



Title	ラット小腸および脳のthiamine diphosphatase活性に関する研究
Author(s)	松田, 敏夫
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32006
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

【6】

氏名・(本籍)	まつ	だ	とし	お	夫
学位の種類	薬	学	博	士	
学位記番号	第	4123	号		
学位授与の日付	昭和53年2月1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	ラット小腸および脳のthiamine diphosphatase活性に関する研究				
論文審査委員	(主査) 教授 岩田平太郎				
	(副査) 教授 上原喜八郎 教授 青沼 繁 教授 近藤 雅臣				

論文内容の要旨

緒言

小腸におけるthiamineの吸収は、反転腸管などを用いた研究から、そのリン酸化、脱リン酸化を介した機構あるいは Na^+ により活性化される代謝的エネルギーに依存した機構により行なわれていると言われている。¹⁾また神経組織においては、電気刺激、神経活性物質により、神経膜分画から脱リン酸化を受けたthiamineが遊離してくることが認められ²⁾⁻⁴⁾、この過程にもthiamineリン酸エステルの脱リン酸化機構が関与していることが示唆されている。

このように、thiamineリン酸エステルの脱リン酸化過程は、それぞれの組織において、重要な役割をしていると考えられているが、未だその機構は酵素レベルで十分説明されるに至っていない。特に、小腸のthiamineリン酸エステルの脱リン酸化酵素に関しては、他の組織のそれと比らべ、今までほとんど研究されてきておらず、その性質は不明である。また、thiamine diphosphataseとnucleoside diphosphataseが同一であることが示されている肝臓⁵⁾以外の組織においては、thiamine diphosphate分解活性(TDPase活性)がどのような酵素により触媒されているのかという点に関しては、今尚明らかでない。

そこで私は、小腸および脳におけるthiamineリン酸エステルの脱リン酸化の生理的意義を明らかにする目的で、それらの組織のTDPase活性について、どのような酵素により触媒されているのか、そしてその生理的意義について検討した。

本論

1. 小腸TDPase活性

(1) TDPase活性とalkaline phosphatase (al-Pase) 活性

人の腸管al-PaseがTDPを水解しうるというEatonらの報告⁶を考慮して、TDPase活性とal-Pase活性の比較検討を行なった。TDPase活性、al-Pase活性のラット小腸における分布を検討すると、両活性とも粘膜層に、またthiamineの能動輸送の認められる十二指腸部位に局存していることが示された。さらに十二指腸粘膜について細胞内分画し検討すると、両活性とも上清分画には見られず、顆粒分画に存在していることが示され、その分布は類似していた。

Sainiら⁷の方法に従い、ラット小腸粘膜からal-Paseの精製を行なうと、TDPase活性もともに精製されてきた。この精製酵素標品を用いさらにal-Pase活性とTDPase活性の比較検討を行なったところ、両活性とも、活性発現にZn²⁺を必要とし、基質に対するKm値はpHにより影響され、また阻害剤に対する反応性も類似していた。さらにTDPase活性は、p-nitrophenylphosphateにより競合的に阻害された。以上の成績から、TDPase活性がal-Pase活性と同一の酵素により触媒されていることが示唆された。さらにこの精製al-Paseは、thiamine triphosphate、thiamine monophosphateをも容易に水解したことから、小腸におけるthiamineリン酸エステルの脱リン酸化過程がal-Paseにより行なわれていると考えられる。

(2) al-Pase活性とCa²⁺-ATPase活性

ビタミンD欠乏動物を用いた実験から、小腸al-PaseはCa²⁺ATPase、Ca²⁺-binding proteinとともに小腸のCa²⁺輸送に関与していると言われている^{8,9}。さらにこのal-Pase活性は、in vivo, in vitroの系でCa²⁺-ATPase活性と同様な変化を示すことから、両酵素活性は同一のものであると考えられている。もしal-Pase活性がCa²⁺-ATPase活性と同一で、Ca²⁺吸収に直接関係しているならば、Ca²⁺吸収機構におけるthiamine代謝の役割を考えられるので、al-Pase活性とCa²⁺-ATPase活性の比較検討をin vitro, in vivoの系で行なった。十二指腸microsomes分画およびbrush border分画のCa²⁺-ATPase活性はcysteine, glutathione等のSH基含有化合物により活性化されたが、al-Pase活性はどのような条件で測定してもcysteineによる活性化はみられなかった。Cysteineにより活性化されるCa²⁺-ATPase活性は、Ca²⁺の能動輸送機構の局在している十二指腸部位においてのみ認められ、この現象がCa²⁺吸収に関与していることが示唆された。Thiamine欠乏により、TDPase活性、al-Pase活性は著明に低下したが、Ca²⁺-ATPase活性、Ca²⁺吸収能は有意な変化を示さなかった。以上al-Pase活性は、Ca²⁺-ATPase活性と異なり、Ca²⁺吸収には直接関係していないことが示された。

(3) Thiamine吸収におけるal-Pase活性の役割

Ethanolがthiamineの腸管吸収を抑制することは古くより知られている。近年、ethanolの経口投与によりラット小腸のthiamineの能動輸送が抑制されることが報告されているので¹⁰、ethanolの小腸各phosphatases活性に対する作用を検討した。0.5g/kg, 2.5g/kgのethanol経口投与により、al-Pase活性は有意に減少したが、Na⁺-K⁺-ATPase活性やCa²⁺-ATPase活性には変化は認められな

かった。

2. 脳TDPase活性

(1) TDPase活性と nucleoside diphosphatase および al-Pase活性

肝臓⁵⁾ および小腸において、 TDPase活性は nucleoside diphosphatase, al-Pase活性と密接に関係していることが示されたので、 脳TDPase活性についても、 まずこれらの観点から検討した。 脳TDPase活性は、 nucleoside diphosphatesにより阻害され、 またIDPによる阻害形式が競合的阻害であったことから、 本酵素活性は肝臓の場合と同様nucleoside diphosphatase活性と同一であることが考えられる。一方、 脳TDPase活性は、 活性発現にZn⁺を必要としないこと、 脳al-Paseの阻害剤であるimidazole, histidineにより影響されず、 またnucleoside monophosphatesによっても阻害されなかったことから、 al-Pase活性とは異なるものと思われる。

(2) 膜phospholipidsによる活性調節

岩田らは¹¹⁾、 脳TDPase活性がchlorpromazineにより著明に活性化されることを認め、 この作用機作の解明から本酵素が“latent”な型で膜に存在していることを示唆している。従ってまず本酵素活性が膜構造に依存していることをさらに明らかにするため、 microsomesをそれぞれのpHで前処置した場合のTDPase活性の変動について検討した。処置pHがアルカリ側になるに従い、 microsomal suspensionの濁度は減少し、 それとともにTDPase活性は増加した。次に膜機能において重要な役割を演じている phospholipidsとTDPase活性の関係を、 phospholipase Cを用い検討した。Phospholipase C処置により、 TDPase活性の V_{max} 値は増加し、 K_m は著明に減少した。またこの処置により熱安定性は低下した。さらに、 TDPase活性が増加する他の処置についても同様に検討し、 phospholipids含量の減少しているアセトン処置酵素において、 K_m 値の減少、 熱安定性の低下を認めた。以上のことから、 膜 phospholipidsは酵素と基質の結合のbarrierとして働いており、 また酵素の安定性を保つのに必要であることが示唆された。

結論

1. 小腸のTDPase活性がal-Paseにより触媒されていることが示され、 このal-Pase活性はthiamineの吸収機構に関与していることが示唆された。
2. 小腸al-Pase活性はCa[#]-ATPase活性と異なり、 Ca[#]吸収には直接関係していなかったが、 Ca[#]-ATPase活性はSH基含有化合物により活性化され、 この現象はCa[#]の能動輸送に関与している可能性が示された。
3. 脳TDPase活性は、 IDPにより競合的に阻害され、 この活性に nucleoside diphosphatase の関与が考えられた。
4. 脳TDPase活性は、 phospholipase C処置により活性化され、 phospholipidsによる本酵素活性の調節の可能性が示された。この成績は、 神経組織のphospholipids代謝が神経活性物質により影響されることを考慮すると、 神経系におけるthiamine代謝の重要性を示唆しているものと考えられる。

References

- 1) G. Rindi and U. Ventura, Physiol. Rev., **52**, 821 (1972)
- 2) Y. Itokawa and J. R. Cooper, Science, **164**, 74 (1969)
- 3) Y. Itokawa and J. R. Cooper, Biochim. Biophys. Acta, **196**, 274 (1970)
- 4) Y. Itokawa, R. A. Schulz and J. R. Cooper, Biochim. Biophys. Acta, **266**, 293 (1972)
- 5) M. Yamazaki and O. Hayaishi, J. Biol. Chem., **243**, 2934 (1968)
- 6) R. H. Eaton and D. W. Moss, Biochem. J., **105**, 1307 (1967)
- 7) P. K. Saini and J. Done, Biophys. Acta, **258**, 147 (1972)
- 8) M. R. Haussler, L. A. Nagode and H. Rasmussen, Nature, **228**, 1199 (1970)
- 9) A. W. Norman, A. K. Mircheff, T. H. Adams and A. Spielvogel, Biochim. Biophys. Acta, **215**, 348 (1970)
- 10) A. M. Hoyumpa, Jr., K. J. Breen, S. Schenker and F. A. Wilson, J. Lab. Clin. Med., **86**, 803 (1975)
- 11) H. Iwata, A. Baba, T. Matsuda and Z. Terashita, J. Neurochem., **24**, 1209 (1975)

論文の審査結果の要旨

本論文は小腸および脳のthiamine diphosphataseの性質について詳細に検討し、thiamine吸収あるいは神経機能におけるthiamineリノ酸エステルの脱リノ酸化過程の重要性を示したものでthiamine代謝の生理的意義の解明に貢献し薬学博士の授与に値するものである。