

氏 名	河 北 範 夫 かわきたのりお
学位の種類	工 学 博 士
学位記番号	論 工 博 第1202号
学位授与の日付	昭 和 54 年 7 月 23 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 ₆ 及びその同族体の新しい生理作用に関する研究： ピリドキサルリン酸のアロステリック因子としての作用とその 応用，ならびに α^4 -Norpyridoxine の抗コクシジウム効果 の解析

	(主 査)			
論文調査委員	教 授 福 井 三 郎	教 授 河 西 三 省	教 授 松 浦 輝 男	

論 文 内 容 の 要 旨

ビタミン B₆ は生命維持のため必須の因子であり，特に B₆ 酵素の補酵素であるピリドキサル・リン酸 (PLP) は生体内で各種アミノ酸代謝に重要な働きをしており，他の補酵素に類をみないほど多彩な反応を触媒していることは周知の事実である。

本論文はビタミン B₆ 及びその同族体の新しい生理作用の発見及び解明に関する研究結果をまとめたものである。内容は2部からなっており，第Ⅰ部は PLP の新しい作用，すなわちその補酵素作用とは異なったアロステリックな活性調節作用に関する研究とその応用についてであり，第Ⅱ部は，B₆ 同族体の中で抗コクシジウム活性を特異的に示した α^4 -Norpyridoxine (4-NOP) の作用機作に関する研究である。

第Ⅰ部では酵素 Nucleoside diphosphatase (EC3.6.1.6) に対して PLP が非常に低い濃度で活性促進を示すことを見だし，ラット肝臓ミクロゾームより本酵素を単一に精製しその作用を詳細に検討した結果，その活性促進がアロステリックな性質のものであることを解明した。また，PLP と酵素の結合様式は，酵素のアロステリック部位に存在するリジン残基の ϵ -アミノ基とのシッフ塩基形成によることを明らかにした。本酵素は ATP などのヌクレオシドトリリン酸によっても活性促進を受けることが知られていたので，2つの因子の相互の関係を検討し，PLP は ATP 等と酵素蛋白上の同じ位置に結合することを示す結果を得た。また PLP をアロステリック部位に NaBH₄ を用いて不可逆的に結合することにより，これまで得られていなかった，アロステリック因子の影響を受けない酵素（脱感作酵素）の調製に成功し，動力学的な立場からのみしか知見のなかった本酵素のアロステリックな性質を酵素の化学修飾の面から証明した。このような PLP の作用はミクロゾームの酵素のみならずミトコンドリアの酵素でも同様に認められた。またミクロゾームの酵素に対する抗体はミトコンドリアの酵素をも完全に阻害した。次いで，これまでの結果を応用して，あらかじめ不溶性担体 (Sephadex) と4位のアルデヒド基以外の位置で結合した PLP を調製して本酵素と反応させた結果，アロステリック部位を介した，安定かつ元の酵素の90%近い活性を維持した固定化酵素を調製することに成功し，その性質を若干検討した。更に Sephadex の

代わりに生体内蛋白を PLP と結合させることを試み、「酵素-PLP-蛋白」の三者結合体を免疫グロブリン G を例として調製し、このものを用いて新規酵素免疫測定法を設定した。

第Ⅱ部では B_6 同族体の中で抗コクシジウム作用を特異的に示した 4-NOP について、動物、微生物及び酵素と多方面から検討を加えた。まず B_6 欠乏ラットを用いて B_6 拮抗作用を検討したが、4-NOP には全く作用が認められなかった。次に微生物系として、自身で B_6 を生合成して増殖する条件、及び外部からの B_6 のみに依存して増殖する条件のいずれをも設定しうる *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 を選び、4-NOP の増殖阻害作用を検討した。その結果後者の系では 4-NOP の阻害作用は既知 B_6 拮抗体に比してかなり弱かったが、前者の系では 4-NOP のみとその初期増殖を特異的に強く阻害する現象を見いだした。この系は、コクシジウムが B_6 を生合成するという報告から考えても興味深く、更にその阻害の機構を検討した。菌体内 B_6 量の測定により、4-NOP は B_6 の生合成には影響を与えないこと、また逆に、4-NOP 存在下に増殖する際には菌体内総 B_6 量は、正常の菌の値より 4~5 倍高い量を必要とすることが判明した。この場合、全 B_6 量の 70% 近くがリン酸のついていない遊離型であることから、4-NOP は B_6 の遊離型からリン酸エステル型への変換を強く抑える点が第 1 の作用部位と考えられた。また 4-NOP の 5'-リン酸エステル型を別途合成しいくつかの B_6 酵素に対する影響をみた結果、いずれの酵素に対しても阻害作用があり、この部分が第 2 の作用部位といえることを示した。またこの化合物の B_6 の取込み阻害作用は既知拮抗体に比して非常に弱い。上記の機構は *S. carlsbergensis* の 4-NOP 適応菌を作成し、その適応化機構の検討結果からも支持された。以上、4-NOP の、既知の B_6 拮抗体と異なる性質をいくつか見だし、本化合物の抗コクシジウム作用の機構に重要な情報を得ている。

論文審査の結果の要旨

ビタミン B_6 は動物が生命を維持するための必須栄養因子であり、その補酵素型のピリドキサル・リン酸 (PLP) はアミノ酸類の多様な代謝反応に関与する酵素群の共通の触媒中心として知られ、構造と活性の関係に関する多くの生化学的研究がある。本論文は、これらの研究と趣きを異にし、ビタミン B_6 及びその同族体の新しい生理作用の発見とその機構の解明を取り扱ったもので、学術的にも実用面でも興味深い以下のような成果をおさめている。

(1) 核酸関連物質やいくつかの補酵素類のような生理活性物質に含まれるヌクレオシド・ジリン酸エステル結合の生成と開裂を触媒する酵素 Nucleoside diphosphatase (EC3.6.1.6) が低濃度の PLP により活性化されることを発見し、その機構として PLP が本酵素の活性中心以外の部位に存在するリジン残基の ϵ -アミノ基とシッフ塩基結合を形成して結合することによるアロステリック作用によることを明らかにした。PLP が酵素のアロステリック部位に結合することによる抑制現象についてはいくつかの例が知られているが、活性化現象を認めたのは本研究が最初である。

(2) 上記の現象を応用することを企て、Sephrose のような高分子と結合した PLP を作って Nucleoside diphosphatase のアロステリック部位と結合せしめることにより、活性化された状態での固定化酵素を調製した。

また免疫グロブリン G-PLP-Nucleoside diphosphatase 三者複合体を同様の方法で調製し、このものを

用いる新規酵素免疫測定法を開発した。

(3) ビタミン B₆ 同族体中、抗コクシウム作用を示す α^4 -Norpyridoxine (4-NOP) の作用機序について、自らビタミン B₆ を生合成して増殖する条件と、外部からのビタミン B₆ のみに依存して増殖する条件とを任意に設定しうる微生物 *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 をコクシウム菌と類似した挙動を示すモデルとして選んで解析した。その結果、4-NOP の作用の第一は細胞内でビタミン B₆ がリン酸エステル化されて活性型になる過程を強く抑制することであり、第二は 4-NOP がリン酸エステル型となったのちビタミン B₆ 依存酵素を阻害することを明らかにした。

以上要するに、本論文は重要な必須生理活性物質であるビタミン B₆ の領域での基礎的にも応用的にも有意義な新規な研究成績をまとめたものであり、学術上ならびに實際上寄与するところが少なくない。

よって、本論文を工学博士の学位論文としてふさわしいものと認める。