トリオースレダクトン-2-リン酸
エステルに対するアルカリホスファ
ターゼの作用†

篠原和毅*, 内野文弘**, 江藤正義***,
曾 耀 崑****, 大村浩久*

* 九州大学農学部食糧化学工学科食糧化学教室

** 合同酒精㈱ *** 姫路短期大学

**** 中国文化学院家政学研究所

Effect of Alkaline Phosphatase on Triose
Reductone-2-Phosphate†

Kazuki SHINOHARA,* Fumihito UCHINO,**

Masayoshi ETO,*** Yaw-Kun TSENG,****

Hirohisa OMURA*

* *Institute of Food Chemistry, Dept. of Food
Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka*

** *Godō-Shusei Co., Ltd., Nishinomiya, Hyogo*

*** *Himeji Women's College, Himeji, Hyogo*

**** *Institute of Home Economics, College
of Chinese Culture*

The action of alkaline phosphatase on triose reductone-2-phosphate (TR-2-P) was examined.

It was found that TR-2-P was hydrolysed by alkaline phosphatase. The rate of the hydrolysis was about 20% at 37°C for 1 hr. The Km value of TR-2-P was 2.3×10^{-3} M and about the same as that of *p*-nitrophenyl phosphate.

Furthermore, it was confirmed from sedimentation analysis that TR-2-P recovered the DNA-splitting activity in the presence of alkaline phosphatase.

These results show that the phosphorylation of reductones is at least one of the available methods considering the application of them to the living body.

(Received January 6, 1977)

著者ら¹⁾⁻¹⁶⁾はこれまでに、食品に含まれる数種のレダクトンが抗腫瘍能ならびに核酸切断能を有することを明らかにし、これらの諸機能の発現がレダクトン構造に基づくことを確かめてきた。しかしこれらレダクトン類は一般に不安定な化合物であり、とくに中性あるいは

アルカリ性領域においては比較的すみやかに酸分解し、それらの機能を失う。したがってこのようなレダクトン類の機能を有効に利用するためには、それらを安定化し、その活性を持続させたまま作用部位に到達させ、そこでその活性を再現させることが最も望ましい。このような観点から著者ら¹⁷⁾はレダクトン構造のリン酸化を試み、新リン酸化剤 2-メチルチオ-4H-1,3,2-ベンゾジオキサホスホリン-2-オキサイド (MTBO) を用いてトリオースレダクトン (TR) のリン酸化物 (トリオースレダクトン-2-リン酸エステル, TR-2-P) を得た。この TR-2-P は TR に比し、きわめて安定な化合物であり、ほとんど褐変しない。またエンジオール基の一つの OH 基がリン酸基で修飾されたために還元力は TR の 1/12 に減少し、デオキシリボ核酸 (DNA) 切断能も著しく低下した。しかも生体内ではホスファターゼが存在していることから、それによって TR-2-P が加水分解され、もとの TR に変換することが予想され、したがってレダクトン類のリン酸化はとくに生体に適用する場合、少なくとも好ましい方法の一つであると考えられる。そこで本研究においては TR-2-P に対するアルカリホスファターゼ (Orthophosphoric monoester phosphohydrolase, E.C. 3.1.3.1) の作用と TR-2-P の機能の回復について検討した。

実験材料および方法

1. 試 薬

TR-2-P は常法により新リン酸化剤, MTBO を用いて合成した¹⁷⁾。アルカリホスファターゼ (ウシ腸由来) は Miles-Seravac 製品を使用した。その他の試薬は和光純薬工業製特級を用いた。

2. 酵素反応

TR-2-P のアルカリホスファターゼによる加水分解の時間的変化は次のようにして求めた。

75 μ g/ml アルカリホスファターゼ溶液 0.5 ml, 0.36 mM TR-2-P 溶液 0.5 ml, 賦活剤として 10 mM 酢酸マグネシウム溶液 0.25 ml および 120 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.2) 0.25 ml, 計 1.5 ml を混合し, 37°C で保温した。所定の時間に20%トリクロル酢酸 0.75 ml を加えて反応を停止したのち, Takemura ら¹⁸⁾の方法を用いて加水分解によって生じたリン酸を定量した。反応停止液 2.25 ml に1%アスコルビン酸-0.5%モリブデン酸アンモニウム-0.5%エチレンジアミン四酢酸氷水溶液 1 ml を加えて, 37°C で1時間保温したのち, E 820 nm における吸光度を測定し, あらかじめ第一リン酸カリウムを用いて作製した標準曲線からリン含量を求めて加水分解量を算出した。また20%トリクロル酢酸を加えることにより TR-2-P の分解が予想されたので, 酵素を加

† レダクトン類の機能に関する研究 (第22報)

Studies on the Function of Reductones (Part 22)

* 〒812 福岡市東区箱崎 6-10-1

** 〒662 西宮市浜町 2-29

*** 〒670 姫路市新在家本町

**** 台北市華岡

えない TR-2-P のみの系も同様に行ない、試験区から差し引いた。さらにアルカリホスファターゼの一般的基質である *p*-ニトロフェニルリン酸についても試験し、TR-2-P と比較した。

TR-2-P のアルカリホスファターゼに対する K_m は次のようにして求めた。すなわち 75 $\mu\text{g/ml}$ のアルカリホスファターゼ溶液 0.5 ml に各種濃度の TR-2-P 溶液 0.5 ml, 10 mM 酢酸マグネシウム溶液 0.25 ml および緩衝液 0.25 ml を混合し、37°C で 20 分間保温したのち、20%トリクロル酢酸 0.75 ml を加えて反応を停止させた。上記と同様にしてリン含量を定量し、Wilkinson¹⁹⁾ の K_m 算出方法を電算機に導入して九州大学大型電算機 Facom 230-75 を用いて K_m を求めた。

3. ショ糖密度勾配超遠心分離

DNA は常法²⁰⁾ により子牛胸腺から調製し、10 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) に溶かした。終濃度がそれぞれ、40 $\mu\text{g/ml}$, 0.125 mM, 20 $\mu\text{g/ml}$ になるように、DNA, TR-2-P およびアルカリホスファターゼを混合し、37°C で 20 分間保温した。1 夜トリス緩衝液に対し、4°C で透析したのち、0.2 ml を常法の中性ショ糖密度勾配超遠心分離に供した。また上記の反応系に 50 μM 硫酸銅を加えた系についても同様に行なった。なおアルカリホスファターゼは混在する核酸分解酵素を除くためにあらかじめ 10 mM 緩衝液に対し 48 時間透析したのち、85°C で 5 分間加熱した。このように処理したホスファターゼは少なくとも実験に使用した濃度では DNA 沈降パターンにまったく影響を示さなかった。

結果および考察

Fig. 1 に示したように、TR-2-P もアルカリホスファターゼにより加水分解を受けることが明らかになった。加水分解の程度は 37°C, 1 時間の保温で約 20% であった。これは *p*-ニトロフェニルリン酸の約 50% に比較してかなり低いものであった。一方、TR-2-P のアルカリホスファターゼに対する K_m 値は $2.3 \times 10^{-3} \text{ M}$ であった。この値は *p*-ニトロフェニルリン酸の $2.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ とほぼ一致した。これらの結果から TR-2-P はアルカリホスファターゼの基質になりうることが確認された。レダクトン類のリン酸化物としてすでにアスכולビン酸-3-リン酸エステル (AsA-3-P) が得られているが、この AsA-3-P も生体内でホスファターゼにより加水分解されることが明らかにされている²¹⁾。

TR-2-P がアルカリホスファターゼにより加水分解を受けることが確かめられたが、これに伴い、TR-2-P がもとの TR に変換することが予想される。そこでアルカリホスファターゼ存在下での TR-2-P の DNA 切断能について検討した。TR-2-P はそれ自身、あるいは 2 価

Fig. 1. Hydrolysis of triose reductone-2-phosphate by alkaline phosphatase.

The enzyme reaction was carried out as follow. 0.5 ml of 75 $\mu\text{g/ml}$ alkaline phosphatase, 0.5 ml of 0.36 mM triose reductone-2-phosphate or *p*-nitrophenyl phosphate, 0.25 ml of 10 mM magnesium acetate and 0.25 ml of 120 mM carbonate buffer (pH 9.2) were mixed and kept at 37°C. After a regular time, 1.5 ml aliquot was taken into 0.75 ml of 20% trichloroacetic acid to stop the reaction. Phosphorus produced by the hydrolysis was determined according to the partially modified method of Takemura *et al.*¹⁸⁾. That is, 1 ml of the mixture of 1% ascorbic acid-0.5% ammonium molybdate-0.5% EDTA was added to 2.25 ml of the reaction mixture. The mixed solution was kept at 37°C for 1 hr and then E 820 nm measured. P contents were estimated from the standard curve prepared with potassium phosphate previously.

○—○ TR-2-P, ○---○ *p*-nitrophenyl phosphate.

銅イオン共存下でもほとんど DNA の二本鎖切断作用を示さないことはすでに確認しているが¹⁷⁾, Fig. 2 から明らかなように、TR-2-P はアルカリホスファターゼ共存下において DNA を著しく低分子化した。その切断能は TR のそれと同程度であった。また TR-2-P の切断作用は 2 価銅イオンの共存により増強されることも観察された。これらの結果から、TR-2-P はアルカリホスファターゼにより加水分解を受けることによって、DNA 切断能を回復することが明らかとなった。同様な傾向は AsA-3-P においても証明されており、加水分解に伴い、DNA 二本鎖切断能を回復している。またホスファターゼによりアスכולビン酸に変換し、ビタミン C 活性を示すことも報告されている。

このように TR-2-P は AsA-3-P と同様にホスファターゼの基質となり、加水分解され、TR としての機能を回復することが確認された。これらの結果はレダクトン類のリン酸化がそれらの生体への適用に対してきわめて有効な手段の一つであることを示すものである。

Fig. 2. Sedimentation patterns of DNA treated with triose reductone-2-phosphate in the presence of alkaline phosphatase.

A mixture of 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA in 10 mM tris buffer pH 8.0, 2.5 mM triose reductone-2-phosphate and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ alkaline phosphatase with removal of DNase was incubated at 37°C for 30 min with or without 10 μM CuSO_4 . After dialysis against 10 mM tris buffer overnight at 4°C, 0.2 ml of the reaction mixture was applied to sedimentation analysis through 5 to 20% sucrose gradient pH 7.0 for 4 hr at 30,000 rpm with a SW-39 rotor in a Beckman L ultracentrifuge. The solution was fractionated by 4 drops from the bottom of the tube. Each fraction was mixed with 1 ml water and the absorbancy at 260 nm estimated in a micro-cell (light path: 5 cm) of a Hitachi Spectrophotometer, EPU-Type 2.

○—○ Control, ○—○ TR-2-P+alkaline phosphatase, ●—● TR-2-P+alkaline phosphatase+ CuSO_4 .

要 約

TR-2-P に対するアルカリホスファターゼの作用について検討した。その結果、TR-2-P はアルカリホスファターゼの基質として加水分解されることが確かめられた。加水分解量は 37°C, 1 時間の保温で約 20% であった。また K_m 値は $2.3 \times 10^{-3} \text{ M}$ であった。

一方、TR-2-P がアルカリホスファターゼ共存下において DNA の二本鎖切断を引き起こすことも明らかにされた。

なお本研究の費用の一部は昭和50年度文部省科学研究費補助金によった。

文 献

- 1) 中村泰彦, 山藤一雄: 九大農学芸誌, **23**, 119 (1968)
- 2) 中村泰彦: 佐賀女子短大紀要, **3**, 11 (1968)
- 3) Yamafuji, K., Nakamura, Y., Omura, H., Soeda, K. and Gyotoku, K.: *Z. Krebsforsch.*, **76**, 1 (1971)
- 4) 中村泰彦: 佐賀女子短大紀要, **6**, 1 (1972)
- 5) Omura, H., Tomita, Y., Nakamura, Y. and Murakami, H.: *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **18**, 181 (1974)
- 6) Omura, H., Iiyama, S., Tomita, Y., Narazaki, Y., Shinohara, K. and Murakami, H.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **21**, 237 (1975)
- 7) Yamafuji, K. and Murakami, H.: *Enzymol.*, **31**, 139 (1968)
- 8) 村上浩紀, 山藤一雄: 九大農学芸誌, **24**, 13 (1969)
- 9) Yamafuji, K., Murakami, H. and Shinozuka, M.: *Z. Krebsforsch.*, **73**, 195 (1970)
- 10) Murakami, H. and Yamafuji, K.: *Enzymol.*, **38**, 337 (1970)
- 11) Murakami, H., Miyoshi, T. and Omura, H.: *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **18**, 149 (1974)
- 12) Murakami, H., Miyoshi, T., Yamada, K., Koga, M. and Omura, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 795 (1975)
- 13) Yamafuji, K., Fujii, T., Kanegae, Y. and Matsuo, Y.: *Enzymol.*, **43**, 73 (1972)
- 14) 藤井高任, 山藤一雄, 大村浩久: 栄養と食糧, **25**, 309 (1972)
- 15) 篠原和毅, 福元裕二, 曾 耀崑, 井上 譲, 大村浩久: 農化誌, **48**, 499 (1974)
- 16) Tomita, Y., Fukumoto, Y., Shinohara, K. and Omura, H.: *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **19**, 139 (1975)
- 17) 篠原和毅, 江藤正義, 曾 耀崑, 朱 光枝, 富田純史, 大村浩久: 農化誌, **49**, 223 (1975)
- 18) Takemura, S. and Miyazaki, M.: *J. Biochem.*, **65**, 159 (1969)
- 19) Wilkinson, G.N.: *Biochem. J.*, **80**, 324 (1961)
- 20) Yamafuji, K., Iiyama, S. and Shinohara, K.: *Enzymol.*, **40**, 259 (1971)
- 21) 美間博之, 野村容明, 今井祥雄, 高島弘道: ビタミン, **41**, 387 (1970)

(昭和52年1月6日受理)