本酵素に本質的なものであるか否か、さらにはこれが酵素活性といかなる関係にあるかという点に関する知見を得るために、本酵素を8M尿素で処理して変性させた際に、酵素活性の低下と555m μ における吸収の減少との関係を検べたところこの両者は平行していることを認めた。これと同様の現象が、Cu²⁺共存下アスコルビン酸を作用させた際にも認められた。このような事実や、本酵素標品についてディスク電気泳動および超遠心分離を行なった際紫色とたん白質とは同じ挙動を示したこと、などから紫色が本酵素に本質的なものであり不純物質によるものでないこと、さらに、本酵素が紫色に着色していることと酵素活性との間には密接な関係があるものと推察出来る。また、紫色は酵素たん白質の変性に伴って不可逆的に消失するという事実から、その紫色の本質が本酵素分子に紫色の色素成分が結合したものであるとするよりむしろ本酵素の持つ高次構造そのものにあることが推察出来る。

〔3〕 紫色酸性ホスファターゼの物理化学的性質

本酵素の分子量はセファデックス G-200カラムによるゲル濾過法により約110,000、沈降平衡法により約105,000と計算された。超遠心分離により $S_{20w}^{0.3\%}$ 値は7.0と求められた。

ドデシル硫酸ナトリウム含有ディスク電気泳動によって本酵素は単一の泳動像を示し、その泳動度が約55,000の分子量を有するたん白質のそれに相当することが分った。

たん白質の分子中に特定の金属を有することによって特有の色を呈するたん白質が多く知られており、本酵素の場合もその着色に金属が関係している可能性があるので発光分析法により金属の有無を検べたところ、本酵素分子中にはマンガン、マグネシウム、ケイソおよびホウソが検出された。

本酵素の等電点は、等電点カラムクロマトグラフィーによって求めると、pH5.0であった。

アミノ酸分析の結果、本酵素のアミノ酸組成はトリプトファン30・リジン39・ヒスチジン36・アルギニン44・アスパラギン酸98・スレオニン62・セリン71・グルタミン酸73・プロリン61・グリシン69・

アラニン40・シスチン2・バリン65・メチオニン19・イソロイシン40・ロイシン59・チロシン76・フェニルアラニン41と決定された。本酵素の1分子あたりのアミノ酸残基数は925であり、この値から分子量が106,568と計算された。

〔4〕 紫色酸性ホスファターゼの酵素としての性質

本酵素は、*p*-ニトロフェニルリン酸、 β -グリセロリン酸、フルクトース-6-リン酸、フルクトース-1,6-二リン酸、2'-アデノシン-リン酸、3'-アデノシン-リン酸、5'-アデノシン-リン酸およびその他のヌクレオシド類のモノリン酸エステルに対して巾広く作用した。またアデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸および無機のピロリン酸にも作用し、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸に対してはその末端のリン酸残基を順次遊離してアデノシンと無機リン酸を与える様に作用することが判明した。なお、ホスホジエステラーゼ活性は持たない様である。

本酵素の最もよい基質となる *p*-ニトロフェニルリン酸を基質としたとき、至適pHは5.8であり、そのときのkm値は $6.8 \times 10^{-5} \text{M}$ であった。また、分子活性度は約70,000であった。

本酵素活性は Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} の重金属イオンおよび F^- 、 PO_4^{3-} 、 AsO_4^{3-} 、 $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ によって強く阻害を受けた。

本酵素分子中には金属としてマンガンおよびマグネシウムが含まれていることが明らかになっているのでこれらの金属が酵素分子中において実際に活性発現に関与しているか否かについて検討した。本酵素を種々のキレート試薬で前処理したところ、明らかに α 、 α' -ジピリジルや *o*-フェナンスロリンによって経時的に失活した。さらに、使用したキレート試薬中最も効果的に本酵素を失格させた *o*-フェナンスロリンを用いて、その失活の可逆性について検討したところ、失活した酵素は Zn^{2+} を添加することによってすみやかにもとの活性に回復し、 Mn^{2+} および Co^{2+} によって大部分の活性を回復した。その他の金属イオンは再活性化には全く影響がなかった。これらの事実は、本酵素がその分子中に活性に必須な金属を含んでいることを示唆するものである。なお、本酵素はその分子中にマンガン含有しており亜鉛やコバルトは含有していないことから、本酵素の活性に必須な金属はマンガンであると推察した。

上に述べたように本酵素はその活性測定時に Hg^{2+} が存在すると著しく阻害を受ける。しかし、本酵素をある濃度範囲内の Hg^{2+} で前処理しておく、すみやかに約3倍にまで活性化された。このような活性化は他の金属イオンではほとんど認められず、 Hg^{2+} に特異的であった。 Hg^{2+} によって活性化された酵素の諸性質を検べたところ、活性化された酵素は555m μ における吸収には何ら変化が認められなかったが、未処理の酵素に比べると熱に対して非常に不安定であり、またその基質特異性に関しても大きな違いがあることが認められた。

結 論

かんしょから紫色に着色した酸性ホスファターゼをディスク電気泳動的、超遠心分離的に単一たん白質として分離することに成功し、紫色が本酵素に本質的なものであり、酵素活性と密接な関係があることを明らかにした。

本酵素は281m μ および555m μ 附近に吸収極大を、252m μ および410m μ 附近に吸収極小を有する。

本酵素は分子中に金属としてマンガン、マグネシウムを含有している。本酵素のキレート試薬によ

る可逆的失活現象から、マンガンは本酵素の活性発現に必須な金属であると推察した。

本酵素はチロシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸を比較的多く含む、pH5.0の等電点を持つ酸性たん白質である。

本酵素の分子量は105,000~110,000であり、約55,000の同じ大きさの分子量を持つ2個のサブユニットから構成されている。

本酵素はモノリン酸エステル結合の他にピロリン酸結合にも作用し、無機リン酸の遊離を触媒する。ホスホジエステル結合には作用しない。

p-ニトロフェニルリン酸を基質にすると、至適pHは5.8、*km*値は 6.8×10^{-5} M、分子活性度は約70,000である。

Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ag^{+} 、 $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{4-}$ 、 PO_4^{3-} 、 AsO_4^{3-} 、 F^{-} は本酵素の強い阻害剤である。 Hg^{2+} で前処理することによって、本酵素は特異的に活性化され、熱安定性および基質特異性に大きな変化を生ずる。

本酵素の紫色の原因に関して、現在のところ次の2つの場合のいずれかであると考えている。

(1) この酵素たん白質が一種の金属酵素(マンガン酵素の可能性がある)であり、分子内に紫色を呈する金属錯塩の構造がある。

(2) チロシン含有量が他のたん白質に比べると多いことから、チロシンが一部酸化されて生じたドーパキノンとチロシンとの間にキンヒドロンの結合が存在し、それが紫色の原因となっている。

論文の審査結果の要旨

本研究はホスファターゼの生理的役割に関する研究の一部としてなされたものであり、かんしょのホスファターゼを分離、精製し、その性状を明らかにすることを目的とした。

かんしょの搾汁よりホスファターゼを分離、精製し、電気泳動的、超遠心分離機による分析法で検べる限り均一と考えられるものを得ることができた。この酵素の溶液は加水分解酵素としては前例のない紫色を呈しており、分子量は110,000、分子量約55,000のサブユニット二本より構成されている。

この酵素を尿素を用いたり、その他の方法で変性させると紫色が消失するとともに活性も失なわれることや構成アミノ酸の分析結果よりチロシンの含有量の特に多いことなど興味ある事実が発見され、その内容は学位論文として十分価値あるものと認められるものである。