

## 磷酸ジエステラーゼに就いて

### 第 I 報 ジフェニール磷酸を特殊的に水解する ジエステラーゼの分離

千葉大学医学部医化学教室 (主任 赤松教授)

吉 浜 博 太  
HIROTA YOSHIHAMA

(昭和 33 年 3 月 15 日受付)

磷酸ジエステルの酵素的な水解は 1926 年 Neuberg 及び Wagner<sup>(1)</sup> により報告されたが、その後、鶴沢<sup>(2)</sup>は蛇毒にジフェニール磷酸を水解するジエステラーゼの存在を証明し、吉田<sup>(3)</sup>は蛇毒中にしばしば微量に混在するモノエステラーゼをカオリン吸着により除きジエステラーゼ液を得たが、他方、豚腎、豚肝自家消化液をアルカリ性反応にて加熱し、モノエステラーゼのないジエステラーゼを分離した。しかし吉田の豚腎ジエステラーゼの作用は十分に強いとはいえず、ジフェニール磷酸終濃度  $M/500$ 、添加酵素液量は試験液の  $1/2.5$  容、pH 7 にて 37°、5 時間後、10% 水解を示す程度であつた。

著者は豚腎 homogenate から中性反応でのモノエステラーゼ加熱不活性法により、ジエステラーゼ液を得たが、その作用はジフェニール磷酸に対し、吉田の豚腎ジエステラーゼに比し約 40 倍強力であつた。

ここに、その分離操作、並びにこの酵素の基質特殊性につき実験した成績を報告する。

#### 実 験 の 部

**A) 基質:** (1) モノフェニール磷酸ソーダ 浅川法<sup>(4)</sup>により合成した。分析 P, 理論値 13.13%, 実験値 13.29%。(2)  $\beta$ -グリセロ磷酸ソーダ 市販品を再結晶した。(3) 5-アデニル酸 General Biochemicals, Inc. の製品。(4) ジフェニール磷酸カリ トリフェニール磷酸より次の如く合成した。トリフェニール磷酸 32.6 g を無水アルコール 100 ml に溶解し、これに 1 N 苛性カリ 100 ml を加え、還流冷却器をつけて pH 8 になるまで煮沸し、冷却後減圧乾固し、無水アルコール約 150 ml に溶解し、エーテル約 50 ml を追加して生ずる結晶を 40 ml の無水アルコールより再結晶し、針状の結晶を得た。結晶水 1 分子、収量 8.5 g, 分析 P 理論値 10.13%,

実験値 9.95%。(5) ビス-ジクロロイソプロピル磷酸カルシウム King 及び Pyman 法<sup>(5)</sup>により合成した。分析 P 理論値 8.30%, 実験値 8.25%。

(6) ジベンジル磷酸 Lossen 法<sup>(6)</sup>により合成した。たゞし、磷酸銀とベンジルクロリドとに混ぜられた溶剤エーテルを蒸発して除いてから熱した。融点 78°。(7) ジエチル 磷酸バリウム Langheld 法<sup>(7)</sup>により合成した。たゞしメタ磷酸の代りに五酸化磷を用いた。分析 Ba 理論値 30.94%, 実験値 31.00%。(8) リボ核酸 酵母リボ核酸 (Merck) を Fletcher 法<sup>(8)</sup>により精製した。分析 P 6.4% で理論値より低かつた。(9) デソキシリボ核酸 Nutritional Biochemical corporation の製品。分析 P 7.4%。(10) リゾレシチン 当教室保存の標本。

**B) 定量法:** (1) フェノール 試験液に等容の 10% 三塩素酢酸を加えて除蛋白した濾液 1 ml をとり、赤松・穴倉法<sup>(9)</sup>で定量した。(2) 無機磷酸 試験液に等容の 16% 三塩素酢酸又は  $1/3$  容の 32% 三塩素酢酸を加えて除蛋白した濾液 1 ml につき、Youngburg-Younrburg 法<sup>(10)</sup>で定量した。但し核酸の場合はウラニル試薬<sup>(11)</sup> (16% 三塩素酢酸 100 ml に 1 g の酢酸ウラニルを溶解したもの) 等容を加えて除蛋白し、濾液中の無機磷酸を定量した。

**C) 酵素液:** (1) 人尿モノエステラーゼ 著者の午後尿を 2 日間流水透析した。本酵素はジフェニール磷酸、ビス-ジクロロイソプロピル磷酸、リゾレシチンを水解しないが、モノフェニール磷酸、 $\beta$ -グリセロ磷酸、5-アデニル酸を水解する。(2) 豚精液自家消化液 豚精液 (農業技術研究所・繁殖科から分与) の遠沈上清を 3 日間、37° で自家消化し、生じた沈澱を遠沈及び濾過にて除き、2 日間流水透析した。本酵素液はモノフェニール磷酸、 $\beta$ -グリセロ磷酸を速かに水解するが、ジフェニール磷酸、

ビス-ジクロロイソプロピル燐酸, ジベンジル燐酸, ジエチル燐酸, リゾレシチンを水解しない。たゞし, リボ核酸からは基質終濃度 0.067%, 酵素量は試験液の 1/6 容, pH 7, 37°, 17 時間で約 40% の無機燐酸を遊離する。

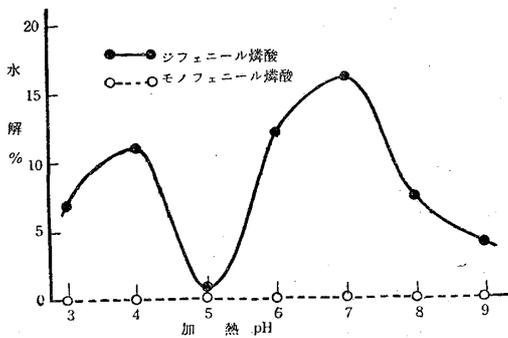
実験結果

I. 豚腎抽出液による実験

1) 豚腎抽出液の製法: 豚腎皮質を 3 容の水と homogenize し, 食塩を終濃度 1% に加え約 5 N の塩酸を滴下して pH 5 となし, 等容の n-ブタノールを加え 10 分間振盪, 1 時間放置後遠沈し, 蛋白及びブタノール混合物の浮揚ゲル層下の水抽出液をとり, 2 日間流水透析, 生ずる少量の沈澱を遠沈除去した。

2) 豚腎抽出液の加熱時 pH とジフェニール燐酸, モノフェニール燐酸水解力減少度との関係: 豚腎抽出液を N/10 塩酸, または苛性ソーダで pH 3 より 9 迄の諸 pH に補正し, 100°, 5 分加熱し, 残存ジエステラーゼ作用を pH 7 にてジフェニール燐酸を基質として検すると, 加熱時 pH 4 と 7 との場合に大であるが, モノフェニール燐酸水解力はいずれの pH 加熱においても消失した。(第 1 図)

第 1 図 豚腎抽出液の加熱時 pH と pH 7 における水解%

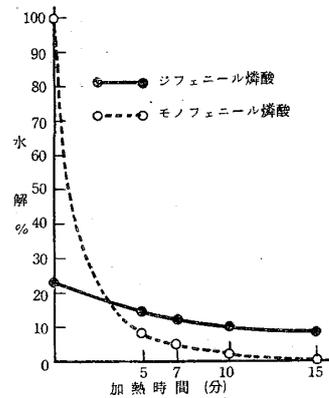


試験液組成: M/400 基質液 1 ml, M/35 Michaelis の酢酸ペロナル緩衝液 (pH 7) 1 ml, 酵素液 1 ml, 水 2 ml; 37°, 1 時間後に遊離フェノール定量。

3) pH 7 における豚腎抽出液の 100° 加熱時間とジエステラーゼ残存量 (ジフェニール燐酸水解%): 15 分加熱の抽出液はジフェニール燐酸を 1 時間で 8% 水解し (遊離フェノール定量), 加熱前の作用力の約 40% を保持して居る。モノフェニール燐酸水解力の消失は, 第 1 図に示す如く 1 時間試験の結果では 5 分加熱で充分であつたが, 20 時間試験の成

績では 15 分加熱しなくてはならない。(第 2 図)

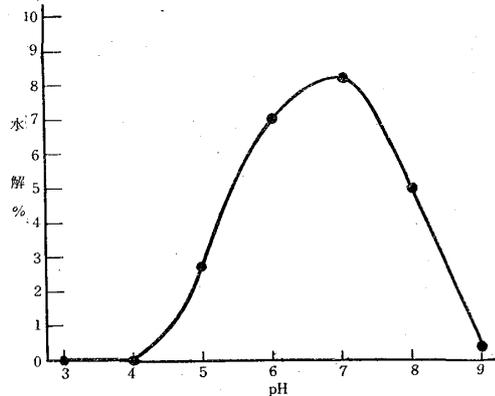
第 2 図 豚腎抽出液の加熱時間と水解%



実験条件は第 1 図と同じ。但し, モノフェニール燐酸は 20 時間値。

4) 豚腎抽出液ジエステラーゼの至適酸度: 豚腎抽出液を pH 7, 100°, 15 分加熱して得られたジエステラーゼのジフェニール燐酸水解は, pH 7 において最高であつた。(第 3 図)

第 3 図 豚腎抽出液ジエステラーゼの pH 活性度曲線



実験条件は第 1 図と同じ。

5) 豚腎抽出液ジエステラーゼの Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, CN<sup>-</sup> による影響: pH 7 にて Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, CN<sup>-</sup> は豚腎抽出液ジエステラーゼに著しい影響を示さなかつた。(第 1 表)

第 1 表 豚腎抽出液ジエステラーゼの Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, CN<sup>-</sup> による影響

	非添加	Mg <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup>	CN <sup>-</sup>
ジフェニール燐酸水解 %	9.0	9.9	9.4	9.0

実験条件は第 1 図と同じ, 但し水 2 ml の代りに M/120 MgCl<sub>2</sub>, M/120 CaCl<sub>2</sub>, または M/2000 KCN 2 ml を加えた。

6) 豚腎抽出液の硫安分劃: 豚腎抽出液の加熱に

第 2 表 硫酸分劃豚腎加熱酵素液及び豚腎抽出液の諸種磷酸エステルに対する作用

基 質	豚 腎 抽 出 液		硫 酸 分 劃 豚 腎 加 熱 酵 素 液		測 定 法	
	水解時間	水 解 %	水解時間	水 解 %		
モノフェニール 磷酸	1	90	20	0	フェノール定量	(a)
ジフェニール磷酸	1	20	1	40	同 上	
ビス-ジクロロイ ソプロピル磷酸	1	5	20	0	無機磷酸定量	(b)
ジベンジル磷酸	1	2	2	0	同 上	
ジエチル 磷酸	1	2	2	0	同 上	
リゾレシチン	3	20	2	0	同 上	(c)
リボ核 酸	4	50	19	0	同 上	(d)
デソキシリボ核酸	18	52	14	0	同 上	

実験条件 (a) 試験液組成は第 1 図と同じ。基質終濃度  $M/2000$ , (b) 試験液組成は第 1 図と同じ。基質終濃度  $M/1000$ ; なお, 加熱酵素液試験では水 2 ml の代わりに豚精液自家消化液 1 ml, 水 1 ml を加えた。(c) 不加熱抽出液での試験液組成は第 1 図と同じ。基質終濃度 0.1%; 加熱酵素液での試験液組成は 0.5% リゾレシチン 0.5 ml, 緩衝液 (第 1 図と同じ) 0.5 ml, 酵素液 0.5 ml, フォスフォリパーゼ B 0.4 ml; 37°, 2 時間後  $N/10$  塩酸を加えて pH 5.6 とし, 100°, 15 分加熱して酵素を不活性化し, 尿モノエステラーゼ 0.5 ml を加え, 水でうすめて 3 ml とし, 37°, 17 時間保つた。なお, フォスフォリパーゼ B は野口<sup>(12)</sup>により家兎肺より調製。0.4 ml のフォスフォリパーゼ B は pH 7, 37°, 1 時間で 0.5% リゾレシチン 0.5 ml の溶血作用を完全に破壊した。なお, フォスフォリパーゼ B 非添加の場合も同様に水解値 0% であつたので表に記載してない。(d) 不加熱抽出液での試験液組成は第 1 図と同じ。基質終濃度: リボ核酸 0.02%, デソキシリボ核酸 0.06%; 加熱酵素液での試験液組成は 0.4% リボ核酸, または 0.3% デソキシリボ核酸 0.5 ml, 緩衝液 (第 1 図と同じ) 0.5 ml, 酵素液 0.5 ml, 水 0.5 ml; 37°, 19 時間後  $N/10$  塩酸で pH 5.6 とし, 100°, 15 分加熱して酵素を不活性化し, 尿モノエステラーゼ 0.5 ml を加え, 水でうすめて 3 ml とし, 37°, 20 時間保つた。なお, 同実験条件にて尿モノエステラーゼは, リボ核酸より 6% の無機磷酸を遊離するので盲検としてひいてある。

より得られたジエステラーゼは, ジフェニール磷酸水解力が 1 時間 8 ~ 9% に過ぎなかつたので, 硫酸分劃による濃縮化を試みた。即ち未透析豚腎抽出液の硫酸 0.45 ~ 0.7 飽和沈澱を分劃前液の約  $1/40$  容の水に溶かし, 2 日間流水透析し, 生ずる少量の沈澱を遠沈除去し, pH 7 で 100° 加熱するとモノエステラーゼは 5 分後に消失したが (20 時間試験), なお諸

ジエステルのうち, ジフェニール磷酸のみを 1 時間で 40% 水解する酵素が残つた。第 2 表には加熱しない透析豚腎抽出液の作用と対比してある。

II. ハブ毒酵素液の諸種磷酸エステルに対する作用: ハブ毒酵素液はジフェニール磷酸, リボ核酸を水解するが, ビス-ジクロロイソプロピル磷酸には作用しない。(第 3 表)

第 3 表 ハブ毒酵素液の諸種磷酸エステルに対する作用

基 質	ジフェニール磷酸	ビス-ジクロロイ ソプロピル 磷酸	リボ核 酸
test pH	(5 時間値)	(20 時間値)	(3 時間値)
5.6	12%	0%	20%
9.0	14%	0%	52%

試験液組成は  $M/400$  ジフェニール磷酸,  $M/400$  ビス-ジクロロイソプロピル磷酸または 0.1% リボ核酸 1 ml, 緩衝液 (第 1 図と同じ, 但し pH 9, または 5.6) 1 ml, 0.5% ハブ毒酵素液 1 ml; 但し, ビス-ジクロロイソプロピル磷酸, リボ核酸の場合は緩衝液に溶かしたハブ毒 1 ml と, 尿モノエステラーゼ 1 ml を加えた。ジフェニール磷酸のみフェノール定量, 他は無機磷酸定量。

III. ビス-ジクロロイソプロピル燐酸の豚諸臓

器抽出液による水解: 上述の様に, 硫安分劃豚腎加熱酵素液もハブ毒酵素液もジフェニール燐酸を水解するが, ビス-ジクロロイソプロピル燐酸を水解しない。しかるに, 豚腎抽出液はビス-ジクロロイソプロピル燐酸をジフェニール燐酸の 1/4 程度ながら水解する。以上の点よりビス-ジクロロイソプロピル燐酸水解酵素の存在が推定される。そこで, 豚諸臓器抽出液(その製法は腎の場合と同じ)に精液モノエステラーゼを混じて, ビス-ジクロロイソプロピル燐酸からの無機燐酸生成を調べた。(第4表)

第4表 ビス-ジクロロイソプロピル燐酸の豚諸臓器抽出液による水解

臓器名	肺	脾	腎	大脳	小腸粘膜
水解%	87	10	3	0	0

実験条件: 第2表(b)の加熱酵素液の項と同じ。但し18.5時間値。

IV. 豚肺抽出液による実験

1) 豚肺抽出液の諸種燐酸エステルに対する作用: 第4表の成績により, 豚肺抽出液のビス-ジクロロイソプロピル燐酸水解作用が顕著であつたので, 諸種燐酸エステルに対する作用を調べた。この実験では第5表に示される如く, 豚肺抽出液にモノエステラーゼが含まれているので無機燐酸を測定した。豚肺抽出液は豚腎抽出液とは逆に, ビス-ジクロロイソプロピル燐酸をジフェニール燐酸より速かに水解した。

2) 豚肺抽出液の硫安分劃: これは硫安分劃豚腎酵素液と同様に未透析豚肺抽出液から調製した。(但し塩酸の代わりに約30%酢酸使用)。この酵素液の諸種燐酸エステルに対する作用は第6表の如くで, 硫安分劃前と同様, ビス-ジクロロイソプロピル燐酸をジフェニール燐酸よりも速かに水解した。またpH.7にて100°, 10分加熱した場合は, ジフェニール燐酸のみを水解したがその作用は弱く, 20時間で30%水解であつた。本表には硫安分劃豚腎酵素液と対比してある。

第5表 豚肺抽出液の諸種燐酸エステルに対する作用

基質	モノフェニール燐	β-グリセロ燐	ジフェニール燐	ビス-ジクロロイソプロピル燐
水解%	40	26	7	25

試験液組成第1図と同じ。但し, 基質終濃度 M/1000, 1時間値。

第6表 硫安分劃豚肺酵素液及び硫安分劃豚腎酵素液の諸種燐酸エステルに対する作用

基質	硫安分劃豚腎酵素液				硫安分劃豚肺酵素液			
	加熱前		100° 5分加熱後		加熱前		100° 10分加熱後	
	水解時間	水解%	水解時間	水解%	水解時間	水解%	水解時間	水解%
モノフェニール燐	1	96	20	0	1	100	20	0
β-グリセロ燐					1	100	20	0
ジエチル燐	1	6	2	0	2	5	20	0
ジベンジル燐	1	6	2	0	2	31	20	0
ジフェニール燐	1	78	1	40	2	69	20	30
ビス-ジクロロイソプロピル燐	1	16	20	0	2	92	20	0

実験条件 (A) 腎酵素液: 第2表(a), (b) 項と同じ。(B) 肺酵素液: 試験液組成 M/400 基質液 1.0 ml, 緩衝液(Aと同じ) 1.0 ml, 酵素液 0.5 ml, 水 0.5 ml; 実験温度 37°, 無機燐酸定量。但し, 加熱酵素液のジエステルの項は水の代わりに精液自家消化液 0.5 ml を用いた。

## 考 按

磷酸酵素はその基質特殊性により、磷酸モノエステラーゼ、磷酸ジエステラーゼ、ピロ磷酸酵素などに分類されている。最近 Bamann<sup>(13)</sup>は、ジフェニール磷酸とモノフェニール磷酸とは単一酵素により水解され得ると論じ、ただ、酵素起原によつてはジフェニール磷酸に対する酵素の親和性が甚だ低く、ジエステル水解が陰性なる場合があると主張している。しかしすでに、蛇毒から吉田<sup>(3)</sup>、Gulland 及び Jackson<sup>(14)</sup>、Butler<sup>(15)</sup>により、また豚腎から吉田<sup>(3)</sup>により、ジフェニール磷酸を水解し、モノフェニール磷酸には不活性な酵素が得られて居り、また本報告はモノエステラーゼを含まない強力なジエステラーゼの存在を示した。これとは逆に、モノフェニール磷酸を水解し、ジフェニール磷酸に不活性な酵素の存在は既によく知られているから、ジエステラーゼとモノエステラーゼが異なることは明白である。

吉田の豚腎ジエステラーゼは主としてジパラニトロフェニール磷酸を基質として研究された。そのジフェニール磷酸水解力は低かつた。

これに比して、著者が豚腎抽出液の硫酸分劃、加熱処置によつて精製したジエステラーゼ液は、ジフェニール磷酸に対し吉田の豚腎ジエステラーゼの約 40 倍強力であつた。

さて、すべての磷酸ジエステルは同一磷酸ジエステラーゼにより水解されるであらうか。著者の精製ジエステラーゼは、フェノール系 OH 化合物たるジフェニール磷酸のみを水解し、脂肪族アルコールの磷酸ジエステルたるビス-ジクロロイソプロピル磷酸、ジエチル磷酸、リゾレシチン、リボ核酸、デソキシリボ核酸を水解しない。なお、ジベンジル磷酸が水解されないのは、この化合物がフェノール系磷酸ジエステルに属さないからである。

なお、ジフェニール磷酸、ビス-ジクロロイソプロピル磷酸の水解される速度を 2~3 の酵素液にて比較してみると、加熱前豚腎酵素液ではジフェニール磷酸 > ビス-ジクロロイソプロピル磷酸である。これに反し加熱前豚肺酵素液では、ビス-ジクロロイソプロピル磷酸 > ジフェニール磷酸にて、その関係が逆になつている。ハブ毒酵素液は精製豚腎ジエステラーゼ液と同様にジフェニール磷酸を水解するが、ビス-ジクロロイソプロピル磷酸を全く水解しない。以上の点よりビス-ジクロロイソプロピル磷酸

酸水解酵素の存在が考えられるが、この酵素の分離は未だ成功していない。

核酸とその部分水解物との水解に関して Heppel 及び Hilmoe<sup>(16)</sup>はジヌクレオチッドを水解し、モノヌクレオチッドを水解しない酵素を仔牛の脾及び小腸より分離し、この脾酵素はリボ核酸、core をも水解するが、ジフェニール磷酸に対する作用が検査されていないので、著者の精製豚腎ジエステラーゼ液と直接比較することは出来ない。しかし、著者の精製豚腎ジエステラーゼ液はジフェニール磷酸を水解するが核酸には不活性であり、また著者の第 II 報実験によれば、豚肺から分離された核酸水解酵素はジフェニール磷酸に作用しない。

リゾレシチンはハブ毒ジエステラーゼ<sup>(17)</sup>、タカジエステラーゼ<sup>(17)</sup>により水解され、またグリセロ磷酸コリンは細菌<sup>(18)</sup>或は鼠肝<sup>(19)</sup>のグリセロ磷酸コリンジエステラーゼにより水解されるという。著者の実験では豚腎抽出液はリゾレシチンを水解するが、これから精製したジエステラーゼ液ではその水解が認められなくなる。故に、このリゾレシチンとグリセロ磷酸コリンに作用するジエステラーゼは、ジエチル磷酸など脂肪族ジエステルに作用する酵素と同様に、著者精製ジエステラーゼとは異なると思われる。

## 総 括

ジフェニール磷酸のような芳香族磷酸ジエステルを特殊的に水解する磷酸ジエステラーゼを、豚腎 homogenate から、硫酸分劃、pH 7 加熱法により分離した。本酵素液はモノエステラーゼを欠くから、ジフェニール磷酸よりフェノールを遊離するが、無機磷酸を遊離しない。至適 pH は 7 である。その作用力はジフェニール磷酸終濃度  $M/2000$ 、酵素量  $1/5$  容、pH 7 にて 37°、1 時間で 40% 水解である。Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>、CN<sup>-</sup>により賦活も阻害も受けない。この酵素液はビス-ジクロロイソプロピル磷酸、ジベンジル磷酸、ジエチル磷酸、リゾレシチン、リボ核酸、デソキシリボ核酸を水解しない。これらに作用する酵素は芳香族磷酸ジエステル水解酵素とは異ると推定される。

本研究は文部省から赤松教授に与えられた科学研究費により、赤松教授の指導の下に行われた。こゝに深く感謝する。

## 文 献

- (1) **Neuberg, C. & Wagner, J.:** *Biochem. Z.*, **171**, 485, 1926
- (2) **Uzawa, S.:** *J. Biochem.*, **15**, 19, 1932
- (3) **Yoshida, S.:** *J. Biochem.*, **34**, 23, 1941
- (4) **Asakawa, K.:** *J. Biochem.*, **11**, 143, 1929
- (5) **King, H. & Pyman, F. L.:** *J. Chem. Soc.*, **105**, 1238, 1941
- (6) **Lossen, W.:** *Ann.*, **262**, 211, 1891
- (7) **Langheld, K.:** *Ber. Chem. Ges.*, **44**, 2081, 1911
- (8) **Fletcher, W. et al.:** *J. Chem. Soc.*, **30**, 1944; 江上不二夫: 核酸及び核蛋白質, 上巻, 222, 昭和26 (1951)
- (9) **奥倉:** *日生化*, **19**, 145, 昭和22 (1947); **Akamatsu, S.:** *J. Biochem.*, **39**, 203, 1952
- (10) **Youngburg & Youngburg:** *J. Lab. Clin. Med.*, **16**, 158, 1930
- (11) **Mac Fadyen, D. A.:** *J. Biol. Chem.*, **107**, 297, 1934
- (12) **Noguchi, S.:** *J. Biochem.*, **36**, 113, 1944
- (13) **Bamann, E. & Riehl, J.:** *Biochem. Z.*, **327**, 136, 1955
- (14) **Gulland, J. M. & Jackson, E. M.:** *Biochem. J.*, **32**, 590, 1938
- (15) **Hurst, R. O. & Butler, G. C.:** *J. Biol. Chem.*, **193**, 91, 1951
- (16) **Heppel, L. A. & Hilmo, R. J.:** *Methods in Enzymology* (ed. Colowick, S. P. & Kaplan, N. O.), **2**, 565, 1955
- (17) **Udagawa, H.:** *J. Biochem.*, **22**, 323, 1935
- (18) **Hayaishi, O.:** *Methods in Enzymology* (ed. Colowick, S. P. & Kaplan, N. O.) **1**, 668, 1955
- (19) **Dawson, R. M. C.:** *Biochem. J.*, **62**, 689, 1956