

葡萄糖脱水素酵素及びカルボキシラーゼに対するオキシムの影響

大村, 浩久
九州大学農学部

吉田, 勤
長野県園芸試験場

宗像, 正勝
明治製菓株式会社

山藤, 一雄
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21512>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 17 (4), pp.411-428, 1960-03. Faculty of Agriculture, Kyushu University

バージョン：

権利関係：

葡萄糖脱水素酵素及びカルボキシラーゼ に対するオキシムの影響

大村浩久・吉田 勤*・宗像正勝†・山藤一雄

Effect of some oximes on the glucose dehydrogenase
and the carboxylase

Hirohisa Omura, Tsutomu Yoshida, Masakatsu
Munakata and Kazuo Yamafuji

I. 緒 言

オキシム化合物は空中窒素固定に関する Virtanen 氏⁹⁾のヒドロキシルアミン説においてその生理的意義がとくに強調されて以来、さらに広く生物の無機窒素化合物同化過程における中間体として重視されるようになったが、これに対して Wilson 氏一派¹⁰⁾は N¹⁵を用いた研究に基づいて同化の主要部分はアンモニアを經由するものであることを主張した。しかしこの事は必ずしもオキシム経由の過程を否定してしまうものではない。寧ろ我々の研究室において種々の動植物組織にオキシム化合物が含まれていることが確かめられ、¹¹⁾さらに Virtanen 氏の説ではその存在が推定されるに過ぎず一つの弱点ともなっていたオキシムからアミノ化合物への変化を触媒する酵素オキシマーゼも証明され、^{12,13)}引き続きその性質について研究された。^{20,23,24)}これとともにオキシム転移現象¹⁹⁾ならびにそれに関与する新酵素トランスオキシマーゼ^{21,22)}も発見されたが、これらは生体内におけるアミノ酸生成に関するオキシム説の可能性を支持するだけでなくさらに拡張するものである。他方 McElroy 氏等⁴⁾は *Neurospira* の突然変異株を利用して、ヒドロキシルアミンとピリドキサルリン酸とからまずピリドキサルリン酸オキシムが生じ、これが還元されてピリドキサミンリン酸となりトランスアミナーゼの助酵素としてアミノ基転移反応と共働する同化機構を示した。これはトランスオキシマーゼの助酵素もピリドキサルリン酸であつて、²⁰⁾トランスオキシマーゼ作用の中間体としてピリドキサルリン酸オキシムが生成すると推定されることとも関連して興味深い。

これらオキシムはヒドロキシルアミンとカルボニル化合物とから生成される。その反応は非常に速やかであつて必ずしも酵素を必要としない事は既に Virtanen 氏⁹⁾によつて示唆されているが、さらに我々の研究室で秋田氏⁵⁾により詳細に研究された。

ヒドロキシルアミンは硝酸塩とアンモニウム塩との間の酸化還元系の中間体であつて無機窒素の同化におけるその生理的意義は非常に重要なものであるが、周知のように顕著な毒性をもつものであつて、その一時的な集積が生体内の代謝偏倚を惹き起しパイラスの発

* 現勤務先 長野県園芸試験場。

† 現勤務先 明治製菓株式会社。

病に至らせることはすでに報告した。¹¹⁾ 家蚕に硝酸、亜硝酸、アンモニウム塩等を添食すると蚕体のオキシム含量が増加し、¹⁶⁾ またウイルス病蚕のオキシム含量は正常蚕のものよりも高いこと^{13,15)}あるいはヒドロキシルアミンのほかに亜硝酸、¹⁵⁾ アセトオキシム¹⁴⁾等も有効なウイルス誘発物質であることも確められた。このほか飼料に亜硝酸塩を混ぜて廿日鼠に与えるとその内臓のオキシム量が増加することも認められ、²⁰⁾ 一方 Virtanen 氏等⁹⁾もトルラ酵母を硝酸加里に懸濁すると非常に速やかにオキシム態窒素が増加することを報告した。Quastel 氏等⁷⁾は数種の土壌細菌にオキシム酸化酵素を発見し、アンモニアの酸化によつて生じたヒドロキシルアミンは直ちにオキシムとなつてその毒性を失い、オキシムは酸化酵素の作用で亜硝酸となり終局的には硝酸を生ずるものとしてオキシム経由の解毒的意義を強調して微生物による硝化作用の過程に挿入した。カタラーゼはアセトオキシムによつても阻害されるがその程度は微弱であつてヒドロキシルアミンに比べて著しく低いという秋田氏¹⁹⁾の観察はオキシムの生成に基づくアミンの解毒を示すものと考えられる。

オキシムを生成するためヒドロキシルアミンと結合するカルボニル化合物は呼吸、醗酵或は解糖作用等生体内の種々の代謝反応の中間物として生成供給される可能性が多い。Virtanen 氏⁹⁾が荳科植物培養液からオキザロ醋酸オキシムを分離し、またトランスアミナーゼのアミノ供与体及び受容体としてグルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンならびにそれらに対応するケト酸がとくに有効であり、さらにトランスオキシマーゼの基質として葡萄糖オキシムも好ましいことなどからビルビン酸、 α -ケトグルタル酸、オキザロ醋酸等のケト酸や葡萄糖のような糖類がとくに考えられる。

生体内では多くの反応が動的平衡を保つて行われているが、その一つに異常が起ればそれに伴つて関連する種々の反応に影響が及ぼされることは容易に推定される。例えばヒドロキシルアミンはとくにカタラーゼや種々の脱水素酵素の強い阻害剤であるので、一時的にせよその異常な集積が生体の代謝系に偏倚を惹き起しウイルス病を誘発することはすでに述べた通りである。Quastel 氏等が主張するようにオキシムの生成によつてヒドロキシルアミンの毒性を消し去つたとしても、オキシムの生成が更に糖類やケト酸を基質とする酵素系に対し何等影響を及ぼさないかどうかは問題である。そこでその代表的なものとして葡萄糖およびビルビン酸を選びこれ等を基質とする酵素についてオキシムの影響を検討した。

II. 葡萄糖脱水素酵素

糖類の代表として最も著名なものは葡萄糖でありこの代謝に関与する酵素としては葡萄糖脱水素酵素が肝臓或は糸状菌等に含まれている。これは DPN または TPN を助酵素とするものであつて、その活性は一般に分光光度計を用い葡萄糖から DPN への水素の転移を 340 m μ の吸収の増加を追及して測定している。しかるに最近これと同一原理でオキシムの酵素的脱水素作用とでも称せられる現象も観察され、またオキシマーゼの分光光度計による測定法も確立された。²¹⁾ これはオキシマーゼにも DPN および FAD が助酵素として関与するので葡萄糖脱水素酵素の場合とは逆に DPNH を水素供与体、オキシムを受容体、FAD を中間伝達体とする反応系で DPNH の減少を同じく 340 m μ の吸光度の低下で測定するものである。こうして葡萄糖オキシムを初め種々の糖オキシム、ビルビン酸オ

キシム等ケト酸類のオキシム、あるいはピリドキサルオキシム、アセトキシム等各種のオキシムがいずれも還元または酸化されることが証明された。しかし葡萄糖オキシムの合成は極めて困難であつて糖を含まない純品を得ることは難しいのでオキシムの還元あるいは酸化酵素作用の測定で観察される吸光度の変化が、夾雑する可能性のある葡萄糖と葡萄糖脱水素酵素との作用に基づくおそれもあるので、とくにこれに関する検討もあわせて行なつた。

(1) 酵素の調製

酵素は主として奥貫、瀬戸氏⁹⁾の記載に従つて調製したが設備等の関係で多少条件を改めた。その一例を示す。

新鮮な牛肝臓 150 g を等量の冷アセトン (-3°C) に Warling blender で磨碎懸濁しガーゼ4枚で濾過する。濾液を5倍容量の冷アセトンの中に注入、よく攪拌した後吸引濾過する。こうして得た黄褐色の粉末 85 g を同じく冷アセトン 85 ml に乳鉢でよく磨碎懸濁し、これを8倍量の冷アセトンに加え攪拌後吸引濾過する。沈澱は出来るだけ吸引してアセトンを除きさらに濾紙上に薄く掛けて乾燥粉末にする。これまでの操作は吸引濾過以外はすべて4°Cの低温実験室で行ない速やかにアセトン粉末を調製した。収量 31.2 g。

この粉末をただちに室温で10倍量の蒸溜水と30分間混合した後静置して不溶部を沈澱させ上層液を傾瀉して集める。沈澱をさらに綿布4枚を重ねて濾過し、残渣をふたたび上と同様に蒸溜水で抽出、濾過し前者と合わせて黄褐色の抽出液 540 ml を得た(酵素-I, 蛋白含量* 1.2%, pH 6.5†)。

抽出液を水冷し5°Cで10%醋酸を攪拌しながら滴加(約1 ml)してpHを6.0に調整しさらに30分間攪拌した後静置する。これを2500 r.p.m.で15分間遠心分離し525 mlの黄赤色透明な上清を得た。これに硫酸 157.5 g (100 ml 当り 30 g) をよく攪拌しながら溶解し5°Cの水室に一晩放置し2500 r.p.m.で10分間遠心分離して約12 gの淡黄褐色沈澱を得た。これを60 mlの0.05 M, pH 7.6の磷酸緩衝液に溶し-2°Cに約1時間放置後2500 r.p.m.で15分間遠心分離し(此の際沈澱は殆ど無かつた)黄赤色透明な溶液 77.5 ml を得た(酵素-II, 蛋白含量 2.1%)。

この溶液 71 ml を5°Cに冷却し10%醋酸でpHを5.5に調整後(約1.7 ml 添加, 液は微濁), 100 ml 当り 7.5 g の硫酸を溶し5°Cに2時間放置, 3000 r.p.m.で10分間遠心分離した。黄赤色の上清 77 ml にさらに硫酸 14.9 g (100 ml 当り 18 g) を加え氷室に一晩放置した。3000 r.p.m.で10分間遠心分離して得られた約12 gの淡黄褐色泥状沈澱を磷酸緩衝液に溶し42 mlの黄褐色透明溶液とした(酵素-III, 蛋白含量 3.3%, pH 6.6)。

ふたたび5°Cに冷却し10%醋酸を徐々に加えてよく攪拌しpH 4.7とし(2.5 ml 添加), 4時間放置した。この際pHが徐々に低下するので1時間毎に1 N 苛性ソーダでpHを4.7に保つた。3000 r.p.m.で10分間遠心分離して生じた変性蛋白を除く。この沈澱を10 mlの緩衝液で洗い遠沈上清を合わせた。収量 49 ml (酵素-IV, 蛋白含量 1.7%, pH 4.8)。

約2 mlの1 N 苛性ソーダを加えてpHを6.0に戻し5°Cの氷室に40時間放置した。さらに10倍量の5°Cの蒸溜水に対し氷室中で4.5時間セロファン膜で透析した。この間

* Folin-銅試薬で測定 † 硝子電極 pH 計で測定

に外液を2回取替える。ついで 4000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して微量の生成沈澱を除き上清 54 ml を得た (酵素-V, 蛋白含量 1.3%, pH 5.8)。これはそのまま若くは念のためさらに 6000 r.p.m. で 10 分間遠心分離後凍結乾燥して氷室に保存した。

(2) 酵素活性の測定

酵素液 1 ml, 葡萄糖溶液 1 ml, DPN 溶液 1 ml および pH 7.6 の 0.05 M 磷酸緩衝液 1 ml より成る反応液について DPNH の生成に基づく 340 m μ の吸光度の増加を Beckman 分光光度計で測定して酵素の活性を求めた。

葡萄糖溶液 (0.53 M), パン酵母から Le Page 法によつて調製した粗 DPN 溶液 (1 mg/ml) を用い各精製段階の酵素を適宜稀釈してその活性を室温で測定し第 1 図に示す。これから明らかなように反応の初期では吸光度は反応時間に比例して増加した。しかしてその直線関係を示す期間は酵素液によつて支配され活性の低い場合にはかなり長い時間比例したが高い場合には短く速やかにある一定値に達し反応の終結を示した。また同一の酵素液でも基質濃度が異なると DPNH の生成速度も異なつた。例えば第 2 図に示すように、酵

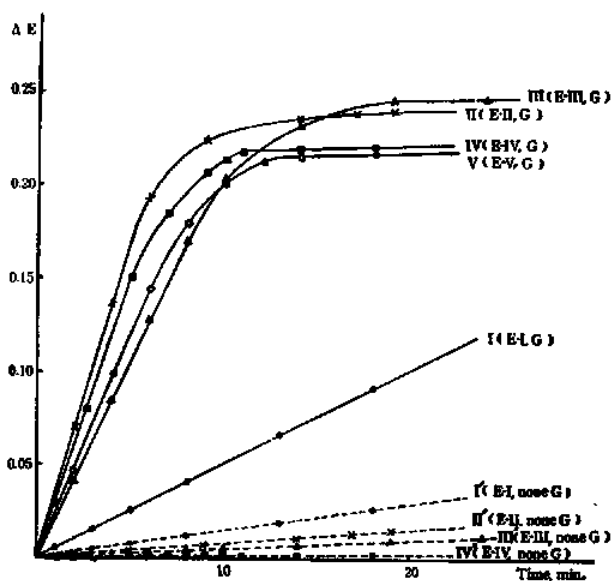


Fig. 1. Activity of the glucose dehydrogenase in course of preparation.

Reaction mixture: total volume 4 ml.

Test	I-V	I'-V'
Enzyme, ml	1.0	1.0
Glucose (0.53 M), ml	1.0	—
H ₂ O, ml	—	1.0
DPN (1.0 mg/ml), ml	1.0	1.0
Phosphate buffer (0.05 M, pH 7.6), ml	1.0	1.0

Enzyme solution employed; I, I': Enzyme-I, 4 times dil.; II, II': Enzyme-II, 8 times dil.; III, III': Enzyme-III, 15 times dil.; IV, IV': Enzyme-IV, 20 times dil.; V, V': Enzyme-V, 20 times dil.

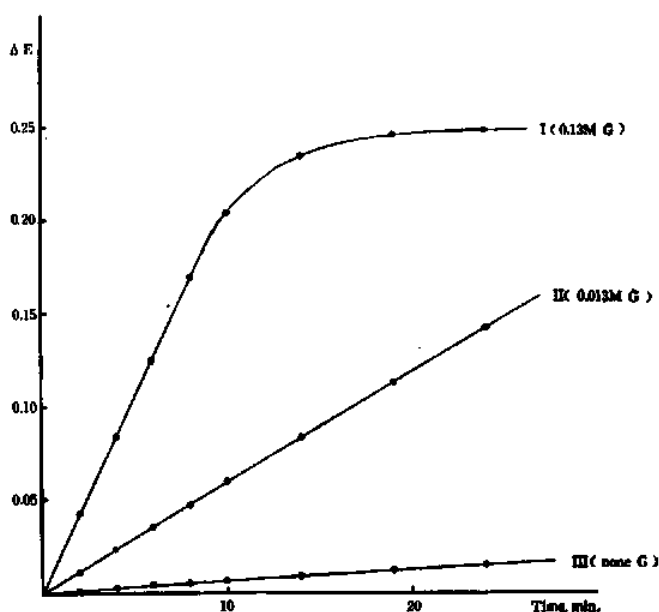


Fig. 2. Activity of the glucose dehydrogenase with different concentration of glucose.

Reaction mixture: total volume 4 ml.

Test	I	II	III
Enzyme (Enz-III, 15 times dil.), ml	1.0	1.0	1.0
Glucose { (0.53 M), ml	1.0	—	—
(0.053 M), ml	—	1.0	—
H ₂ O, ml	—	—	1.0
DPN (1.0 mg/ml), ml	1.0	1.0	1.0
Phosphate buffer (0.05 M, pH 7.6), ml	1.0	1.0	1.0

素-III 15倍稀釈液 1 ml ずつについて葡萄糖終濃度 0.13 M 及び 0.013 M の場合、吸光度は前者ではほぼ 15 分で一定値に達したが後者では反応 25 分間を通じて直線的に増加した。いずれにしてもこれらの酵素液では少なくとも 5 分までは直線的に反応が進行したので酵素活性は同一条件でかつこの範囲内の反応時間で得た値で比較することが好ましかった。第 1 表には 4 ないし 5 分の吸光度の変化の値からのこれら酵素液の活性を取極めて示す。なお酵素の精製初期では夾雑する組織成分のために第 1 図に点線で示すように基質を加えなくても DPNH が多少生成したのでこれを補正したが、精製が進んで酵素-IV 以降では全く変化が起らなかった。

(3) 緩衝液の影響

340 m μ の吸光度の減少で活性を求めるオキシマーゼの反応には磷酸塩が不可欠であつて、磷酸塩を加えない場合あるいは醋酸やペロナル等の緩衝液を用いた場合には逆に DPNH を生じてオキシムは酸化されることを示した。またピロ磷酸では吸光度にほとんど変化がなく酸化還元ともに反応は認められなかった。このようにオキシマーゼでは緩衝液

Table 1. Preparation of liver glucose dehydrogenase.

Enzyme	Step	Total volume, ml	Protein, %	Dilution	E/min., $\times 10^3$	Specific activity
I	Extract	540.0	1.2	4	5.2	1.73
II	1st $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ppt.	77.5	2.1	8	32.6	12.42
III	2nd $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ppt.	42.0	3.3	15	21.1	9.59
IV	Acid ppt.	49.0	1.7	20	29.6	34.82
V	Dialysis	54.0	1.3	20	24.1	37.08

Reaction mixture: Enzyme (appropriately diluted) 1.0 ml, Glucose (0.53 M) 1.0 ml, DPN (1 mg/ml) 1.0 ml, Phosphate buffer (0.05 M, pH 7.6) 1.0 ml, Total volume, 4.0 ml. Δ E/min. was estimated at 340 $m\mu$ for 4 to 5 min. and calculated. Specific activity was expressed by Δ E/min./mg-protein-N.

の選定がとくに重要であつたので 葡萄糖脱水素酵素についても検討した。第2表には酵素-V 凍結乾燥標品で種々の緩衝液を用いた場合の結果を示す。

Table 2. Effect of buffers on the glucose dehydrogenase.

Buffer	Phosphate	Veronal			Pyrophosphate		None	
pH	7.7	7.7	7.3	6.7	8.2	7.7	7.1	5.6
Δ E/min., $\times 10^3$	31.0	32.0	29.3	21.8	22.0	20.0	17.8	6.5

Reaction mixture: Enzyme (E-V lyoph. 2 mg/ml) 0.3 ml, Glucose (0.53 M) 1.0 ml, DPN (2.5 mg/ml) 0.2 ml, Buffer (0.05 M) 2.5 ml. Total volume 4.0 ml

葡萄糖脱水素酵素はすでに述べたように 磷酸緩衝液を用いた反応系で活性を測定する。すなわち磷酸塩を用いても オキシマーゼとは逆に 340 $m\mu$ の吸光度の増加が観察された。したがつてオキシマーゼの測定²⁷⁾において、たとい葡萄糖オキシムに葡萄糖が夾雑し酵素溶液に葡萄糖脱水素酵素も含まれていたとしても、この夾雑反応系はむしろ 340 $m\mu$ の吸光度の減少を妨げる方向に働くわけで、オキシマーゼ活性として測定される DPNH の減少は明らかにオキシム-オキシマーゼ反応によるものであつて葡萄糖-葡萄糖脱水素酵素の作用ではないといえる。

第2表の結果はペロナル緩衝液を用いても 葡萄糖脱水素酵素の測定には支障がないことも示す。またピロ磷酸の場合は磷酸塩に比べてその活性はかなり低下するがオキシムの場合のように全く吸光度に変化がないことはなかつた。

(4) オキシムの影響

第3図には二三の酵素標品で葡萄糖の代りに葡萄糖オキシムを用いた場合の吸光度の変化を示す。酵素-IV および V はいずれも 20 倍稀釈液であつて第1図の実験に用いたものと同じであり、凍結乾燥標品は 5 mg を 0.025 M 磷酸緩衝液 5 ml に溶して酵素液とした。その各々 1 ml を用い 0.2 M オキシム 1 ml, DPN 溶液 (0.5 mg/ml) 1 ml, 0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 7.6) 1 ml と混合作用させた。また比較のためにオキシムと同じ濃度の葡萄糖を用いて酵素活性を測定した。

葡萄糖の代りにそのオキシムを基質に用いると酵素の活性は明らかにほとんど認められ

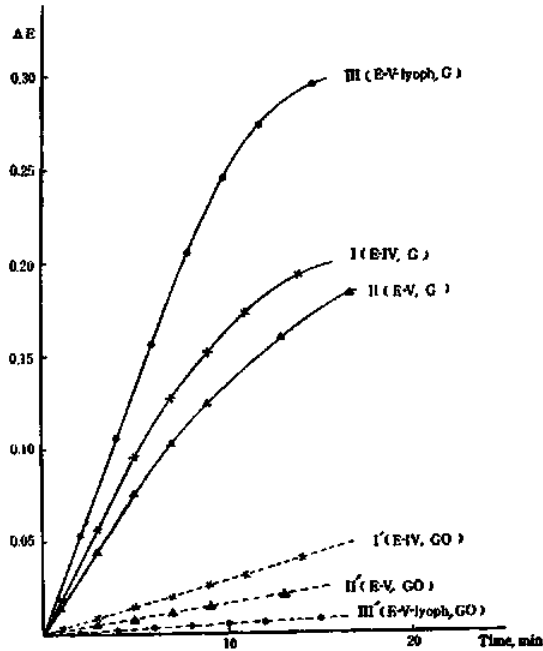


Fig. 3. Action of the glucose dehydrogenase on glucose oxime.

Reaction mixture: total volume 4 ml.

Test	I—III	I'—III'
Enzyme, ml	1.0	1.0
Glucose (0.2 M), ml	1.0	—
Glucose oxime (0.2 M), ml	—	1.0
DPN (0.5 mg/ml), ml	1.0	1.0
Phosphate buffer (0.05 M, pH 7.6), ml	1.0	1.0

Enzyme solution employed; I, I': Enzyme-IV, 20 times dil.; II, II': Enzyme-V, 20 times dil.; III, III': Enzyme-V lyophilized, 1.0mg/ml of 0.025M buffer.

なかつた。オキシム類の中でとくに葡萄糖オキシムの調製は極めて困難であつて糖の混合する可能性は多分にあつたが少なくとも10%を越えることはなかつた。酵素の活性が基質濃度にも依存することはすでに第2図にも示したがさらに念のため種々の葡萄糖濃度において同じ酵素標品による吸収の増加を測定した。

Table 3. Effect of concentration of glucose.

Conc. of glucose used, M	0.53	0.20	0.08	0.06	0.04	0.02
Reaction time, min.	10	10	30	30	30	30
$\Delta E, \times 10^3$	80.0	71.0	16.5	12.5	7.5	2.0

Reaction mixture: Enzyme (E-V lyoph. 2 mg/ml of buffer) 0.3 ml, Glucose 1.0 ml, DPN (5 mg/ml) 0.5 ml, Phosphate buffer (0.05 M, pH 6.8) 2.0 ml. Total volume 4.0 ml.

糖の量が減少すると急激に吸光度の増加も低下した。しかしてこれは第3図に認められ

るオキシムでの少量の DPNH の生成がオキシムに夾雑する葡萄糖によるものと推定されることを説明すると思われる。こうして葡萄糖オキシムは葡萄糖脱水素酵素の基質としては無効であると考えられる。

オキシマーゼの作用として測定される 340 m μ の吸光度の変化は緩衝液の影響から葡萄糖脱水素酵素の作用ではないことは明らかになつたが、ペロナルも葡萄糖脱水素酵素に有効であるのでオキシムの酸化作用として観察される吸光度の増加が夾雑する葡萄糖—葡萄糖脱水素酵素系による可能性を排除することは出来ない。もちろんピロ燐酸の場合葡萄糖では活性の低下があつても吸光度に変化を起すがオキシムでは全く変化しないことおよび種々のオキシムも葡萄糖オキシムと同様に作用を受けることから、一応オキシムの酸化と葡萄糖の酸化とは別の酵素によるとの推定は出来るが、さらに M/1000 ないし M/10000 程度のオキシムでの吸光度の増加は第 3 表の数値に比べて著しく多いことが見られるので、葡萄糖脱水素酵素系が混在していてもこれに基づく変化は無視出来る程度に過ぎない。こうして分光光度計によるオキシムの還元および酸化酵素の測定に際しとくに葡萄糖オキシムを用いた場合最も心配された葡萄糖脱水素酵素作用の誤認の可能性は考慮する必要はないということが出来る。

つぎに葡萄糖オキシムあるいはピルビン酸オキシムが葡萄糖脱水素酵素の活性に影響しないことも第 4 表から明らかになつた。

Table 4. Effect of oximes on the glucose dehydrogenase.

Substrate	Reaction time, min.	2	4	6	8	10
	Glucose		24	47	68	89
$\times 10^3$	Glucose + Glucose oxime	23	47	69	91	111
	Glucose + Pyruvic oxime	21	44	68	92	113
	Glucose oxime	0	0.5	1.5	2	5

Reaction mixture: Enzyme (E-V lyoph. 2 mg/ml of buffer) 0.3 ml, Glucose (0.1 M) 1.0 ml, Oxime (0.1 M) 0.5 ml, DPN (2 mg/ml) 0.5 ml, Phosphate buffer (0.05 M, pH 7.8) 1.7 ml. Total volume 4.0 ml.

同様にヒドロキシルアミンも第 4 図に示すように酵素活性に影響しなかつた。しかし雞肝臓抽出液は DPNH の生成を強く抑制しヒドロキシルアミンの添加によつてこの阻害作用は緩和された。雞肝臓抽出液はオキシマーゼの調製に用いた肝臓のアセトン 33~55% 沈澱懸濁液を 3 時間流水透析後遠心分離した上清であつてその 1 ml は沈澱約 100 mg 或は原組織 1 g に相当するようにしたものである。もちろんこの阻害機構は明らかではないが、肝臓抽出液は加熱することなく加えたので葡萄糖脱水素酵素の反応の平衡を逆の方向に進める因子があり、ヒドロキシルアミンはこれを阻害すると考えれば一応の説明は出来ると思われるが推定の域を出ない。

III. カルボキシラーゼ

ピルビン酸は呼吸、醗酵、窒素あるいは脂肪代謝等生体内の多くの反応に関与している極めて重要な代謝中間物であるが、これを基質とする酵素として代表的なもの一つは酵

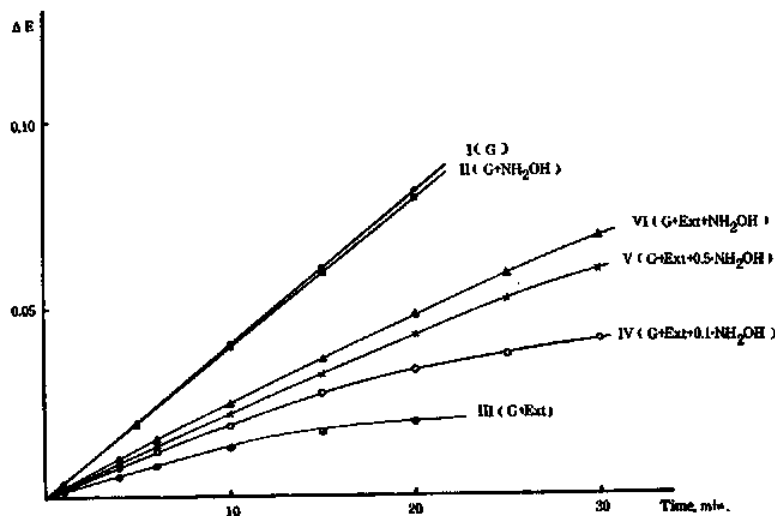


Fig. 4. Effect of hydroxylamine and liver extract on the glucose dehydrogenase.
Reaction mixture: total volume 4 ml.

Test	I	II	III	IV	V	VI
Enzyme (Enz-V lyoph., 10 mg/ml of buffer), ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Glucose (0.1 M), ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
DPN (2.0 mg/ml), ml	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
NH ₂ OH (0.01 M), ml	—	1.0	—	0.1	0.5	1.0
Liver extract, ml	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1
Phosphate buffer (0.05 M, pH 7.6), ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H ₂ O, ml	1.1	0.1	1.0	0.9	0.5	—

Liver extract was prepared as follows. 100 mg of precipitates from fowl liver homogenate deposited between 33 and 55% of acetone were suspended in water and dialysed against running tap water for 3 hrs. After centrifuging, the supernatant was adjusted to 1 ml with water.

母のカルボキシラーゼであつて、ビルビン酸は本酵素によつて脱炭酸されてアセトアルデヒドを生ずる。

(1) 酵素の調製

酵素の材料としてはビール酵母が優れているが本実験では入手の容易さからパン酵母を用いおおむね Green 氏等³⁾の方法に従つて調製した。

市販品を洗滌した後凍結乾燥し乳鉢で磨砕粉末にする。この酵母粉末 100 g に pH 7.2, 0.067 M 磷酸緩衝液を 300 ml 加え攪拌しながら 37°C で一時間抽出する。これに等容の蒸溜水を加え 2000 r.p.m. で 20 分間遠心分離して pH 5.9 の黄褐色の濁濁した抽出液 338 ml を得た。以下操作は水冷しながら 0° ないし 5°C の低温で行なつた。抽出液に pH 7.2 の 0.5 M 磷酸緩衝液 51 ml を加え更に 1 M 醋酸石灰 25.5 ml を加えた。こうして生じた沈澱を 2000 r.p.m. で 15 分間遠心分離した後、360 ml の黄白色半透明上清に 100 ml 当り 38 g の硫酸を攪拌しながら徐々に加えて溶解した。一日冷蔵庫に放置した後冷凍遠心機を用いて 10000 r.p.m. で 20 分間遠心分離して沈澱を集めた。この沈澱を pH 6.0 の 0.4 M

枸橼酸一苛性ソーダ緩衝液 200 ml に溶かし黄白色半透明の溶液を得た。これに硫酸を加えて 0.35 飽和とし生じた沈澱を遠沈除去する。淡黄色透明な上清 225 ml にさらに硫酸を溶かして 0.63 飽和とし 10000 r.p.m. で 20 分間遠心分離する。この操作をさらに 2 回繰返して得た沈澱を吸引濾過して出来るだけ水分をのぞき冷蔵庫に保存した。収量 1.48 g.

生酵母からの抽出は困難であつて乾燥粉末にすることが必要であるようであつたが、凍結乾燥の代りに同じく市販品を水洗し Büchner 漏斗上でよく吸引脱水し濾紙上に薄い層に掛け室温で通風乾燥後ボールミルで数時間磨碎して得た粉末を酵素材料とすることも差支えない。

(2) 酵素活性の測定

カルボキシラーゼはピルビン酸を基質としその分解によつて発生する炭酸ガスの量を Warburg 検圧計を用いて測定する。本実験では Green 氏等の方法に従つて酵素液 0.5 ml, 0.01 M ピルビン酸ソーダ 0.5 ml, pH 6.0 の 0.5 M 枸橼酸緩衝液 0.5 ml 及び水で全量 3 ml とした反応液で 30°C に於ける炭酸ガスの発生量を 30 分間測定した。こうして酵素標品 20 mg を用いての反応の一例を第 5 図に示すがもちろん加熱酵素によるガス発生

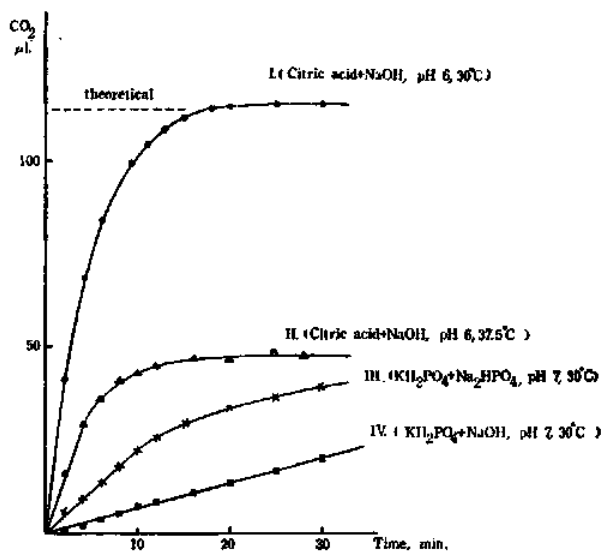


Fig. 5. Estimation of the carboxylase.

Reaction mixture: total volume 3 ml.

Tube		Test	I	II	III	IV
Main	{	Na-pyruvate (0.01 M), ml	0.5	0.5	0.5	0.5
		Buffer (0.5 M), ml	0.5	0.5	0.5	0.5
		H ₂ O, ml	1.5	1.5	1.5	1.5
Side		Enzyme (40 mg/ml), ml	0.5	0.5	0.5	0.5
pH			6.0	6.0	7.0	7.0
Temperature, °C			Citric acid+NaOH 30	6.0 37.5	KH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄ 30	KH ₂ PO ₄ + NaOH 30

Enzyme was dissolved in 0.04 M citrate buffer of pH 6.0 and used immediately.

は認められなかつた。ガスの発生量を測定するために反応液が酸性でなければならないことは当然であつて pH 6.0 の枸橼酸緩衝液が最も良く pH 7.0 の $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ では炭酸ガスの発生量は著しく低下し $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ ではさらに活性が抑制された。また反応温度も 30°C であつて 37.5°C では約 40% に低下した。したがつて以下の実験も枸橼酸緩衝液を用いて 30°C で反応させさらに酵素液も pH 6.0 の 0.04 M 枸橼酸一苛性ソーダ混液に使用直前に溶解して調製した。こうしてこの条件で約 20 分で反応は完了しほぼ理論値の炭酸ガスの発生が測定された。

(3) オキシムの影響

第 6 図にはピルビン酸のほか、同濃度のピルビン酸オキシム、アセトオキシムを基質に用いた場合およびピルビン酸にこれらオキシムを加えた反応系での結果を示す。発生炭酸ガス量を十分にするために基質は従来の倍量使用した。ピルビン酸およびオキシムはもちろんソーダ塩である。アセトオキシムに基質としての効果がないことは当然予測されたが、ピルビン酸オキシムも全く無効であり、またこれらオキシムをピルビン酸に加えても酵素反応にほとんど影響は無かつた。ただピルビン酸オキシムを加えて発生ガス量が多少

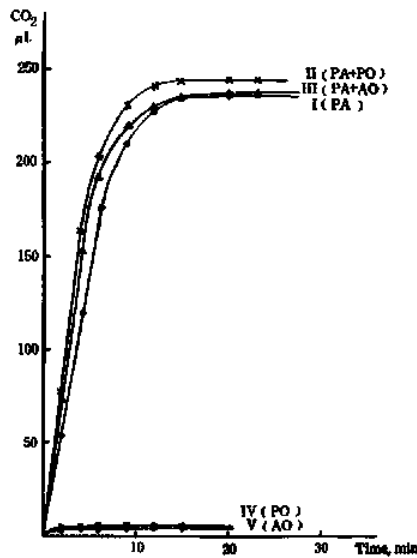


Fig. 6. Effect of pyruvic oxime and acetoxime on the carboxylase.

Reaction mixture: total volume 3 ml.

Tube		Test	I	II	III	IV	V
Main	Na-pyruvate (0.01 M), ml		1.0	1.0	1.0	—	—
	Na-pyruvate oxime (0.01 M), ml		—	1.0	—	1.0	—
	Acetoxime (0.01 M), ml		—	—	1.0	—	1.0
	Citrate buffer (0.05 M, pH 6.0), ml		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Side	H ₂ O, ml		1.0	—	—	1.0	1.0
Side	Enzyme (70 mg/ml), ml		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Enzyme was dissolved in 0.04 M citrate buffer of pH 6.0 and used immediately.

増加する傾向も認められるが、これはオキシムの効果というよりはむしろオキシムに混在する可能性のあるピルビン酸によると考えた方がよいようである。

生体内ではピルビン酸とともに α -ケトグルタル酸も重要な中間体として種々の代謝作用に関与しており、ピルビン酸と同様に α -ケトグルタル酸から脱炭酸する酵素も知られている。そこでこの酵素標品を用いて試験したが、 α -ケトグルタル酸およびそのオキシムともに脱炭酸されず、またピルビン酸に対するカルボキシラーゼの作用に影響しないことはピルビン酸オキシムならびにアセトオキシムと同様であつて第7図に示すとおりである。

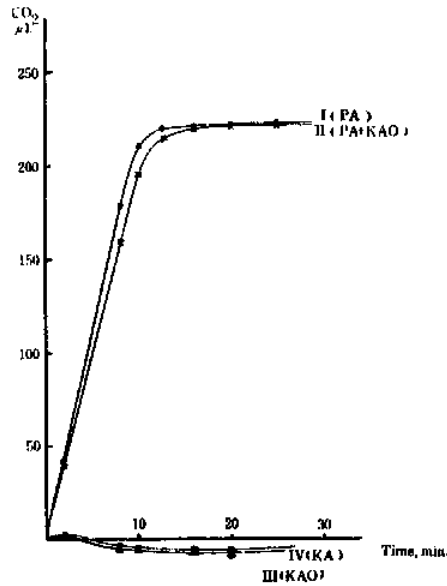


Fig. 7. Effect of α -ketoglutaric oxime on the carboxylase.

Reaction mixture: total volume 3ml.

Tube	Test	Test			
		I	II	III	IV
Main	Na-pyruvate (0.01 M), ml	1.0	1.0	—	—
	Na- α -ketoglutarate oxime (0.02 M), ml	—	0.5	0.5	—
	Na- α -ketoglutarate (0.01 M), ml	—	—	—	1.0
	Citrate buffer (0.5 M, pH 6.0), ml	1.0	1.0	1.0	1.0
Side	H ₂ O, ml	0.5	—	1.0	0.5
	Enzyme (50 mg/ml), ml	0.5	0.5	0.5	0.5

Enzyme was dissolved in 0.04 M citrate buffer of pH 6.0 and used immediately.

ケト酸のオキシム類のほかに 葡萄糖オキシムも第8図のように全く酵素作用に影響しなかつた。

しかるにヒドロキシルアミンは第9図のようにカルボキシラーゼ作用を抑制した。しかし初期の反応速度には差がなくまた反応終了までの時間には影響がないが最終的に生成する炭酸ガスの量はヒドロキシルアミンの添加量に応じて低下することなどから、酵素阻害というよりはヒドロキシルアミンを加えることによつてオキシムを生じ基質として有効な

ピルビン酸の量が減少するためであると推定される。もし酵素自体が阻害的影響を受けて活性を減ずるならば反応速度を低下する筈である。例えば酵素溶液はかなり不安定であつて標品を溶解後一日冷蔵すれば活性が低下することは同じく第9図に示すとおりである。すなわちこの場合ヒドロキシルアミン添加区と異なつて反応速度は低いなりに反応時間30分間に亘つて直線的に炭酸ガスは発生しその量はヒドロキシルアミン添加区を凌駕した。

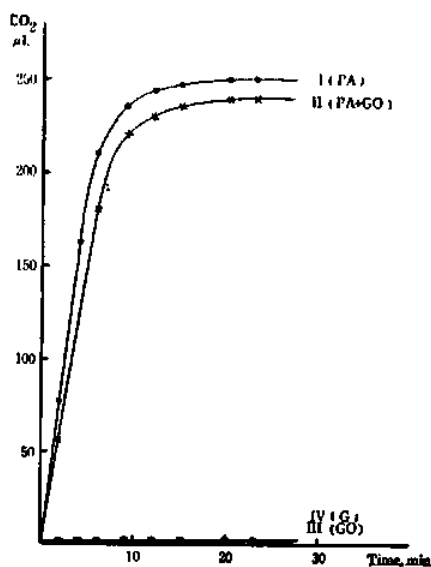


Fig. 8. Effect of glucose oxime on the carboxylase.

Reaction mixture: total volume 3 ml.

Tube		Test	I	II	III	IV
Main	Na-pyruvate (0.01 M), ml		1.0	1.0	—	—
	Glucose oxime (0.02 M), ml		—	0.5	0.5	—
	Glucose (0.02 M), ml		—	—	—	0.5
	Citrate buffer (0.5 M, pH 6.0), ml		1.0	1.0	1.0	1.0
Side	H ₂ O, ml		0.5	—	1.0	1.0
	Enzyme (60 mg/ml), ml		0.5	0.5	0.5	0.5

Enzyme was dissolved in 0.04 M citrate buffer of pH 6.0 and used immediately.

(4) 粗酵素液での試験

これまでの試験は精製酵素溶液でのものであるが、生体内にはオキシムをも基質とする酵素があつて精製操作中に除去される可能性も全く否定してしまうことは出来ない。そこで酵母の抽出液について試験した。すなわち乾燥酵母 5 g を pH 6.0 の 0.067 M 枸橼酸緩衝液 15 ml で 37°C で 1 時間抽出しさらに水 10 ml を加え 3000 r.p.m. で 30 分間遠心分離し上清を酵素液とした。この 0.5 ml についての結果を第 10 図に示すがピルビン酸区から明らかなようにカルボキシラーゼ活性が極めて強いにもかかわらずピルビン酸オキシムは全く作用を受けなかつた。さらにピルビン酸オキシムがカルボキシラーゼに影響なくヒドロキシルアミンが炭酸ガスの発生を抑制することも精製酵素の場合と同様であつて第 11 図

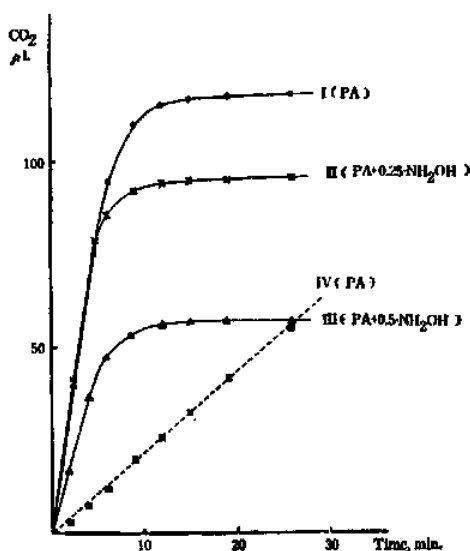


Fig. 9. Effect of hydroxylamine on the carboxylase.

Reaction mixture: total volume 3 ml.

Tube		Test	I	II	III	IV
Main	Na-pyruvate (0.01 M), ml		0.5	0.5	0.5	0.5
	NH ₂ OH (0.01 M), ml		—	0.25	0.5	—
	Citrate buffer (0.5 M, pH 6.0), ml		1.0	1.0	1.0	1.0
	H ₂ O ml		1.0	0.75	0.5	1.0
Side	Enzyme (50 mg/ml), ml		0.5	0.5	0.5	0.5

Enzyme was dissolved in 0.04 M citrate buffer of pH 6.0 and used immediately except in Test IV, in which enzyme solution was used after 24 hrs, at 5°C in a refrigerator.

に示す。この場合 3 g の乾燥酵母を 18 ml の緩衝液で抽出し水 18 ml を加えて遠沈、その上清 0.5 ml を用いた。

IV. 考 察

これらの結果は葡萄糖あるいはピルビン酸がオキシムになることによつて葡萄糖脱水素酵素あるいはカルボキシルラーゼの基質としての特性を完全に失うこと、ならびにオキシム類が酵素作用にも影響しないことを明らかに示した。牛肝臓の葡萄糖脱水素酵素は α -D-葡萄糖には作用せず β -D-葡萄糖を脱水素して δ -グルコノラク톤を生じそれが加水分解されてグルコン酸になると云われている。一方カルボキシルラーゼの場合も、人によつて異なるが、助酵素のピリミジン核のアミノ基またはチアゾール核が開裂して生ずるチオール基がまずピルビン酸のカルボニル基に付加し酵素基質結合体を生じて反応が進行すると主張されている。したがつてこれら酵素の基質としては糖あるいはピルビン酸のカルボニル基がとくに重要であることが推定され、もしカルボニル基がすでに他のグループに結合されているならば酵素との結合が妨げられて反応は起り得ないことが考えられる。こうしてオキ

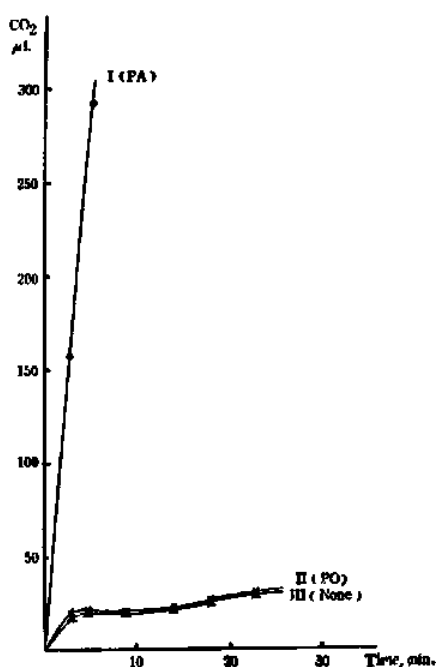


Fig. 10. Carboxylase activity of raw yeast extract.

Reaction mixture: total volume 3 ml.

Tube		Test	I	II	III
Main	Na-pyruvate (0.01 M), ml		1.0	—	—
	Na-pyruvate oxime (0.01 M) ml		—	1.0	—
	Citrate buffer (0.5 M, pH 6.0), ml		1.0	1.0	1.0
Side	H ₂ O, ml		0.5	0.5	1.5
	Enzyme*, ml		0.5	0.5	0.5

* 5 g of dry yeast powder were extracted with 15 ml of 0.067 M citrate buffer, pH 6.0, by stirring at 37°C for 60 min., and then centrifuged at 3,000 r.p.m. for 30 min. after supplementing 10 ml of water. The cloudy supernatant thus obtained was used immediately as the enzyme solution.

シムでの実験はこの一根據を与えるものと考えられる。

さきに述べたようにヒドロキシルアミンのカタラーゼ阻害に比べてアセトオキシムのものは著しく低いという秋田氏の報告は、オキシム生成がヒドロキシルアミンの解毒の意義をもつという Quastel 氏等の主張を支持するものであるが、他方オキシムは硝酸還元酵素を阻害する。⁹⁾ これはオキシムがオキシマーゼの水素受容体として作用することから硝酸塩との拮抗作用によるものと思われる。カルボキシルラーゼに対するヒドロキシルアミンの影響はこれらとは異なつてオキシムを生成することによつて酵素の基質を減少し反応速度を低下する好例であると思われる。このように生体内におけるヒドロキシルアミンの一時的増加および引続くオキシムの増加はアミンによる酵素阻害の解毒に役立つほか、カルボニル化合物の基質効果を失わせてこれに関与する酵素作用を減少させ、またオキシマーゼ、

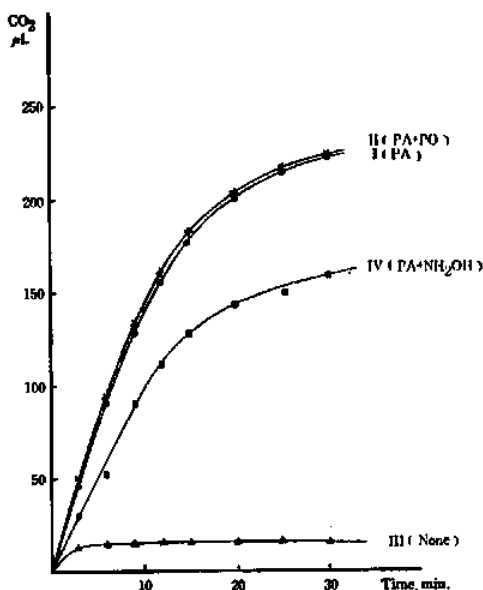


Fig. 11. Effect of pyruvic oxime and hydroxylamine on the carboxylase activity of raw yeast extract.

Reaction mixture: total volume 3 ml.

Tube		Test	I	II	III	IV
Main	Na-pyruvate (0.01 M), ml		1.0	1.0	—	1.0
	Na-pyruvate oxime (0.01 M), ml		—	1.0	—	—
	NH ₂ OH (0.01 M), ml		—	—	—	1.0
	Citrate buffer (0.5 M, pH 6.0), ml		0.5	0.5	0.5	0.5
Side	H ₂ O, ml		1.0	—	2.0	—
	Enzyme*, ml		0.5	0.5	0.5	0.5

* 3 g of dry yeast powder were extracted with 18 ml of 0.067 M citrate buffer, pH 6.0, by stirring at 37°C for 60 min., and then centrifuged at 3500 r.p.m. for 20 min. after supplementing 18 ml of water. The cloudy supernatant thus obtained was used immediately as the enzyme solution.

トランスオキシマーゼ作用の促進を惹き起すなど種々の代謝に影響を及ぼす。

V. 総 括

葡萄糖脱水素酵素は葡萄糖オキシムには作用しなかつた。また葡萄糖オキシム、ピルビン酸オキシムおよびヒドロキシルアミンなどによつても影響されなかつた。

同様にカルボキシラーゼもピルビン酸オキシムに作用せずさらにピルビン酸、 α -ケトグルタル酸、アセトン及び葡萄糖の各オキシムによつてもなんら影響を受けなかつた。しかしヒドロキシルアミンによつては炭酸ガス生成量を低下したが初期の反応速度および反応終了までの時間には影響されなかつたので本アミンによる阻害はオキシムの生成に基づく基質ピルビン酸の減少のためであると推定された。

文 献

- 1) 秋田利彦, 1951. 農化, **24**: 391.
- 2) 秋田利彦, 1951. 九大農学芸誌, **13**: 164.
- 3) Green, D. H., Herbert, D. and Subrahmanyam, V., 1940. J. Biol. Chem., **135**, 795; 1941. J. Biol. Chem., **138**: 327.
- 4) McElroy, W. D. and Spencer, D., 1956. "Inorganic Nitrogen Metabolism", p. 137.
- 5) 奥貫一男・瀬戸一郎, 1956. "酵素研究法 II", p. 391.
- 6) 大村浩久, 1956. J. Fac. Agr. Kyushu Univ., **10**: 365.
- 7) Quastel, J. H., Scholefield, P. G. and Stevenson, J. W., 1950. Nature, **166**: 940; 1952. Biochem. J., **51**: 278.
- 8) Virtanen, A. I. and Laine, T., 1939. Biochem. J., **33**: 412.
- 9) Virtanen, A. I. and Csáky, T. Z., 1948. Nature, **161**: 814.
- 10) Wilson, P. W. and Burris, R. H., 1947. Bact. Revs., **11**: 41.
- 11) 山藤一雄・張貞欽, 1944. 農化, **20**: 441.
- 12) 山藤一雄・近藤 弘・大村浩久, 1950. Enzymol., **14**: 153.
- 13) 山藤一雄・大村浩久, 1950. 農化, **23**: 321.
- 14) 山藤一雄・大村浩久, 1950. Enzymol., **14**: 120.
- 15) 山藤一雄・吉原典子, 1950. Enzymol., **14**: 124.
- 16) 山藤一雄・吉原典子・和田春子, 1950. Enzymol., **14**: 170.
- 17) 山藤一雄, 1951. Nature, **167**: 770.
- 18) 山藤一雄・秋田利彦, 1952. Enzymol., **15**: 313.
- 19) 山藤一雄・川上哲夫・篠原弘次郎, 1952. Enzymol., **15**: 199.
- 20) 山藤一雄・大村浩久, 1952. Enzymol., **15**: 296.
- 21) 山藤一雄, 1953. Nature, **171**: 745.
- 22) 山藤一雄・大村浩久・三浦道夫, 1953. Enzymol., **16**: 75.
- 23) 山藤一雄・吉原典子, 1953. Enzymol., **16**: 161.
- 24) 山藤一雄・齊木みか・大村浩久, 1956. Enzymol., **17**: 371.
- 25) 山藤一雄・嶋村陸夫・大村浩久, 1956. Enzymol., **17**: 359.
- 26) 山藤一雄・大村浩久・吉原典子・吉武 充・大山信雄, 1958. Enzymol., **19**: 180.
- 27) 山藤一雄・饒島 豊・大村浩久・吉田 勉, 1959. Enzymol., **21**: 37.

Summary

The glucose dehydrogenase was purified from acetone powder of cattle liver. The enzymatic activity was estimated spectrophotometrically by following the increase of the optical density at 340 m μ , the reduction of the coenzyme of the glucose dehydrogenase, in the reaction mixture, which consists of enzyme, DPN and glucose. However, the increment of the absorption could not be attained when glucose had been substituted for glucose oxime, indicating that oxime could not be dehydrogenated by the glucose dehydrogenase. Furthermore, the

enzymatic formation of DPNH by the glucose-glucose dehydrogenase system did not be influenced by addition of glucose oxime, pyruvate oxime and hydroxylamine. However, the rate of the reaction was suppressed by the extract of acetone precipitate from fowl liver and this inhibition was recovered by hydroxylamine. In connection with the similar procedure of the spectrophotometric estimation of the enzymatic oxidation and reduction of oxime, devised in our laboratory, some supplementary experiments were carried out concerning the effect of buffers and that of the concentration of glucose upon the glucose dehydrogenase. Thus, it was established that, even when glucose oxime had been used in those cases, the variation of the extinction at $340\text{ m}\mu$ was attributed to oxime itself, which receive and donate the electron, but not to the glucose-glucose dehydrogenase system probably contaminated.

Then, the carboxylase was prepared from baker's yeast and its activity was assayed with a Warburg manometer by determining the amounts of carbon dioxide liberated from pyruvate. In this case too, pyruvate oxime as well as α -ketoglutarate was not effective as the substrate of this carboxylase preparation in place of pyruvic acid. Furthermore, the decarboxylation from pyruvate did not be influenced by several oximes of pyruvic acid, α -ketoglutaric acid, acetone and glucose. In contrast with the case of the glucose dehydrogenase, however, the evolution of carbon dioxide was repressed by hydroxylamine, although the initial rate of the decarboxylation did not be inhibited and the time until the end of the reaction was almost the same with and without hydroxylamine. Therefore, the inhibition might be ascribed to the decrease of pyruvate, the enzyme substrate, on account of the formation of oxime. These phenomena were also observed with the raw extract of yeast.

Thus, it was suggested that, as a result of the formation of oxime, the ability of glucose and pyruvic acid as the enzyme substrate of the respective relevant enzyme was lost and consequently, in relation to the activation of the oximase and the transoximase, the disturbance of the metabolisms in cell might be brought about.