

## 尿素によるジホスホピリジンヌクレオチドの酵素的還元III : 鶏肝臓の精製酵素について

大村, 浩久  
九州大学農学部

箴島, 豊  
九州大学農学部

堤, 養之輔  
林兼産業株式会社

安永, 昌博  
味の素株式会社

他

<https://doi.org/10.15017/21564>

---

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 19 (1), pp.67-84, 1961-11. Faculty of Agriculture, Kyushu University

バージョン :

権利関係 :

## 尿素によるジホスホピリジンニュークレオチド の酵素的還元 III

鶏肝臓の精製酵素について

大村浩久・箴島 豊・堤 養之輔\*  
安永昌博†・原口 敏‡

Enzymatic reduction of diphosphopyridine nucleotide  
with urea

III. On the purified enzyme of fowl liver

H. Omura, Y. Osajima, Y. Tsutsumi,  
M. Yasunaga and S. Haraguchi

鶏肝臓、家蚕組織およびパン酵母から調製した酵素標品に尿素の存在下に DPN の還元を触媒する酵素活性が認められた。<sup>5)</sup> これは尿素を水素供与体、DPN を受容体とする一種の水素転移反応であることを示唆するが、酵素だけでなく酵素反応そのものも従来全く知られていない。とくに同じ酵素液にアンモニアからヒドロキシルアミン、次亜硝酸、亜硝酸を経て硝酸を生ずる脱水素酵素系も含まれており、しかも尿素の場合と同じようにこれらの窒素化合物がそれぞれ水素供与体として作用し、DPN が受容体として DPNH に還元される水素転移反応であり、またこれら酵素反応の諸性質も非常によく似ている。一方生物組織には尿素を分解してアンモニアを生ずる酵素ウレアーゼも広く分布しているので、尿素による DPN の還元はウレアーゼによるアンモニア生成反応と、このアンモニアを基質、DPN を助酵素とする脱水素作用との共働反応である可能性もまた無視出来ない。そのため前報<sup>6)</sup> においてはまずこの点を確かめるために同一の酵素液を用い同一の反応条件で尿素による DPN の還元とアンモニアによる場合とを比較した。こうして反応の諸性質に非常に多くの類似点が認められる反面、最適温度、基質阻害、TPN の還元性、反応生成物あるいは共存する硝酸還元系による DPNH の再酸化等の諸点に本質的な差異が認められた。これらは使用した酵素液にウレアーゼ活性がほとんど認められない事実とともに、尿素による DPN の還元はウレアーゼとアンモニア脱水素酵素の共同作用で行われる二次的なものではなく、尿素が水素供与体として直接作用しているとの推定をより明らかにするものである。

反応は DPNH の生成を分光光度計を用い 340 m $\mu$  の吸光度の増加で測定している。しかし酵素液にはアンモニアと硝酸との間の循環酵素系も含まれていて、それを構成する 6 酵素も同じく DPN を助酵素とするためそれらの活性も DPNH の増加または減少を求

めて測定される。従つてこの場合、もしアンモニア脱水素系と硝酸還元系とが同時に作用するならば、340 m $\mu$  の吸光度の変化は両者の差を示すものであつて互に拮抗していることが推定される。勿論硝酸還元系は DPNH のほかに FAD と無機磷酸イオンとを必要とし、<sup>4,11,12</sup> しかも後者はアンモニア脱水素系を抑制するので DPNH の減少だけを専ら測定することができる。これに反しアンモニア脱水素系は FAD とともに無機磷酸イオンを含まない組成の反応液を用いればその活性だけが求められる。<sup>10,11,12</sup> このように反応液の組成を適当に選ぶことによつて循環系の一方だけを測定することができるが、さらにはこの両者を完全に分別することが望ましい。幸にアンモニア脱水素系と硝酸還元酵素系とはヒドロキシアパタイトに吸着した後、これから溶出する場合に顕著な差があつて、溶媒を適当に選ぶことによつて完全に分けることができ、しかも同時に酵素の比活性も高められた。<sup>13</sup> 尿素酵素の場合少なくとも1時間以内では硝酸、亜硫酸、ヒドロキシルアミンらは生成されず、従つて FAD および無機磷酸イオンを加えても DPNH の再酸化は起こらない事は既報の通りであつて、特別に考慮する必要はないようである。しかし 340 m $\mu$  の吸光度の増加で活性を測定しているので、アンモニア脱水素系の場合と同様に硝酸還元酵素系を含まない酵素液を用いることが更に望ましいのは当然である。このため酵素の性質がアンモニアの場合と極めてよく似ていることに基づいてゲル処理に対する挙動を追及した結果、アンモニア脱水素系と全く同様に比較的高い濃度の醋酸ソーダによつて出され、しかもその比活性はゲル処理前の約 90 倍にも高められることが認められた。こうして硝酸還元酵素系を含まない精製酵素液を調製できるようになつたが、アンモニア脱水素系の場合は無機窒素循環系の一部としての精製であつて硝酸還元酵素系も同時に回収利用した。しかし尿素酵素に関する本研究では還元系の利用は考える必要もないので酵素調製に際しても多少の改良の余地が残されているわけで若干の検討を行なつた。

## 実 験

### 酵素活性の測定

酵素の活性は DPNH の生成を常法通り日立分光光度計 EPU-2 型、液層 10 mm のセルを用い、反応液の 340 m $\mu$  における吸光度 ( $-\log T$ ) の増加 (+) で測定した。DPN の還元量はその分子吸光係数 9.43 を利用し吸光度の増加の値から計算することが出来るが、一般に使用した DPN の量も一定であり反応後の全量にも変化がないので単に反応液の吸光度の増加で示した。

反応液の組成も既報<sup>9</sup> のものに準じたが、研究の進展に伴つて適宜変更し本報では通常次のものを用いた。酵素液 1.0 ml, 0.05% DPN 溶液 1 ml,  $5 \times 10^{-8}$  M 尿素溶液 0.5 ml, 0.2 M トリス緩衝液 (pH 7.5) 0.5 ml に H<sub>2</sub>O 1.0 ml を加えて全量 4.0 ml としたが実験の条件に応じ H<sub>2</sub>O を利用して調節した。例えば酵素液の固有吸収が強い場合には 0.5 ml を使用し、また基質濃度は後述するようにその終濃度  $10^{-4}$  M からかなりの広範囲に亘つて酵素活性には影響しないが無機窒素循環系と比較する場合を考慮して上記の使用量を定めた。こうして 30°C に 30 分間作用させてその前後の吸光度を測定して増加した値を求めた。

生物組織には多数の DPN と共働する酵素系が存在し、またそれに対する水素供与体その他の諸因子も含まれているため、これらの反応系による DPN の変化も避けられない。

しかも使用した酵素液程度の精製では完全に除くことは出来ないので、尿素的の代りに水を加えた対照区も設定しその吸光度の変化を尿素区のものから控除して補正し真の酵素反応の値を求めた。

酵素液は新鮮な肝臓組織から毎日調製したがその活性は始終変動したので、比較のためには酵素液の蛋白含量当りの吸光度の増加をも計算した。蛋白含量は Lowry ら<sup>3)</sup>の報告に従い、銅フォーリン法により次のように測定した。酵素液を適当に稀釈しその 0.5 ml に 0.1 N NaOH 0.5 ml, 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  と 0.1% 硫酸銅-1% 酒石酸カリソーダ 50:1 混合液 5 ml を加え 37°C に 10 分間放置する。次いで 1 N NaOH に対応するようにアルカリ度を定めたフォーリン試薬 0.5 ml を加え 37°C にさらに 20 分間放置した後、日立光電比色計 EPO-A 型で赤色フィルターを用いてその吸光度を測定した。我々が用いた比色計については液層 10 mm のセルを用いた場合人の血清アルブミン (N 含量 15.95%) について求めた標準曲線から計算式  $Nr = E \times 56.34$  が得られ、これによつて蛋白態酵素の量が計算される。こうして通常反応液の蛋白態酵素 mg 当りの吸光度の増加を求めた。

#### 酵素液の調製

前報で強調したように酵素の性質はアンモニア脱水素酵素のものと非常によく似ていて精製操作によつても同一分画に得られる。即ち磷酸石灰に吸着した場合硝酸還元酵素系は醋酸ソーダの 0.01 M と 0.1 M との間で溶出されるが尿素酵素はアンモニア脱水素酵素系とともに 2 M ないし 4 M で得られる。さらに特に著しい特性として磷酸の効果があり還元系では不可欠の因子であるが脱水素系では逆に阻害される。しかしこれまでの研究では、酵素は新鮮肝臓をまず磷酸緩衝液に磨碎懸濁し加温抽出している。勿論この抽出液からアセトン沈澱またはさらにゲル処理を行ないしかも数時間流水透析して使用しているので別段差支えはないようであるが、磷酸阻害の機構は明らかでないために全く影響はないという保障はない。さらに磷酸依存性の硝酸還元酵素系は利用しないので、むしろ初めから磷酸塩の使用を避けて酵素液を調製した方が好ましいようにも思われるのでまずこれについて検討した。

新鮮な雞肝臓 60 g を 20 ml の蒸溜水に Waring ブレンダーを用いて磨碎懸濁し、これを 2 等分しその各々に pH 7.0 の 0.2 M 磷酸又はトリス緩衝液 40 ml と水 50 ml とを加え、それぞれ 35°C で 30 分間加温抽出し常法に従つてアセトン B 標品を調製した。磷酸塩の場合赤橙色の沈澱約 6 g, トリスではその半量約 3 g の黄橙色沈澱が得られた。これをさらにそれぞれ水 30 ml に溶かし、その一部はアセトン B 酵素として活性の測定に用いた。残りはゲルに吸着し 2 M 醋酸ソーダで溶出した残渣から 20 ml の 4 M 醋酸ソーダで溶出してゲル処理酵素液を得た。これらの粗製および精製酵素液をセロファン管で流水に対して 3 時間透析した後その酵素活性を測定した。尚比較のために尿素と同一量の硫酸を用いてアンモニア脱水素酵素力を求めた。その結果を第 1 表に示す。

第 1 表から明らかなようにトリス緩衝液で調製した酵素による DPNH の生成速度は磷酸緩衝液を用いて得た酵素による場合よりも高い。しかもアセトン B 沈澱の収量或は試験した酵素液中の蛋白質含量は逆に後者で前者の約 2 倍にも達するため蛋白量当りの比活性はトリスの場合更に高くなる。換言すると磷酸塩はその蛋白質抽出効果においてトリス

Table 1. Effect of extracting solvent on the activity of the enzyme solution.

| Substrate        | Urea      |        |             |        | Ammonia   |        |             |        |
|------------------|-----------|--------|-------------|--------|-----------|--------|-------------|--------|
|                  | Acetone-B |        | Gel-treated |        | Acetone-B |        | Gel-treated |        |
|                  | P         | T      | P           | T      | P         | T      | P           | T      |
| Protein-N, mg/ml | 2.78      | 1.53   | 0.727       | 0.343  | 2.78      | 1.53   | 0.727       | 0.343  |
| -log T           | +0.050    | +0.095 | +0.198      | +0.103 | +0.019    | +0.090 | +0.050      | +0.045 |
| -log T/mg N      | +0.018    | +0.062 | +0.206      | +0.312 | +0.007    | +0.059 | +0.069      | +0.130 |

P or T means phosphate or Tris buffer respectively, as the solvent of the first extraction from liver tissues for the purification of the enzyme.

緩衝液よりもすぐれているが、非酵素蛋白即ち不純蛋白の量を増加するに過ぎない。しかもこの操作中酵素活性は磷酸塩により多少悪影響を受けている事がアセトン B 酵素において認められるがゲル処理では認められなかつた。このことはアセトン B では抽出に用いた磷酸塩が残っているがゲル処理によつて更に精製するともはや抽出溶媒の影響は消失し不純蛋白の量だけによる比活性の低下が認められるに過ぎない事を示唆する。

酵素液の色も両緩衝液の血球或は血色素に対する効果の相違に基づくものと推定されるが、アセトン B の段階では磷酸塩を使用した場合には淡赤色ないし淡赤橙色であるに反しトリスでははるかに稀薄であつて黄橙色ないし黄色を帯びるに止つた。さらにゲル処理を行なうとほとんど無色透明の酵素液が得られ前者の場合まれに淡く黄色に着色した。いずれの場合にも酵素液自体の吸収もトリスにおいて磷酸使用のものよりも低かつた。これ等は酵素標品と吸収スペクトルとの関係が明らかに示した。

第1表の実験にならつて肝臓 40 g に水 60 ml を加えて粉碎懸濁、低速遠沈して 110 ml の懸濁液を得た。これを2等分し各々 55 ml に 0.2 M 磷酸又はトリス緩衝液 15 ml を加えて常法通り抽出しアセトン濃度 33% ないし 55% で沈澱する B 分画それぞれ約 3 g 及び 1.5 g を得た。引続き 30 ml の水に溶かし、その 10 ml ずつは直にセロファン管で3時間流水透析しアセトン B 酵素液とした。20 ml の酵素液は B 分画沈澱量の3倍、即ち磷酸区で 6 g、トリス区で 3 g のヒドロキシアパタイトを加え攪拌吸着させ 2 M 醋酸ソーダで洗滌溶出後、残存ゲルに 4 M 醋酸塩溶液 20 ml を加えて溶出、遠沈上澄を同じく流水透析してゲル処理酵素液を調製した。色調は前記の通りであつて、その吸収スペクトルはアセトン B 酵素液 15 倍、ゲル処理酵素液 2 倍、それぞれ水で稀釈して測定した。第1図にこれを示す。

酵素液は何れも 250 m $\mu$  に極小、275 m $\mu$  に極大吸収を示し酵素蛋白に基づくものと思われるが、さらに 415 m $\mu$  にも第2の吸収極大が認められた。その上磷酸塩の場合は 545 m $\mu$  および 580 m $\mu$  にも小吸収が存在したがトリス酵素には認められず平坦もしくは徐々に減少した。ゲル処理による吸光度の減少はいずれの場合でも極めて顯著であつて 275 m $\mu$  と 415 m $\mu$  両極大値の間の吸収はとくに 320 m $\mu$  から 385 m $\mu$  付近にかけてほぼ平坦または甚だ浅い凹部を示しているが、ゲル処理を行なわない粗酵素液では 370~380 m $\mu$  付近に明瞭な極小値が認められた。第1図の曲線は吸光度の関係から稀釈度が異つているため

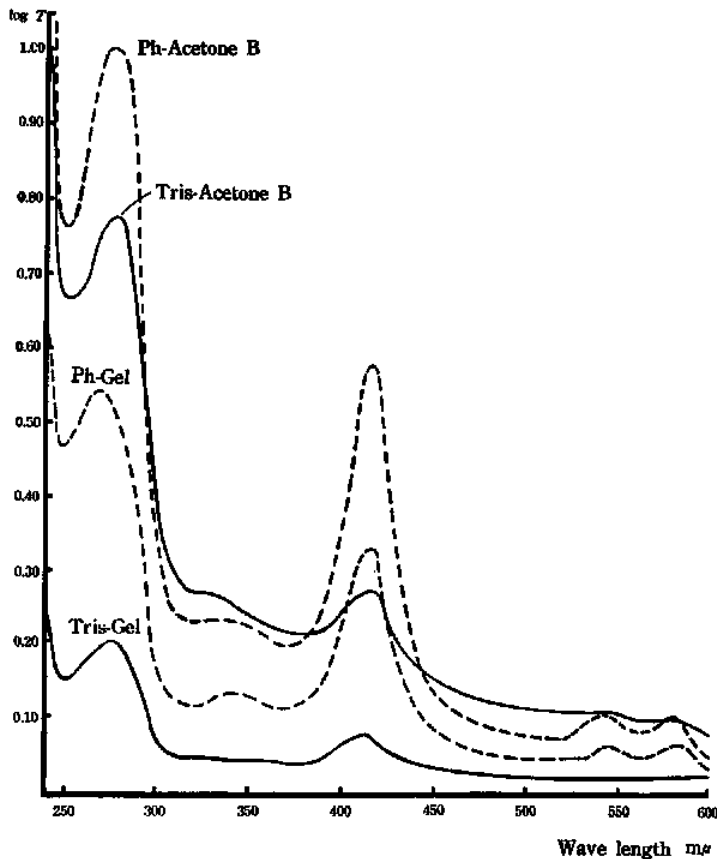


Fig. 1. Absorption spectra of the enzyme solutions.  
30 ml of each enzyme solution is correspond to 40g of fresh liver,  
respectively. Absorptions were estimated on the 15 times diluted  
acetone-B and two times geltreated ones.

そのままには比較出来ないで、同一条件の酵素液の吸光度に補正し主要な波長でその値を比較した。第2表は原肝臓 10g から 30 ml 酵素液に相当するものの値である。

370 ないし 380 m $\mu$ 、及び 520 ないし 530 m $\mu$  の極小値はアセトンB標品でははつきり見られるものであるが、ゲル処理区ではほぼその波長を中心としさらに広い範囲にわたって平坦または極めて浅い凹部を示す事は上記の通りであつて明確に指摘出来ないがここではその中の最小値を示した。またトリス酵素では長波長部に吸収のピークが認められないので比較は行なわなかつた。

こうしてアセトンB酵素およびゲル処理精製酵素共に磷酸塩を用いた場合がトリスの場合よりも酵素自体の吸収は大きくとくに精製酵素ではアセトンB酵素のものの吸収比より倍加する。酵素液中の蛋白濃度は蛋白質に基づく吸収と推定される 275 m $\mu$  での極大値の吸収比がそれぞれ 1.3 及び 2.6 と磷酸塩を用いて調製した酵素液が高く、銅-フォーリン

Table 2. Absorption values of the enzyme solutions at various important wave length.

| Wave length, m $\mu$     |     | 250   | 275   | 370-380 | 415   | 520-530 | 545   | 565   | 580   |
|--------------------------|-----|-------|-------|---------|-------|---------|-------|-------|-------|
| Mark                     |     | min.  | max.  | min.    | max.  | min.    | max.  | min.  | max.  |
| Acetone-B                | P   | 5.655 | 7.538 | 1.448   | 4.298 | 0.533   | 0.750 | 0.578 | 0.728 |
|                          | T   | 4.96  | 5.79  | 1.553   | 2.048 | —       | —     | —     | —     |
|                          | P/T | 1.14  | 1.30  | 0.93    | 2.10  | —       | —     | —     | —     |
| Gel-treated              | P   | 0.459 | 0.539 | 0.108   | 0.326 | 0.042   | 0.061 | 0.047 | 0.060 |
|                          | T   | 0.147 | 0.204 | 0.040   | 0.076 | —       | —     | —     | —     |
|                          | P/T | 3.12  | 2.64  | 2.70    | 4.29  | —       | —     | —     | —     |
| Gel-treated<br>Acetone-B | P   | 0.081 | 0.072 | 0.075   | 0.076 | 0.079   | 0.081 | 0.081 | 0.082 |
|                          | T   | 0.030 | 0.035 | 0.026   | 0.037 | —       | —     | —     | —     |

P or T means the preparation which was made from the extract of liver with phosphate or Tris buffer respectively.

法で測定した値と概ね一致する。とくに差の顕著なものは所謂 Soret 帯に相当する 415 m $\mu$  の吸収であつて磷酸塩酵素のものはトリスの場合に比べてそれぞれ 2 倍或は 4 倍の吸収を持ち、酵素標品が前者で赤色ないし赤褐色と相当の赤色を帯びているが、トリス標品では黄橙色ないし淡黄色であり、さらに又ゲル処理によつて両標品ともに色の減少が著しくとくに後者ではほとんど無色にまで達する事実を明白に示している。しかもゲル処理によつて両酵素液の吸光度の比が増大することはその外観的色調の差をさらに開くことを意味する。吸光度の低下の顕著なゲル処理の場合にもトリス使用酵素標品の低下度は磷酸標品の低下度の 2 倍以上に達し、ゲル処理の効果もトリス標品において磷酸のものよりも優れていることを示唆する。この吸光度の減少は磷酸酵素液では測定した波長の全域に亘つてほぼ均一に 1/12~1/14 に低下するが、トリス標品においては極小部の低下度は極大部におけるものよりも大きく、それぞれ 1/33~1/40 及び 1/27~1/28 に減少した Soret 帯に相当する 415 m $\mu$  の大吸収よりも長波長部ではさらに著しい。

つぎに吸収曲線の傾斜を隣接する極大値と極小値との比で比較し第 3 表に示す。アセトン B 標品に於いては磷酸酵素においてトリスの場合よりも 275 m $\mu$  の蛋白吸収、血色素に基づくと思われる 415 m $\mu$  の吸収はいずれも大きくとくに後者は著しい。第 2 表でも述べ

Table 3. Comparison of absorption values at various important wave length.

| Ratio                    |     | 265<br>250 | 275<br>370-380 | 415<br>370-380 | 415<br>520-530 | 415<br>275 | 545<br>520-530 | 545<br>565 | 580<br>565 | 545<br>580 |
|--------------------------|-----|------------|----------------|----------------|----------------|------------|----------------|------------|------------|------------|
| Acetone-B                | P   | 1.33       | 5.21           | 2.79           | 8.06           | 0.57       | 1.41           | 1.30       | 1.26       | 1.03       |
|                          | T   | 1.17       | 3.72           | 1.31           | 2.65           | 0.35       | —              | —          | —          | —          |
|                          | P/T | 1.14       | 1.40           | 2.27           | 3.04           | 1.54       | —              | —          | —          | —          |
| Gel-treated              | P   | 1.17       | 4.99           | 3.02           | 7.76           | 0.60       | 1.45           | 1.30       | 1.28       | 1.02       |
|                          | T   | 1.39       | 5.10           | 1.90           | 4.47           | 0.37       | —              | —          | —          | —          |
|                          | P/T | 0.84       | 0.98           | 1.59           | 1.74           | 1.62       | —              | —          | —          | —          |
| Gel-treated<br>Acetone-B | P   | 0.88       | 0.96           | 1.08           | 0.96           | 1.05       | 1.03           | 1.00       | 1.02       | 0.99       |
|                          | T   | 1.19       | 1.37           | 1.45           | 1.69           | 1.06       | —              | —          | —          | —          |

P or T means the preparation which was made from the extract of liver with phosphate or Tris buffer respectively.

たように磷酸酵素はゲル処理によつて波長全域に亘つて均一に吸光度を減少するので吸収の高さにはほとんど変動がないが、トリス酵素では極小値の低下度は極大値のものよりも大きいので吸収の傾斜は却つて増加した。しかもその場合においても酵素液の赤色の一指標と思われる 415 m $\mu$  の吸収の高さは磷酸塩を使用して調製した酵素液が大きい。蛋白の吸収に対する Soret 帯の吸収比は磷酸酵素で約 0.6, トリス酵素で約 0.35 であつていずれの点からも両酵素の色調の差異が説明される。磷酸塩使用区に見られる 545 m $\mu$  及び 580 m $\mu$  の両吸収はアセトン B 及びゲル処理標品ともにほとんど同じ程度のものであつた。

酵素の活性試験ならびに酵素液の吸収曲線の検討から、酵素の調製には硝酸還元酵素系の利用を特別に考慮しない場合はトリス緩衝液を用いる方が望ましいことは明らかである。ただ多数の調製実験において磷酸緩衝液を用いた場合には常に活性をもつ標品を得たが、トリスでは全く活性を示さない場合も時々経験したがその原因は明らかでない。しかし活性ある酵素標品の場合にはその活性が比較的強いことは勿論である。

初めに述べたように、Tiselius 等<sup>9)</sup>に従つて調製したヒドロキシアパタイトの処理によつて無機窒素循環系のアンモニア酸化系と硝酸還元系とが完全に分別された。これは生物界におけるこの酸化還元系は可逆的なものであると従来考えられていた概念を少なくとも肝臓において訂正し循環系の存在を明らかにしたものである。即ちアセトン B 酵素水溶液をゲルと混合して酵素を吸着させ、醋酸ソーダで逐次濃度を高めながら溶出すると硝酸還元酵素系は 0.01 M と 0.1 M との間に得られ、一方アンモニア脱水素酵素系は 2 M と 4 M の間というかなり高い濃度で初めて溶出され、尿素酵素活性もこの分画に認められる。この場合のゲル使用量については詳細な検討は行なわれておらず、従来は蛋白質が完全に吸着されるに十分な量のゲルを使用した。即ちアセトン B 沈殿 7 g の場合、この水溶液に吸引濾過したゲル 50 g を加えて吸着させると多少蛋白が吸着されずに残るので、これより多量を最低限として通常 20 ないし 30 倍量を用いた。しかしゲルの調製、特にその熟成にかなり長時間を要するので無駄を避けることが望ましく、簡単に概略の目安を検討した。

ゲルは通常冷蔵庫に保存し、使用に際しては吸引濾過する程度に水分を除いて秤取した。アセトン B 酵素 8 g を水 10 ml に溶かして 5 ml ずつ等分し、20 g (100° 3 時間乾燥して 7.6 g) または 8 g のゲルを加え攪拌吸着後、それぞれのゲルから常法通り溶出し 12 ml ごとの酵素液を調製しその活性を求めた。

第 4 表に示すように何れの場合にも酵素活性は強く同じ程度の吸光度の増加が認められた。ゲルの使用量が多い場合調製した酵素液は黄赤色を呈するがゲル量の少ない場合はその色調は薄くなつた。これに対応して酵素液の蛋白含量も前者が高かつた。従つて酵素の比活性は後者のものが前者よりも高い。これらの事実は比較的少量のゲルでよいことを示すものであつて、酵素はゲルに吸着され易く、ゲルの

Table 4. Effect of amounts of gel.

| Gel used, g      |         | 20     | 8      |
|------------------|---------|--------|--------|
| Protein-N, mg/ml |         | 0.73   | 0.45   |
| -log T           | Ammonia | +0.245 | +0.240 |
|                  | Urea    | +0.371 | +0.315 |
| -log T/mg N      | Ammonia | +0.336 | +0.533 |
|                  | Urea    | +0.508 | +0.700 |



量を増すことは不純蛋白の吸着量を増し溶出されて酵素に夾雑するに過ぎないことを示唆する。勿論ゲルの熟成度に支配されることは当然であつて 20 g でも十分活性が得られるが、8 g の場合未熟のゲルを使用した際に十分な活性が得られないことも経験した。

こうして酵素液の調製は従来のものと本質的には変化はないが上述のように硝酸還元酵素系を回收利用しない場合には一応次のように行なえばよいと思われる。

新鮮な肝臓を pH 7.0 ないし 7.5 の M/15 トリス緩衝液 (もしくは磷酸緩衝液) 3 倍容に Waring ブレンダーで粉碎懸濁し 35° の温湯に浸漬して時々攪拌しながら 30 分間温めて抽出する。直ちに冷凍遠心機を用い 6000 r.p.m., 0°C で 10 分間遠心分離する。上澄液を、NaCl-氷混合寒剤で -10°~-15°C に冷却し、半容の予め同様に冷却したアセトンを攪拌しながら徐々に添加する。5~10 分後 6000 r.p.m. で 10 分間冷却下に遠心分離してその上澄液を採る。前と同様に半量の冷アセトンをさらに加え、5~10 分間放置後 10000 r.p.m. で 10 分間遠心分離してアセトン濃度 33% と 55% との間で沈殿する部分を集める。この沈殿が前報で使用した酵素分画であつて、我々は便宜上アセトン B 標品とよんでいる。これを約 10 ml の蒸留水に溶し、沈殿の 4~5 倍量のヒドロキシアパタイトゲルを加え氷冷下に攪拌しながら 5 分間吸着させた後、6000 r.p.m. で 5 分間遠心分離する。上澄液

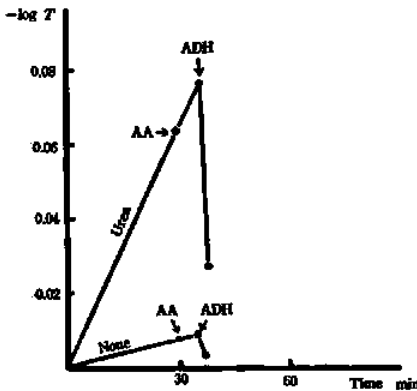


Fig. 2. DPNH formation with urea.

透析はとくに夏季も低温で行なうことが望ましい。このため我々は 4°C の冷室で、さらに水道水は氷水の中に浸した金属蛇管を通して予め冷却した後透析槽に導いて出来るだけ低温で透析する事に努めた。

このようにして調製した精製酵素を用いて反応させると第 2 図に示すように 340 m $\mu$  の吸光度が増加する。30 分後に 0.2 M アセトアルデヒドを 0.1 ml 加えたが吸収は引続いて増加した。この反応液にさらに Wallenfels 等の方法<sup>9)</sup> でパン酵母から調製したアルコール脱水素酵素、50 倍稀釈液 0.1 ml を添加すると前報アセトン B 酵素の場合と同様に吸収は直ちに減少した。アルコール脱水素酵素は DPN に特異的であつて DPNH を水素供与体としアセトアルデヒドを受容体とするものであるので、反応液における 340 m $\mu$  の吸収の増加は勿論 DPN の還元に基づくものであることを示す。またアセトアルデヒドだけ

を除いたゲルに pH 7.5 に調節した 2 M 醋酸ソーダ 20 ml を加え同じく氷冷しながら 5 分間攪拌して溶出し、遠沈後非酵素部を含む上澄液を除く。ゲル沈殿に 10 ないし 15 ml (必要量) の 4 M 醋酸ソーダを加え、同様に攪拌溶出して 10000 r.p.m. 10 分間遠心分離する。微量に浮遊するゲル微粒子を除くために上澄液を濾過した後セロファン囊に入れ 3 時間流水透析し、無色ないし微黄色の酵素液を得る。

アセトン B 酵素を用いる場合には、前報に記述したように沈殿を 57% の冷却したアセトンで更に 3 回洗滌した後水に溶し同様に 3 時間流水透析する。

を加えても吸光度の低下は起らないことは調製したゲル処理精製酵素液にはアルコール脱水素酵素は含まれていないことを明らかに示す。

### 磷酸の影響

無機窒素循環系の発見の端緒は磷酸塩の特異的な効果を見出したことであつて、酵素反応で最も普遍的に使用される磷酸緩衝液を用いない場合にはアンモニア、ヒドロキシルアミン、次亜硝酸及び亜硝酸或はオキシムによる DPN の酵素的還元が認められる。これに対して磷酸塩があればこれらの反応は認められず、しかも逆に硝酸、亜硝酸、次亜硝酸およびヒドロキシルアミン或はオキシムによる DPNH の酸化が FAD と共存した場合に起こる。即ち磷酸塩は FAD と共に硝酸還元酵素系やオキシマーゼに必須の因子であつてアンモニア脱水素酵素系を抑制して硝酸塩の還元作用を優先させる。こうして無機窒素循環系における反応の方向が規制されるものと思われる。従つて酵素反応の測定に際しては使用する緩衝液の選択が最も重要な事項であつた。

尿素の場合にも類似の現象が認められる事はアセトン B 酵素を用いアンモニアと比較して確かめられた。しかしこのことは磷酸塩が酵素ないし酵素反応の阻害剤として DPNH の生成を直接抑制するのか、あるいは使用したアセトン B 酵素液には硝酸還元系も含まれているため、酵素液中に微量にでも含まれる可能性のある FAD 及び硝酸、亜硝酸等水素受容体のために生成した DPNH が直に DPN に再酸化されて外観上 DPNH の生成が認められない間接的なものかの何れかであろう。ゲル処理によつて硝酸還元系を含まない酵素液が得られるようになったので上記可能性の何れかを決定するために改めて試験した。

Table 5. Effect of buffers on the enzymatic activity.

| Buffer | Tris   | Veronal | Acetate | Phosphate |
|--------|--------|---------|---------|-----------|
| -log T | +0.082 | +0.052  | +0.038  | +0.007    |

まずアセトン B 酵素の場合と同様に数種の緩衝液を用いて酵素活性を測定したが、第 5 表に示すようにアンモニア脱水素酵素と全く同一の傾向が見られ、トリス、ペロナール及び醋酸緩衝液の順に活性が認められた。しかし磷酸緩衝液では反応が起らず磷酸塩が酵素反応自体を阻害することは明らかである。これらの結果はすべて硝酸還元酵素系を含むアセトン B 酵素の場合と一致するものであつて、磷酸の効果は DPNH の再酸化に基づく間接的なものである可能性は否定される。

このことをさらに確実にするためにトリス緩衝液を用いた正常の反応系で DPNH を生成させ、30 分後に pH 7.5 の 0.2 M 磷酸緩衝液を 0.5 ml 添加し引続いて 20 分作用させた。緩衝液の添加によつて反応液が稀釈され吸光度は従来のもとの多少異なつてくるために同じ 0.5 ml の水を加えた対照区についても同じ条件で反応の進行を測定した。第 3 図に示すように水を加えた対照区では引続いて 340 m $\mu$  の吸光度の増加が起こつているが磷酸塩を加えると吸光度の増加も減少も認められず反応は停止することを意味する。尿素の代わりにアンモニアを用いて同時に行なつた測定の結果全く同様の現象が確かめられた。アセトン B 酵素の場合には硝酸還元酵素系も含まれているのでアンモニア区では磷酸塩の添加により DPNH の減少が起こつたが、ゲル処理酵素では尿素区と同様に減少も認められず、

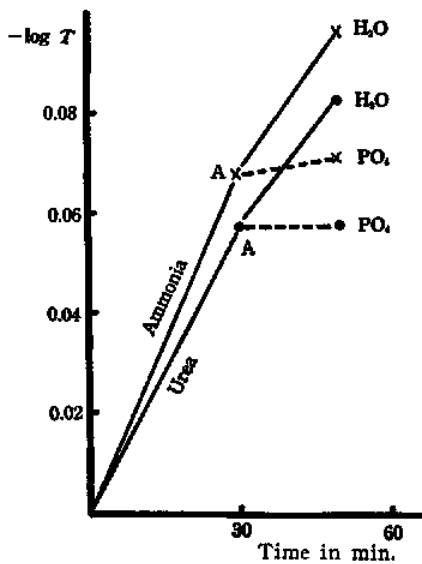


Fig. 3. Effect of phosphate on the enzymatic reaction.

At point A, phosphate or H<sub>2</sub>O was added into the reaction mixtures.

る。粗酵素液では酵素液自身のもつ吸光度が大きいため高い酵素濃度では反応は測定出来なかつた。しかし精製操作により第1図或は第2表に示すように酵素液だけの吸収は著しく減少し、ゲル処理酵素標品の場合蛋白態窒素含量 1 mg 程度までは困難なく使用することが出来た。

Table 6. Effect of amounts of phosphate on the enzymatic activity.

| Conc. of phosphate in reaction mixture, M | 0      | 10 <sup>-7</sup> | 10 <sup>-5</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-1</sup> |
|---|--------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| -log T                                    | +0.055 | +0.048           | +0.044           | +0.030           | 0                |

Reaction mixture: 10<sup>-3</sup>M urea 1.0 ml, enzyme solution 1.0 ml, 0.025% DPN 1.0 ml, 0.2 M Tris buffer 0.5 ml, phosphate buffer (pH 7.5) 0.5 ml, Total 4.0 ml.

Table 7. Effect of amounts of enzyme on the reduction of DPN.

| Enzyme solution, ml | 0.25   | 0.50   | 1.0    | 2.0    | 3.0    |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| -log T              | +0.049 | +0.066 | +0.098 | +0.137 | +0.185 |
| -log T/mg N         | +0.544 | +0.347 | +0.265 | +0.185 | +0.165 |

Reaction mixture: 5×10<sup>-3</sup>M urea 0.5 ml, 0.2 M Tris buffer (pH 7.5) 0.5 ml, DPN (2.4 mg/ml) 0.5 ml, enzyme + H<sub>2</sub>O 3.0 ml, Total 4.5 ml.

Enzyme solution contained 370.8<sub>7</sub> protein-N per ml.

本酵素液には硝酸還元系は含まれていないことを示す。こうして磷酸塩の効果は DPNH の生成を直接阻害するということが出来た。

こうして磷酸塩は一種の阻害剤ということが明らかにされたので、その阻害効果を試験するために反応系に種々の濃度に磷酸緩衝液を加え酵素活性を測定した。第6表に示すように磷酸塩の影響も一般の阻害剤と同様にその使用量に依存し添加量の減少に伴つて阻害効果も低下したが、かなり微量でも阻害作用が認められた。

#### 酵素量の影響

一般に酵素反応に於いては反応生成物は使用する酵素の量に応じて増加するものであつて本酵素でも例外でない事はアセトン B 沈澱からの粗酵素液ですでに確かめたが第7表に示すように精製酵素でも同じ傾向が認められた。

ここでも反応は厳密には直線関係を示さず蛋白態窒素当りに換算した比活性は酵素の量が少ないほど高い値を示した。しかし反応生成物の絶対量は酵素量の多いほど高いのは当然である。

### 基質濃度の影響

酵素作用は一般に基質濃度にも比例するが、アンモニア脱水素酵素系ではその顕著な特性の一つに基質阻害があり、アセトン B 酵素では反応液の終濃度  $10^{-4}$  M 付近で最も強い活性が認められ基質濃度の増加に伴って反応速度は低下し  $10^{-2}$  M では極めて僅かの活性しか検出されなかつた。これに対して尿素の場合にはこの中間的特性を示し、 $10^{-4}$  M までは一般酵素或はアンモニア脱水素酵素系と同様に DPNH の生成量は増加するが、これを越した場合前二者のように反応生成物は増加も減少もせずほとんど一定に保たれた。このことについても硝酸還元系を含む粗酵素液では正逆両反応系の差によるという懸念もあるが、還元系を除いた精製酵素でも第 8 表のようにアセトン B 酵素と全く類似の性質が認められた。

Table 8. Effect of urea concentration on the enzymatic activity.

| Conc. of urea in reaction mixture, M |        | $10^{-6}$ | $10^{-5}$ | $10^{-4}$ | $10^{-3}$ | $10^{-2}$ | $10^{-1}$ |
|--------------------------------------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| -log T                               | Exp. 1 | +0.033    | +0.040    | +0.091    | +0.087    | +0.092    | +0.086    |
|                                      | Exp. 2 | +0.007    | +0.017    | +0.037    | +0.038    | +0.035    |           |

Exp. 1 and Exp. 2 were carried out in the same manner but with different enzyme preparation which had been purified by the same procedure from different liver.

しかもこの効果は酵素の活性には無関係であつて、第 8 表には同一条件で異なつた個体の肝臓から別々に調製した酵素標品を用いて、同じ条件で活性を測定した代表的実験例を示した。このように酵素活性がかなり異なつても尿素濃度  $10^{-4}$  M でそれぞれ最高に達し以後濃度には無関係となる。アンモニア脱水素酵素系の場合をも含めて最適基質濃度  $10^{-4}$  M の値は他の酵素に比べて極端に低く酵素活性が弱い一因でもある。

### 反応時間の影響

酵素反応を支配する因子に反応時間も含まれていて本酵素作用も例外ではない。アセトン B 酵素の場合特にその反応初期において時間と比例することはすでに報告したが精製酵素でも勿論同様である。第 4 図は同一条件で測定した結果の代表的なものであるが、活性が強い酵素標品では短時間で反応はほぼ終了し以後緩慢に進行する。これに対して弱い活性のものでは前者よりは長い時間直線的に DPNH を生じた。しかしいずれにしても約 20 分で反応速度はかなり低下した。

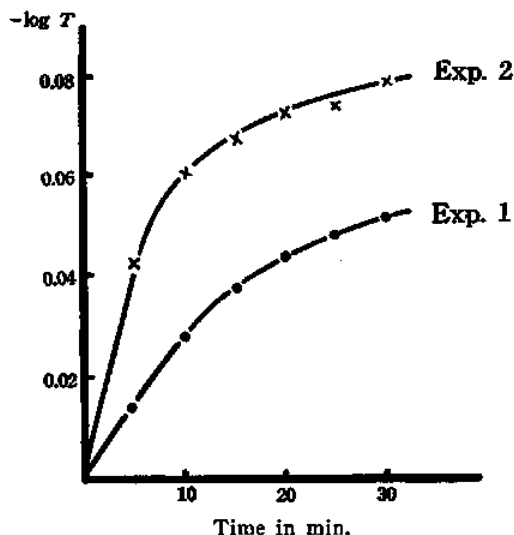


Fig. 4. Activity-reaction curves.

Both reactions were carried out under the same condition except that the different enzyme solutions which had been prepared by the same procedure from the different liver were employed.

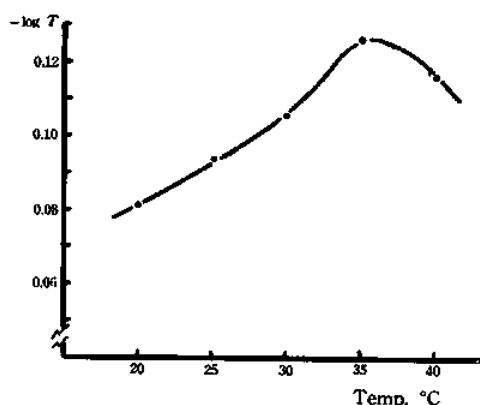


Fig. 5. Activity-reaction temperature curve.

の手掛りであつて、可逆的なものであるとの従来の一般概念を否定したものである。尿素酵素もアンモニア脱水素酵素と同様である事は前報に示したが、その反応温度においてアンモニア脱水素酵素は 30°C に最適値をもち 40°C 付近までこれに近く、かなり広い適温域を示したが、尿素酵素では 35°C に比較的明瞭な最大値が得られた。これは硝酸還元酵素系を除いたゲル処理酵素でも同様なことが第 5 図の活性—温度曲線から示された。ここで 40°C においては反応液に若干の濁りを生じ吸光度の測定を乱す場合も起こつたので、測定に先立つてあらかじめ熱処理を行なうことが望ましい。アセトン B 酵素の場合尿素の最適温度はアンモニアの場合よりも 5° 高かつた。数回反復してつねに 35°C に最適値を認めたとはいへ、その差が少ないため多少の疑問を払拭することは出来なかつた。しかし精製酵素でも全く同様に最適温度として 35°C が認められたので確実であると言ふことが出来る。

#### pH の影響

アセトン B 酵素の場合無機窒素循環系に含まれる全酵素は何れも pH 7.5 付近に活性の最高値を持ち尿素酵素もまた同様であることは前報に記載した。しかし基質を加えない盲験区における酵素液だけによる吸光度の固有増加はこれと異なりアルカリ側で強かつた。通常この値を基質を加えた試験区の実測値から控除して酵素活性を求め最適 pH 値を定めている。酵素だけによる DPNH の生成能は少なくとも本実験に用いたゲル処理程度までの精製酵素では完全には除かれず pH の影響についても同様の傾向が認められた。

Table 9. Effect of pH on the enzymatic activity.

| pH     | Substrate          | 7.0              |                  |        | 7.5              |                  |        | 8.0              |                  |        |
|--------|--------------------|------------------|------------------|--------|------------------|------------------|--------|------------------|------------------|--------|
|        |                    | Ammonia          | Urea             | None   | Ammonia          | Urea             | None   | Ammonia          | Urea             | None   |
| -log T | Estimated Activity | +0.036<br>+0.004 | +0.047<br>+0.015 | +0.032 | +0.175<br>+0.127 | +0.108<br>+0.060 | +0.048 | +0.096<br>+0.029 | +0.071<br>+0.004 | +0.067 |

第 9 表はとくに盲験値の大きい酵素標品についての一例であるが、このような極端な場

従つてその比活性は反応の初期において高いことが示され反応速度の測定には少なくとも 10 分ないし 20 分に限定する事が望ましいと思われる。唯本報ではアセトン B 酵素を用いた従来の経過との比較のために 30 分間での吸光度の増加を測定した。

#### 反応温度

アセトン B 酵素に含まれる無機窒素循環系において、硝酸還元系は 40°C 5 分加熱により大部分の活性を失つたがアンモニア酸化系は却つて活性化された。この事実はアンモニア酸化と硝酸還元とが異なつた酵素系によつて行なわれることを示した最初

合でも尚 7.5 付近に酵素活性の最適値は認められる。盲験値がどの酵素に基づくかは明らかでないがこれに関連して Nason ら<sup>7)</sup>の主張は考慮に値する。即ち Klausmeier<sup>8)</sup>が枯草菌の細胞抽出液で DPNH または TPNH がヒドロキシルアミンの存在下に酵素的に酸化され、又  $\text{NH}_4\text{OH}$  を加えると DPNH が再生され TPN も微量だが同様に還元されることを認め、本反応はヒドロキシルアミン還元酵素の逆反応によるものであつて酵素的アンモニア脱水素作用を初めて細胞外酵素で証明することに成功したと主張した。しかしこの場合  $\text{NH}_4\text{OH}$  だけが有効であつて  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  或は  $\text{NH}_4\text{Cl}$  のような塩類は無効であつた。Nason らは同一菌株の酵素液を用いてこれを追試し  $\text{NH}_4\text{OH}$  の代りに  $\text{KOH}$  や  $\text{NaOH}$  でも同様に 340 m $\mu$  の吸光度が増加する事を認めた。従つて DPNH の生成はアンモニア脱水素酵素によるものではなく酵素液に含まれる他の DPN 共軛酵素系によるものであつて反応液の pH が  $\text{NH}_4\text{OH}$  によつてアルカリ側に移動して活性化されることに基づくものであることを指摘し Klausmeier もこれを承認したと報告した。事実 Klausmeier の実験でもヒドロキシルアミン還元が pH 7.2 で行なわれ  $\text{NH}_4\text{OH}$  添加後の DPNH の再生は pH 8.1 で行なわれている。雞肝臓酵素でも同様にアルカリ側で強くなつているがこれを控除した真の活性は 7.5 に最高の値を示している。しかもアンモニアの場合には  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  でも有効であり、尿素活性は pH 8.0 においてはほとんど消失し盲験値のみになつていて、Nason らの危惧もここでは問題外である。

### DPN の量

酵素活性に影響する因子の最後のものに DPN の使用量がある。これは水素受容体として反応の主要構成因子をなすものであつてこの量もまた DPNH の生成速度に関係をもつ。第 10 表はその一例であつて反応条件は同一であつて DPN の量だけを変えた。DPN は LePage 法<sup>9)</sup>によつてパン酵母から調製した粗製品であつたが活性の測定には差支えなかつた。実験は純度 25% のものを用いたものである。

Table 10. Effect of amount of DPN on the enzymatic reaction.

| DPN used, mg |                    | 1.0              |        | 3.0              |        | 6.0              |        |
|--------------|--------------------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|
| Pure DPN, mg |                    | 0.25             |        | 0.75             |        | 1.50             |        |
| Substrate    |                    | Urea             | None   | Urea             | None   | Urea             | None   |
| -log T       | Estimated Activity | +0.067<br>+0.038 | +0.029 | +0.130<br>+0.100 | +0.030 | +0.145<br>+0.116 | +0.029 |

尿素を加えない盲験区では DPN の量に関係なく僅少でほぼ一定の吸光度増加を示したが、試験区では量に応じて約 0.75 mg まではほぼ直線関係を示して増加し、それ以上での増加はごく僅かになつて一定になつた。

### アンモニア脱水素酵素との関係

アセトン B 酵素でアンモニア脱水素酵素と尿素酵素とは非常によく似ているが根本的に異なる性質も多少は認められることを指摘した。その主要なものの一つは TPN の効果であつてアンモニアの場合には水素供与体としては全く作用しないが尿素に対しては活性は低

Table 11. Effect of TPN.

| Substrate |            | Ammonia     | Urea             |
|-----------|------------|-------------|------------------|
| -log T    | DPN<br>TPN | +0.110<br>0 | +0.080<br>+0.027 |

いが DPN の代りに受容体としての機能を示し TPN 自身は還元される。この事は精製した酵素についても全く同様であつて第11表はこれを明らかに示している。

ここで DPN はパン酵母よりの自製品純度 35% のものを用い、TPN は米国 N.B.C. 製純度 90% のものであつて、使用量は純度において同一量を含むようにした。

この外基質阻害の有無、最適温度等アセトン B 酵素で観察したものと同一相違が認められたが、さらに毎日新しい肝臓から酵素を調製して研究に使用したのでその都度両活性を同一酵素液について同一条件で測定した。

Table 12. Comparison of activity in various enzyme preparations.

| Enzyme preparation, No. |         | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 11     |
|-------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| -log T/mg N             | Ammonia | +0.480 | +0.331 | +0.184 | +0.130 | +0.106 | +0.069 | +0.150 | 0      | 0      | +0.064 | 0      |
|                         | Urea    | +0.730 | +0.501 | +0.321 | +0.312 | +0.277 | +0.234 | +0.206 | +0.160 | +0.079 | +0.053 | +0.052 |
| Solvent                 |         | T      | T      | T      | T      | T      | P      | P      | T      | T      | P      | T      |

T or P means Tris or phosphate buffer respectively, as the solvent of the first extraction from liver tissues for the purification of the enzyme.

Determination of the activity was carried out under the same condition but different enzyme preparations.

第12表はその例であつて酵素液は上記方法で調製した。しかし前にも述べたように比較のために酵素液の蛋白窒素 mg 当りの吸光度の増加で表わした。このように尿素の場合とアンモニアの場合との活性は必ずしも一致せず極端な場合には一方の活性は全く認められない事も経験した。しかし最初にも述べたように最初の抽出はトリス緩衝液の方が比活性の強いものが得られた。

## 考 察

酵素活性に磷酸塩が阻害作用を及ぼすことから酵素の抽出に磷酸緩衝液を使用することは多少の矛盾を感じた。勿論アセトン分画或はさらにゲル処理を行ないさらに流水透析を行なうので、少なくとも反応を阻害する磷酸塩は除かれて遊離しては存在しないと思われる。事実従来の研究は総てこのように磷酸塩で抽出したのから調製した酵素液を用いてつねに活性が認められている。しかしこのことは完全に磷酸塩を除いたということを示すも意味するものではなく、測定された活性は完全な活性を示すものではなくて若干抑制されたものである可能性もあり得る。また磷酸阻害の機構が明らかでない現状では、酵素が非可逆的な阻害を受けるという恐れもあるわけで、たとひ低濃度の磷酸塩で組織から抽出するという磷酸の影響が多くの不純物でかなり遮蔽される初期抽出の過程においてのみ酵素は磷酸と接触しても若干の悪影響は免れない。このような点を考慮すると磷酸塩より

はトリス緩衝液を使用する事が望ましいと推定される。この前提でとくに酵素の調製について実験を行なつたわけで尿素酵素だけでなくアンモニア脱水素酵素活性も磷酸塩の場合よりは強い酵素液が調製された。しかしこれだけで酵素は調製操作中に磷酸塩によつて非可逆的阻害を受けていると断定することは出来ず、最後の決定は磷酸阻害機構のより詳細な研究とその解明をまたなければならぬ。トリス緩衝液の利点としてはこの阻害の危惧がないことのほかに、得られる酵素蛋白の量は磷酸の場合のほぼ半量に過ぎず、しかも酵素活性の全回収量は同等或はすぐれているので酵素液の比活性即ち蛋白当りの活性はさらに高くなる可能性がある。換言すると磷酸塩はその蛋白抽出効果においてはトリスよりもすぐれているがこれは不純蛋白を増すに過ぎない。その上にゲル処理の効果も吸収スペクトルの比較からトリス標品がすぐれていることが示された。又これとともに酵素液の色調もトリスの場合はほとんど無色透明であつて若干赤色ないし黄色を帯びる磷酸塩区のものよりは好ましく、従つて酵素液単独の吸光値もかなり低いために磷酸塩酵素よりは多量の酵素を使つて活性を測定することが可能となる。

このように酵素液調製のための抽出溶媒としては従来使用した磷酸緩衝液よりはトリス緩衝液の方が酵素液の活性や色調の点ですぐれたものが得られる。しかし未知原因のために時々全く活性の認められない場合が起こる。これは酵素の調製にとつては致命的な欠陥ともいえることであつて、この点が解決されて初めて調製法は確立される。この点磷酸塩は活性その他についてトリスに多少劣るとはいへ、かなり安定した結果が得られる。これ等の点を考慮して現状では研究の目的に応じて抽出溶媒としては両者を適宜選択して使用することが望ましい。

これらに関連してゲルの使用量も検討された。従来は酵素液の蛋白が完全に吸着されるまでかなり多量の吸着剤が用いられてきたがむしろ少量に用いる方が比活性の高い精製酵素液が得られることが明らかにされた。ゲルは調製後その熟成にかなり長い期間を要することからも好都合であつた。このことは酵素蛋白が比較的早くゲルに吸着され易いことを示唆するものであつてゲル量の増加は不純物の回収をひき起すに過ぎず比活性の低下を来す。これは酵素が組織から抽出され易くトリスで十分であり、抽出効果の高い磷酸塩の使用は同じく不純蛋白の増加をもたらすだけであることとかなりの共通性が推定される。

肝臓組織は周知のように極めて多種の DPN 共働酵素系を含んでいる。そのため単に吸光度の変化だけで酵素活性を測定する場合には全く不測の影響も起る可能性が否定されず、出来るだけ精製した酵素を用いなければならぬ。特に前報に用いたアセトン B 酵素液のように、アンモニア脱水素酵素系と硝酸還元酵素系とを含みしかもヒドロキシルアミン、次亜硝酸及び亜硝酸は共通の基質であると同時に反応生成物でありアンモニア或は硝酸は基質もしくは反応生成物として作用し、その上に活性は DPNH の増加または減少で測定されるので反応組成の構成や結果の解釈はかなり慎重でなければならぬ。そのためにはアンモニア脱水素酵素系と硝酸還元酵素系とを分離した反応系を用いる事が望ましいのは当然であつてゲル処理により初めてその目的が達成された。尿素酵素においても同様であつて、とくに酵素の一般性質がアンモニア脱水素酵素のものと同様によく似ているため十分注意しなければならない。アセトン B 酵素において両活性に若干の根本的な差があ



る事を認めたがこれは硝酸還元酵素系を全く含まなくなるまで精製度の進んだゲル処理酵素で確かめれば更に確実である。このようにしてゲル処理酵素でもアセトンB酵素と全く類似の結果が得られた。特に尿素濃度は  $10^{-4}M$  で最高の活性に達しさらに濃度を高めても活性の増加は認められず、またアンモニア脱水素酵素のように阻害も起らなかった。しかも酵素活性の強弱に拘わらず認められるものであつて、 $10^{-4}M$  と著しく低い基質濃度で最高活性を示すことは、他の DPN 酵素に比べて酵素活性が極めて低く反応がこれ迄発見されなかつた一因をなしている。つぎに反応の最適温度も  $35^{\circ}C$  であつた。アンモニア脱水素酵素のものは  $30^{\circ}C$  であつてその差  $5^{\circ}C$  は実験誤差の範囲内として注意していたが、精製しても尚  $35^{\circ}C$  に最高活性が認められることは尿素酵素の特性として承認してよい可能性を示す。しかし TPN が尿素によつては DPN 同様に還元されるがアンモニアでは全く還元されないことは尿素酵素の特性であり、また異なつた個体の肝臓から同一操作で調製した多くの酵素液の尿素酵素活性とアンモニア脱水素酵素活性とは決して比例するものではなく、極端な場合には一方だけしか認められなかつたことは、両酵素活性が異なる事を示す根拠を提供する。しかしいずれにしてもゲル処理の段階ではなお不十分であつて尿素酵素とアンモニア脱水素酵素とを分別する課題は残されている。

### 総 括

酵素の精製について補足実験を行ない、最初の抽出にトリス緩衝液を用い、また吸着用ゲルの添加量を減ずる事により、磷酸緩衝液を用いた従来のものよりも活性が高くしかもほとんど無色の酵素液を調製することが出来た。これに関連して両者の吸収スペクトルについて比較した。さらに精製酵素液について若干の性質を検討し粗酵素液の場合と同様の傾向が確かめられた。異なつた個体から同一方法で調製した多数の酵素標品の活性とアンモニア脱水素酵素力とは比例しないことが示された。

### 文 献

- 1) Klausmeier, R. E. and Bard, R. C., 1954. *J. Bacteriol.*, **68**: 129.
- 2) Le Page, G. A., 1947. *J. Biol. Chem.*, **168**: 623.
- 3) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Forr, A. L. and Randall, R. T., 1951. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265.
- 4) 大村浩久・篠島 豊, 1960. *農化*, **34**: 644.
- 5) 大村浩久・篠島 豊, 1961. *Nature*, **190**: 345.
- 6) 大村浩久・篠島 豊, 1961. *Agr. Biol. Chem.*, **25**: 487.
- 7) Roussos, G. G., 高橋 甫, Nason, A. 1957. *J. Bacteriol.* **73**: 495.
- 8) Tiselius, A., Hyertén, S. and Levin, Ö. 1956. *Arch. Biochem. Biophys.* **65**: 132.
- 9) Wallenfels, K. and Sund, H., 1957. *Biochem. Z.*, **329**: 17.
- 10) 山藤一雄・篠島 豊・大村浩久・田中孝夫, 1959. *Enzymol.*, **21**: 139.
- 11) 山藤一雄・篠島 豊・大村浩久・1960. *Nature*, **185**: 162.
- 12) 山藤一雄・篠島 豊・大村浩久・波多野昌二, 1960. *Enzymol.*, **21**: 245.
- 13) 山藤一雄・篠島 豊・1961. *Enzymol.*, **22**: 344.

### Summary

Supplementary experiments were carried out concerning the purification of the enzyme which catalyzes the reduction of DPN with urea. Tris buffer was found to be the better extracting solvent than phosphate to obtain the preparation of higher activity, although no activity was sometimes detected. It was established that amounts of hydroxylapatite gel so far employed can be decreased to make the enzyme solution without loss of activity.

Thus, the enzyme solution can be prepared as follows. Fresh liver was homogenized in 3 volumes of M/15 Tris buffer of pH 7.0 to 7.5 by a Waring blender. Phosphate buffer also can be employed in place of Tris. Homogenate was immersed in water bath of 35°C for 30 min. under agitation and centrifuged at 6,000 r.p.m. for 10 min. at 0°C. Then enzyme was fractionated with acetone at -10° to -15°C, except that centrifuging was carried out at 0°C. Half a volume of cold acetone was added dropwise into supernatant. After 5 to 10 min., precipitates formed were centrifuged at 6,000 r.p.m. for 10 min. and discarded. Similarly, supernatant was further mixed with half a volume of acetone and centrifuged at 10,000 r.p.m. for 10 min. after standing for 5 to 10 min. Precipitate deposited between 33% and 55% of acetone refers to "Acetone-B preparation" which had been employed in the preceding studies. In this case, precipitate was washed three times with cold 57% acetone, dissolved in water, dialysed against running water for 3 hrs. and employed after centrifuging at 3,000 r.p.m. for 10 min.

Enzyme fractionated with cold acetone was further purified by treating with hydroxylapatite gel at 0°C. Gel was prepared according to Tiselius and kept for more than several weeks in cold. Acetone-B precipitate was dissolved in 10 ml of water. Four to 5 times the amount of the precipitate of gel were added into this aqueous enzyme solution, stirred for 5 min. and centrifuged at 6,000 r.p.m. for 5 min. at 0°C. Deposited gel was mixed with 20 ml of 2 M sodium acetate which had been adjusted to pH 7.5 and stirred for 5 min. The mixture was centrifuged and the supernatant was discarded. Gel was again mixed with desired volumes of 4 M sodium acetate of pH 7.5, stirred well for 5 min. and centrifuged at 10,000 r.p.m. for 10 min. Supernatant containing the enzyme was dialysed against running water for 3 hrs. using cellophane tube after filtration. Thus, clear enzyme solution was obtained.

When Tris buffer was employed for extracting the enzyme from the original liver tissues, almost colorless final enzyme solution can be obtained, whereas very pale yellow color was remained in the enzyme solution in the case of phosphate. This fact might be supported by comparing absorption spectra of both kind of the enzyme solutions. Enzyme solution has two absorption maxima at 275 m $\mu$  and 415 m $\mu$ . Additional two small peaks at 545 m $\mu$  and 580 m $\mu$  were also observed, if the enzyme solution had been purified from the liver extract with phosphate. This enzyme solution has much steeper main peak at 415 m $\mu$  than that of Tris-enzyme. These observations might account for the difference of color of the enzyme solutions. Ultraviolet peak at 275 m $\mu$  may be attributed to protein. In general, decrease of absorption was brought about

by gel-treatment throughout the range of wave length estimated. Thus, disappearance of red color in the raw enzyme solution was explained. Since specific activity of the enzyme is generally referred to the enzymatic activity per protein, its increment by purification was also illustrated by the remarkable decrease in absorption at 275  $m\mu$ .

Enzymatic activity was estimated spectrophotometrically by determining the increase in absorption at 340  $m\mu$ , formation of DPNH, according to the foregoing paper. However, reaction mixture was slightly modified as to consist of the following composition; 1 ml of the enzyme solution, 1 ml of 0.05 % DPN solution, 0.5 ml of  $5 \times 10^{-4} M$  urea solution, 0.5 ml of 0.2 M Tris buffer of pH 7.5 and 1 ml of  $H_2O$  to make a final volume 4 ml. According to experimental conditions, composition of the reaction mixture can be modified, total volume of 4 ml being kept by changing the volume of water. Absorption of the reaction mixture estimated at 0 min. and after 30 min. at 30°C by Hitachi's spectrophotometer EPU-2, with light pass of 10 mm and difference was calculated. Since liver contains many kinds of DPN-conjugated enzyme systems, a little formation of DPNH can be observed, as had been emphasized so far, even by the purified enzyme. Therefore, control experiment containing no urea was also checked and the increase in  $-\log T$  was subtracted from those in tests. Since, enzymatic activity of the preparation varies from one material to another, the increase in absorption per mg of protein-N was sometimes calculated, especially for comparison.

Concerning the purified enzyme solution, some properties were investigated. However, any differences could not be established from those with acetone-B enzyme. DPN is reduced enzymatically in Tris, veronal or acetate buffer but not in phosphate buffer. Inhibiting effect of phosphate related to the concentration. Of course, enzymatic activity is approximately proportional to the amounts of enzyme or DPN and the reaction time. Rate of the enzymatic re-action, however, reaches to the maximum at  $10^{-4} M$  of urea, independent of the activity of the preparations. Much amounts of urea did not promote nor repressed the DPNH formation. DPN is reduced enzymatically with urea at highest rate at 35°C and pH 7.5, while the increases in  $-\log T$  in blank at alkaline range are higher than those in neutral range. As had been established with acetone-B enzyme, opposed to the ammonium dehydrogenase, TPN is reduced by the purified enzyme too, in presence of urea. Comparison of the activity of the urea-enzyme with that of the ammonium dehydrogenase in many preparations which had been purified by the same procedure but from different liver material indicated that both activities are not directly proportional each other. This observation also suggests that the urea-enzyme may be different from the ammonium dehydrogenase, although the properties are very likely.