

燐酸モノエステラーゼの賦活と阻害

千葉大学医学部医化学教室(主任 赤松 茂教授)

村 越 善 衛

YOSHIE MURAKOSHI

昭和31年1月12日受付

燐酸モノエステラーゼⅢ(アルカリ性フォスファターゼ)のアポ酵素は Mg^{++} が存在する時、アミノ酸或はペプチドにより活性化されてホロ酵素を形成するが⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾, このホロ酵素はそれ等賦活剤の過剰により不活性化され、この賦活能発現には原則として遊離のアミノ基、カルボキシル基の存在を必要とされた。しかし proline に賦活作用があり、ヒスタミンはヒスチジンに比敵する賦活と阻害能を示し⁽¹⁾⁽²⁾, 他方ヒスチジン、チロジンのアチル体、さらにイミダゾールにもホロ酵素阻害作用あることが証明されたから⁽⁴⁾, 著者はフォスファターゼ賦活、阻害作用にアミノ基、カルボキシル基のほか、なおイミノ基、第3級アミノ基及び hydroxy-phenyl 基も関係ある事を推論した。これを検討する為にイミノ酸、アミン及び含Sアミノ酸等に就き行つた実験成績を報告する。

実 験

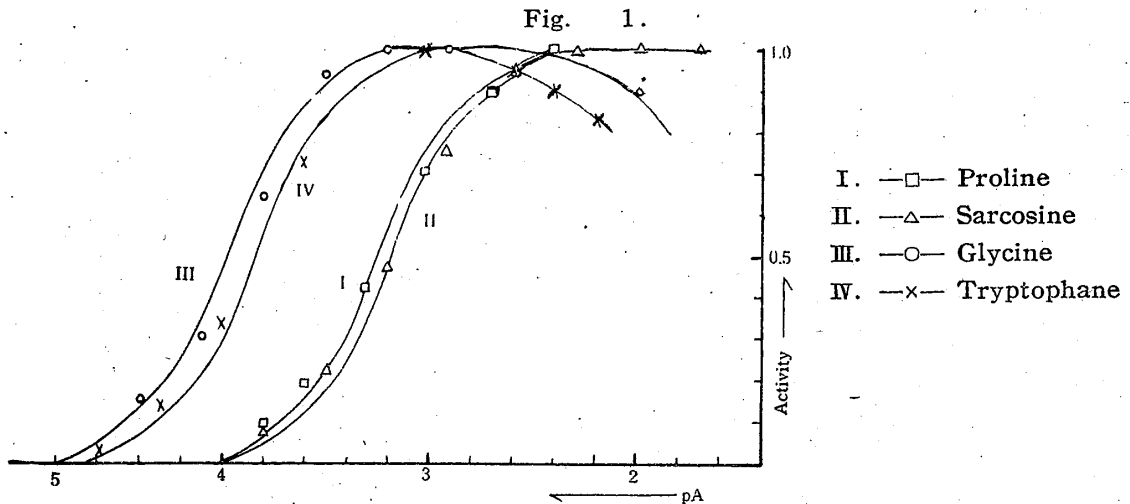
基質は前報の如くパラニトロフェノール燐酸ソーダ⁽⁵⁾, 供試した賦活剤は主として市販の標品であるが, Benzoyl-histamine は O. Gerngross⁽⁶⁾の方法により histamine を benzoylchlorid で benzoyl 化したもの(融点 147°) 4 (5)-hydroxymethyleimidazole は本学薬学部村越勇氏から提供されたもので, Tothier and Darby の方法⁽⁶⁾に依り果糖, フォルムフルデヒド, アンモニヤ, 塩基性炭酸銅から得られる銅複合体を経て得られた hydroxymethyle-imidazole picrat (融点 205°)を塩酸塩(融点 108°)としたものである。

アポ酵素の調製法, 試験液組成及び実験条件は, 前報⁽⁴⁾の通りであるが遊離パラニトロフェノールの定量には日立の electro-spectro-photometer (波長 400 mμ, 波長巾 0.06 mμ) を用いた。

実験結果

イミノ酸である proline にアポ酵素賦活能のある事は既に小林⁽¹⁾により報告されている。proline の賦活を改めて精しく検しこれを pA 活性度曲線として描くと、一般アミノ酸と同じく二次S型曲線を示した(図1曲線I)。ついでメチル化アミノ酸たる monomethylglycine (sarcosine) が同様に賦活能を有し、pA 活性度曲線はまた二次S型(図1曲線II)であることを知つたが、これを glycine の

曲線(図1曲線III)と比較するとその位置は pA 約 0.8 右にずれ、アミノ基のモノメチル化は賦活能を低下せしめることを知る他方 histidine, histamine の賦活作用が他アミノ酸に比して著しく大であることはイミダゾール基の存在に関連することが明らかである。小林は imidazole-酢酸, imidazol 乳酸, urocanin 酸, imidazole に弱い補酵素能があることを報告しているが、この度 imidazole に就き pA 活性度曲線を求め図2曲線IIを得た。hydroxymethylimidazole も二次S型上昇部と一次S型下降部とからなる pA 活性度曲線を与えた(図2曲線I)。この imidazol と hydroxymethylimidazole との両曲線を見るに、その極大値は相異なるがいづれも上昇二次曲線と下降一次曲線とから成ることは相等しく、また imidazole 及び hydroxymethylimidazol の阻害曲線(下降部)は、この化合物がホロ酵素を阻害する場合の一次曲線(図2曲線B, 既報及び曲線A)と夫々重なることが注目される。imidazole 及び hydroxymethylimidazole の賦活曲線と既報の acetylhistidine のホロ酵素阻害曲線(図2曲線C)とから推して acetylhistidine にも弱い乍ら補酵素作用の存在が期待されるから、この化合物のアポ酵素賦活作用を詳細に検すると図2曲線IIIの如き pA 活性度曲線が得られた。而もその上昇部は imidazole の pA 活性度曲線上昇部と、



稀釈 Apo 酵素液 1 ml, $M/10$ pH 9 Veronal-HCl 緩衝液 2 ml, $M/20$ $MgCl_2$ 1 ml, 賦活剤 1 ml, 蒸留水 3 ml を前加温後, $M/400$ p-Nitrophenolphosphate 2 ml を添加, $37^\circ C$ に於ける 1 時間値。
pA; 賦活剤終濃度の逆数の対数値。

Activity; $M/8000$ Histidine 添加にて活性化した酵素の極大活性度を 1.0 とした時の比活性度。

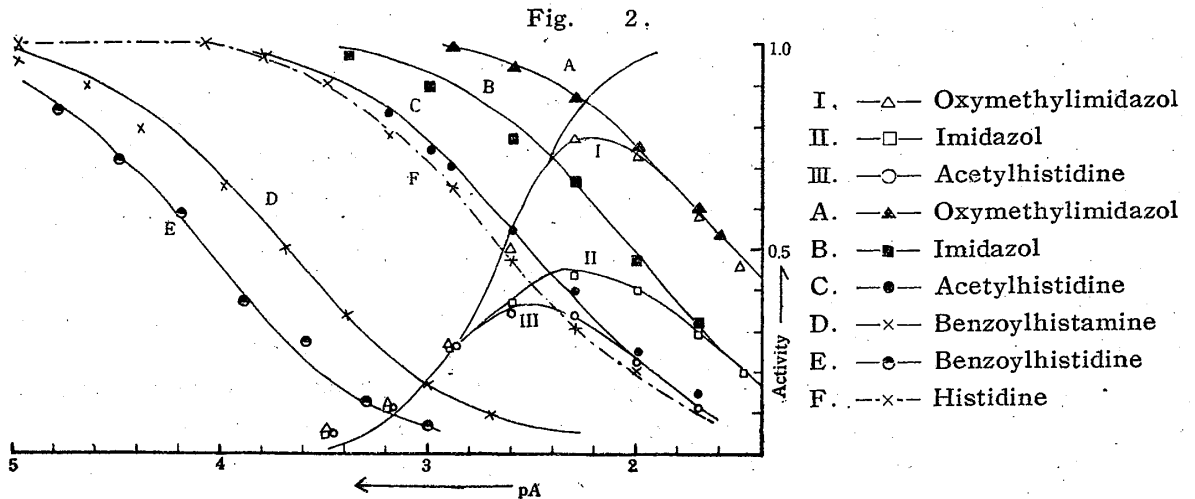
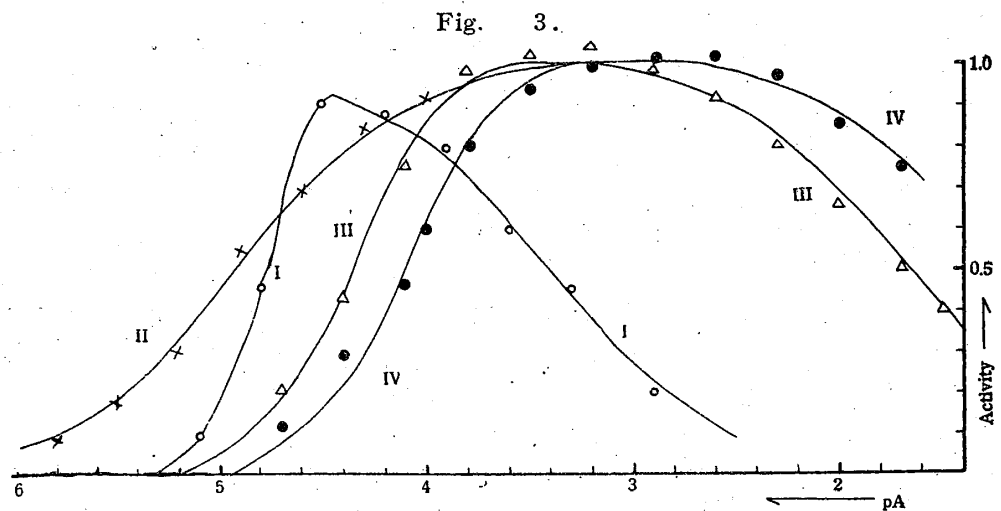


Fig. 1: 参照

但し A~F 曲線は $M/8000$ Histidine, $M/200$ mg^4 にて極大に活性化した酵素に, 上記諸種化合物を添加した時の阻害曲線である。



詳細は Fig. 1. 参照。

その下降部は既報の acetylhistidine の阻害曲線と全く重なることが認められた。

既報の如く benzoylhistidine には強いホロ酵素阻害作用があるが, benzoylhistamine に就き実験すると求められた pA 阻害度曲線は一次 S 型 (図 2 曲線 D) で, 曲線の位置は benzoylhistidine のそれ (図 2 曲線 E 既報) と大体近似している。benzoylhistamine は benzoylhistidine と同じくアポ酵素賦活作用を示さない。

imidazol 及び hydroxymethylimidazol, 他方 proline が活性なる点からみて遊離アミノ基のほかにインドール環 NH 基を有する tryptophane に高いアポ酵素賦活能の存在が予想されるから, その pH 活性度曲線を求めたがその曲線の型も位置も殆んど glycine のそれと一致した (図 1 曲線 IV)。

次に前報阻害実験成績⁽⁴⁾によれば acyl amino 酸の中で阻害作用を示したのは acylhistidine のほかは acyltyrosine だけであつたので tyrosine の hydroxyphenyl 基に着目して tyramine に就いてその補酵素作用を検したがこれを殆んど認めなかつた。即ち 0.001 M で 4.2%, 0.004 M にて 7% 賦活に過ぎない。

第四級アンモニウム塩基に就いては choline に補酵素作用のないことを小林は報告している。その終濃度を変えて詳細に調べたが依然賦活能も阻害能も認められなかつた。betaine (trimethylglycine) でも同様であつた。

含 S amino 酸 cysteine が強い阻害剤であるとの報告⁽⁸⁾⁽⁹⁾に反し, 小林はこれに補酵素作用のあることを認めている⁽¹⁾ので cysteine のアポ酵素賦活, 生成ホロ酵素阻害関係を詳細に検討してみると図 3 曲線 I に示されている様に, 低濃度で賦活能を有し, 次いで濃度増加と共に阻害作用が現われる。pA 活性度曲線の上昇部は三次 S 型で下降 (阻害) 部は一次曲線を示した。

cysteine は実験中空気によつて酸化される可能性があるので cystine に就いて賦活能をみると pA 活性度曲線上昇部は一次 S 型でその位置は cysteine に近かつた (図 3 曲線 II)。活性度が 1.0 に達する或はそれより下降する cystine 濃度範囲の実験は溶解度の関係上不能であつた。

SH 基が methyl 基でふさがれている methionine では pA 活性度曲線上昇部は二次 S 型で cysteine に比し右に動き賦活能の低下を示し (図 3 曲線 III) 下降部曲線 (一次 S 型) の位置から阻害能も

低いことを知つた。

cysteine SH 基の酸化された cysteine 酸にも賦活作用があり, その賦活関係を示す pA 活性度曲線は二次 S 型であつた (図 3 曲線 IV)。

考 察

アルカリ性フォスホモノエステラーゼのアポ酵素を一般 amino 酸のほか proline, sarcosine も賦活するから imino 基も賦活に関係すると云い得る。glycine に比し, sarcosine の補酵素作用は proline と同様に弱い。glycine の濃度を 0.01 M に高めると 10% 阻害が見られるが, その濃度の sarcosine には阻害作用がない。この成績は O. Bodansky⁽⁶⁾が骨 phosphatase 50% 阻害に要する濃度は glycine 0.030 M, glycine ethylester 0.059 M, monomethylglycine 0.37 M, dimethylglycine 1.6 M と報告していることに関連を有するであろう。

imino 基も弱いながら amino 基に代つて補酵素能に関係するが, amino 基, carboxyl 基以外に indole 核を有する tryptophane に期待された様な強補酵素能がみられないことから imino 基の存在は amino 基, carboxyl 基による補酵素能を附加的に強化するものではないと云えよう。

choline, betaine に賦活と阻害能を欠くことから窒素は四級 ammonium 塩基の形となると全く無効となる。

hydroxymethylimidazole, imidazole, acetylhistidine の pA 活性度曲線 (図 2 I, II, III) を相互に比較すると極大値は相異なるが, 各曲線はいづれも imidazole の賦活 (上昇) 曲線と各化合物による合成 holo 酵素阻害 (下降) 曲線との組合せにより構成せられると判定されるから, imidazole 化合物はその側鎖に遊離 amino 基の欠除する限り殆んど相等しき賦活能を示し, 他方それ等の阻害能の強さは側鎖構造に影響されるものと思われる。これから推察すると benzoylhistidine, benzoylhistamine が全く賦活能を示さない理由は, それ等の imidazole 核に基く賦活能が側鎖の強化阻害能 (曲線 D, E) に被はれて現われない為と解される。histidine の強補酵素能が amino 基と imidazole 基に基づくことは, histamine の強補酵素能, urocanic acid, imidazole 酢酸, imidazole 乳酸⁽¹⁾或は imidazole の弱賦活能から推定しうる。他方 imidazole 化合物の阻害作用は imidazole 基に関係し, histidine と acetylhistidine とが略相等しい阻害曲線 (図 2 C, F) を示すこと (一般の

amino 酸では amino 基は阻害に必須である), benzoylhistidine と benzoylhistamine の阻害曲線 (図2, E, D) が互に近接していることから側鎖はその作用を強め或は弱めるに過ぎないと言えよう。

なお, Cysteine の賦活能は強く, pA 活性度曲線の上昇部は三次S型である。これを methionine cysteine 酸が一般 amino 酸と同じく二次, cystine

が dipeptide と同じく一次 S 型を示すのに対比すると, この cysteine の特殊な能度は sulfhydryl 基のあることに依るものと考えられる。なお, cysteine の賦活と阻害能は SH 基が methyl 化され, 又は sulfon 化されると弱くなる。

amino 酸, amine, sulfhydryl 化合物等による賦活及び阻害の機作に関する検討は次報にゆずる。

総 括

1. アミノ酸が Mg^{++} の存在する時, アルカリ性モノエステラーゼのアポ酵素と結合してホロ酵素を生成すると同じく, イミノ酸にもこの機能がある。
2. ハイドロキシ・メチル・イミダゾール, イミダゾール及びアセチル・ヒスチジンはアポ酵素賦活作用とホロ酵素抑制作用をもつ。
3. ベンツォイルヒスタミンはベンツォイルヒスチジンに比敵する阻害作用を有する。
4. チラミンの補酵素作用は甚だ弱い。
5. チスチン, チスチン, メチオニン及びチスチン酸も又補酵素作用とホロ酵素阻害作用とを示す。

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, 赤松教授の指導の許に行われた。ここに深く感謝する。

文 献

- 1) 小林: 日生化, **19**, 129 (1947); 赤松・小林: *Enzymologia*, **15**, 154 (1951)
- 2) 赤松・麻生: *Enzymologia*, **15**, 166 (1951); 赤松: 生化学, **23**, 93 (1951); 麻生: 千葉医会誌, **29**, 33 (1953)
- 3) 小林恒一: 日生化, **19**, 129 (1947); 麻生: 千葉医会誌, **29**, 116, 121 (1953); 赤松・麻生: *Enzymologia*, **16**, 231 (1953-1954)
- 4) 村越: 千葉医会誌, **30**, 223 (1954)
- 5) 大森: *Enzymologia*, **4**, 217 (1937)
- 6a) O. Gerngross: *Z. physiol. Chem.*, **108**, 60 (1919)
- 6b) Toth, J. R., Darby, W. J.: *Organic syntheses*, **24**, 64.
- 7) Bodansky, O.: *J. biol. Chem.*, **165**, 605 (1946)
- 8) Waldschmidt-Leitz, E., Scharikova, A., Schäffner, A.: *Z. physiol. Chem.*, **214**, 75 (1933)
- 9) Edlbacher, S., Kutscher, W.: *ibid.*, **207**, 1 (1932)