

牛肝臓硝酸還元酵素に対するプリンの影響

大村, 浩久
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21491>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 17 (3), pp.197-204, 1959-12. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

牛肝臟硝酸還元酵素に対する プリンの影響*

大 村 浩 久

Effect of some purines on the nitrate reductase
of the cattle liver

Hirohisa Omura

動物組織の硝酸還元酵素がキサンチン¹⁾及びアルデヒド酸化酵素²⁾と極めて密接な関係を持つと主張されている事は繰り返し述べてきたが、キサンチン酸化酵素の反応生成物である尿酸は廿日鼠、牛等の哺乳動物ではプリン代謝系の中間体として更に変化を受け尿素を生ずる。之に反して雞等鳥類或いは昆虫類では最終生成物として排泄物中の主要成分である点に於て顕著な差異を示し、又牛肝臟抽出粗酵素液の硝酸塩還元はアセトアルデヒドによつて強く促進されるが³⁾廿日鼠及び雞肝酵素の作用は殆ど影響されないか又は却て多少阻害される傾向を示した。^{4,5)}

家蚕組織による硝酸還元阻害が主として尿酸に基く事から⁶⁾更にその前駆物質であるプリン類によつても等しく反応阻害が起る事を見出したが、^{7,8)}当然予測されたように廿日鼠及び雞肝臟のプリン代謝系に対しては若干の異なつた影響が観察されたにも拘らず硝酸還元阻害には何等の差異も認められなかつた。又他方抽出粗酵素液での硝酸還元作用は動物によつて異なるが精製酵素では大差なく^{9,10)}従つて肝臟の硝酸還元酵素に関して供試した3種の動物に於て本質的には差はないと推定される。

プリン類の阻害については廿日鼠、雞肝臟酵素共にプリン核の 1, 3 及び 7 位の窒素が反応阻害に重要な役割を演じ之等窒素と酵素の活性中心との結合が起るために阻害を惹き起すと推定した。事案廿日鼠肝臟抽出液の吸収スペクトルは紫外部特に蛋白の吸収に相当する部位に於てプリン類添加によつて多少の変化が起ることを測定したが、酵素液は多くの不純物を含むために酵素蛋白との結合を示すものと決定的に主張することは出来なかつた。

更に粗酵素液が硝酸還元酵素に水素供与系として共働し得る種々の脱水素酵素をも含むために、之等の酵素だけがプリン類によつて阻害されても硝酸還元阻害を二次的に惹起するため脱水素酵素系を除いた反応系での試験も必要である。又プリン類はキサンチン酸化酵素の基質でもあるため、その同族体は基質との拮抗効果を持つ事も考えられるが、そのためにも他の酵素系例えばアルデヒド酸化酵素系を主とする反応系を用いる事も好都合だと思われる。そこでアルデヒド酸化酵素力が特に強い牛肝臟組織を用い更にその精製酵素標品をも用いて補足実験を行つた。

* 硝酸還元酵素に関する研究, 第 14 報.

実 験

粗酵素液での試験 家蚕組織による硝酸塩の還元阻害はアセトアルデヒドを加えた場合を含む牛肝酵素についても認められ、この反応系を用いて家蚕内の阻害因子の分布を検討した事は既に述べた。⁹⁾ 従つて尿酸による阻害は明白な事でありその他のプリンによる影響も同様な事は廿日鼠ならびに雞肝酵素の場合から類推されるが、尿酸の外に特に之迄屢々引用したキサンチン酸化酵素の問題に関連して一応その基質であるキサンチン、ヒポキサンチンに限定してその阻害作用を、アルデヒド添加還元系と関連して記載する。

試験は総て前報⁹⁾に準じて行い新鮮肝臓組織 0.5g に相当する粗酵素液 5ml 宛を用いて行い、アセトアルデヒドは反応液中 $10^{-2}M$ になるように添加した。

家蚕微アルカリ抽出液から pH 4.2 で生じた沈澱を再び加熱抽出し之を長期間冷所に放置するか、濃縮すると少量ではあるが黄褐色の小粒子が得られた。この粒子は他の沈澱に比べて重く傾瀉して容易に分離出来た。これが家蚕組織に含まれる酵素阻害物の本体である事を廿日鼠肝臓酵素で確認し定性反応及び吸収スペクトルから尿酸である事を確認した。更に雞肝酵素についても同様の阻害が起る事を実証したが何れも 5mg の粒子を pH 6.0 の M/15 磷酸緩衝液に溶解し遠沈上澄を試験に供した。しかし粒子は不純物であつてかなりの不溶物を含むので今回は次のように行つた。

粒子 10mg を N/2 NaOH 2ml に溶解し少量の不溶物を遠沈除去する。透明な微黄色上澄液を H_2SO_4 で中和 pH 6.0 にするとかなりの量の沈澱が析出した。之を再び遠心分離し上澄液を水で 10ml とする。一方沈澱を極く少量の NaOH に溶解、同様に水で 10ml とし pH 7.2 の溶液を得“沈澱部”とした。この両成分の酵素に対する影響を試験した第 1 表の結果から、阻害物は“上澄部”に含まれ中和して直ちに生じた沈澱には存在しない事が判る。その上可溶性部は典型的な尿酸の吸収スペクトルを示した。

Table 1. Effect of particles isolated from silkworm tissue.

Fraction	None	Soluble			Precipitate
Amounts added, mg		2.0	1.0	0.5	0.5
NO ₂ formed, μM	32.0	4.8	7.8	10.4	34.2
Inhibition, %		85.0	75.6	67.5	—

Particles were isolated from silkworm tissue according to the procedure described in the foregoing paper.⁹⁾

10mg of the particles were dissolved in 2ml of N/2 NaOH and centrifuged. Clear pale yellow supernatant was adjusted to pH 6.0 with H_2SO_4 and considerable amounts of deposits were produced at once. After centrifugation, the clear supernatant was filled up to 10ml with H_2O and designated as soluble fraction. The precipitate was again dissolved in a small amount of NaOH and made up to 10ml with H_2O . This solution of pH 7.2 was precipitate solution. Therefore, 1ml of both fractions was corresponding to 1mg of the original particles.

牛肝酵素の硝酸塩還元はアセトアルデヒドによつて数倍も促進されるがそれに応じて家蚕組織による阻害は却て低下する事は既に報告した。之に反して雞肝酵素の場合、アルデ

ヒドの添加によつて硝酸還元が多少抑制されると共に尿酸阻害度は高められた。第2表は純尿酸による牛肝酵素の阻害を示すが、家蚕組織で観察したと同様に亜硝酸生成減少の絶対量は硝酸還元力が高められたアルデヒド添加区で多かつたが阻害度は対照区に比べて低い事は勿論である。

Table 2. Effect of uric acid.

Conc. of uric acid, M		0	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
Control	NO ₂ formed, μ M	6.4	1.6	2.9	4.9	5.4	5.9
	inhibition, %		75.0	59.4	29.4	15.6	7.8
Acetaldehyde, 10^{-2} M	NO ₂ formed, μ M	52.8	40.4	42.4	47.2	50.4	52.8
	inhibition, %		23.5	19.7	10.6	4.5	0
	time of MB decoloration, min.	33	37	34	33		

In control, methylene blue was not decolorated in 120min. at 40°C.

尿酸によつて酵素の硝酸還元が阻害されると同時にメチレンブルー脱色能も抑制された。しかしその影響は前者に対するよりも弱く硝酸還元阻害が行われている 10^{-4} M で既に脱色の遅延は認められなかつた。この事実はアルデヒド酸化酵素と硝酸還元酵素の異同を論ずる一根據となり得るものと思われる。この場合アルデヒドを加えない対照区では活性が弱く 40° 2時間の反応では完全な脱色は起らなかつたが定性的にはアルデヒド区と類似の傾向は観察された。

種々の酵素量を用いて反応液中の活性を変えるとそれに依じて同じ量の阻害剤による阻害度が変動する事も家蚕組織の場合既に述べたが、第3表は純尿酸で行つた同様の試験の結果である。

Table 3. Variation of amounts of enzyme.

Enzyme used, g*	0.1			0.3			0.5		
	0	10^{-3}	5×10^{-4}	0	10^{-3}	5×10^{-4}	0	10^{-3}	5×10^{-4}
NO ₂ formed, μ M	6.0	0.7	1.5	24.8	12.8	13.0	31.0	18.8	20.4
Inhibition, %		88.3	75.0		48.4	47.6		39.7	34.6

* Amounts of enzyme were expressed with that of original tissues from which enzyme solution was prepared.

このように廿日鼠、鶏の場合を含めて肝臓の硝酸還元酵素の活性が増せば阻害度を減少する傾向が認められたが第4表の実験もこの事実を支持するものである。肝臓組織の酵素活性に著しい個差がある事は屢々経験したところであつて同じ量の酵素を用い同一条件で測定しても亜硝酸の生成量は非常に異なつた。第4表にはそれぞれ異なつた個体の肝臓から同様にして調製した抽出粗酵素液の硝酸還元に対する 10^{-3} M 尿酸の影響を比較したが酵素活性の弱いもの程阻害度は大きい事が認められた。

Table 4. Variation of enzyme material.

No. of enzyme solution*		1	2	3	4	5
NO ₂ formed, μ M	control	29.4	31.2	40.4	50.4	52.8
	uric acid, 10^{-3} M	14.1	18.8	27.6	38.6	40.4
Inhibition, %		51.7	39.7	31.0	23.4	23.5

* Enzyme was prepared by the same procedure but from different liver and contained 0.5g original tissues.

次にキサンチン酸化酵素の両基質の影響を第5及び第6表に示す。アルデヒドを添加した酵素力と阻害度との関係は尿酸の場合と同様であつて、キサンチン、ヒポキサンチン共に全く類似したので第6表はアルデヒド添加区だけを示した。キサンチン、ヒポキサンチンによつて硝酸塩還元がアルデヒド酸化酵素を賦活した場合でも阻害されるが、メチレンブルーの脱色時間は短縮されてキサンチン酸化酵素が対照区に比べて強く働いている事は廿日鼠及び雞肝酵素の場合と同様であつた。

Table 5. Effect of xanthine.

Conc. of xanthine, M		0	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}
Control	NO ₂ formed, μ M	9.6	2.2	2.8	5.1
	inhibition, %		77.1	70.8	46.9
Acetaldehyde, 10^{-2} M	NO ₂ formed, μ M	37.0	28.5	29.0	33.0
	inhibition, %		23.0	21.6	10.8
	time of MB decoloration, min.	23	18	16	16

Table 6. Effect of hypoxanthine.

Conc. of hypoxanthine, M	0	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
NO ₂ formed, μ M	45.0	35.0	35.5	40.0	43.5	44.5
Inhibition, %		22.2	21.1	11.1	3.3	1.1
Time of MB decoloration, min.	23	17	16	15		

Reaction was carried out with acetaldehyde of 10^{-2} M.

従つて牛肝酵素でもキサンチン及びヒポキサンチンが恐らく酵素-基質結合体を作つてキサンチン酸化酵素作用を行い、同時に硝酸還元酵素の活性部を抑えているらしい凍が考えられる。又牛肝に於ても廿日鼠同様に脱色促進に於ける基質阻害現象も観察され尿酸生成系である雞の場合とはつきりした対称を示した。

之等の阻害が既に反応初期から起る事も第1図に示す通りでありその他のプリン類の影響についても同様であつて、牛肝酵素がアルデヒド賦活に於て著しく異なつているにも拘らずプリン阻害に関する限り特に廿日鼠の酵素と何等の差異は認められなかつた。

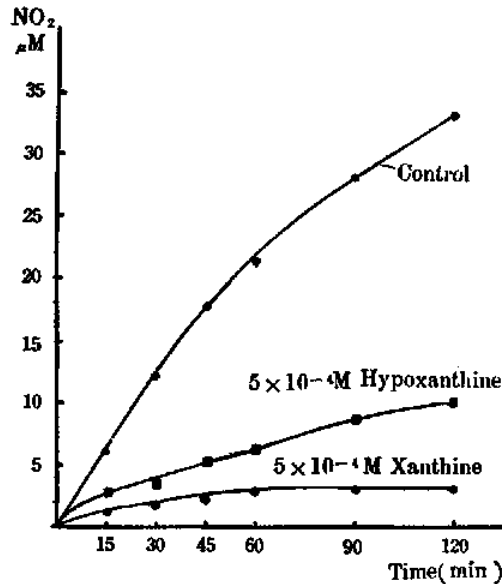


Fig. 1. Effect of the reaction time on the purine inhibition.

精製酵素での実験 前報⁹⁾で牛肝酵素の精製法を記載したが鶏肝でも同様にして調製出来た。この標品は非常に水に溶け易く淡黄色の透明な溶液となるが、冷所ではかなり長い期間保存出来る。しかしアセトアルデヒドを加えなければ活性を示さず透析粗酵素液の活性回復に有効であつた琥珀酸或いはグルタミン酸等は無効であつた。従つて本酵素標品を用いる時はアルデヒド酸化酵素とだけ共働した硝酸還元系であつて、固有機質が関与し組織内で行われていると考えられる雑多の酵素系の共働は総て排除された反応系と考えられる。唯この場合でも尚キサンチン酸化酵素力だけは伴われてその基質添加によつて強いメチレンブルー脱色力を示す事は既に報告した。⁹⁾

他方廿日鼠肝臓酵素でプリン添加により紫外部の吸収に多少の変動が起る事を認めたが、この場合硝酸還元酵素の細胞内分布に関する研究に基づいて¹¹⁾従来用いてきた粗酵素液を更に15000 r.p.m.で60分間高速遠心分離を行つて得た透明な抽出液について測定した。しかし尚硝酸還元酵素に共働すると思われる種々の脱水素酵素が含まれる可能性もあり更に水素供与体共他の補助因子の外全く無関係な可溶性物質も夾雑すると推定される。事実抽出液の酵素を精製すれば紫外部の吸収は減少し特に蛋白質に基く280 m μ の吸収極大の250 m μ での極小に対する比はかなり小さくなり吸収は平坦化した。従つて之迄報告してきたプリン阻害乃至吸収曲線の変化は肝臓に含まれる物質を基質とする脱水素酵素のみに基く可能性もあるので一応精製酵素で再検討するの必要を感じる。

酵素標品20 mg宛を用い2 × 10⁻² M アセトアルデヒドを添加した硝酸還元系に対する種々のプリン類の影響を測定した。又同時に酵素15 mgを水に溶解、5 × 10⁻² M プリン溶液0.15 mlを添加全量を3 mlとして可視部、更に10倍水で稀釈して紫外部の吸収スペクトルをベックマン DU型分光光度計を用いて測定した。

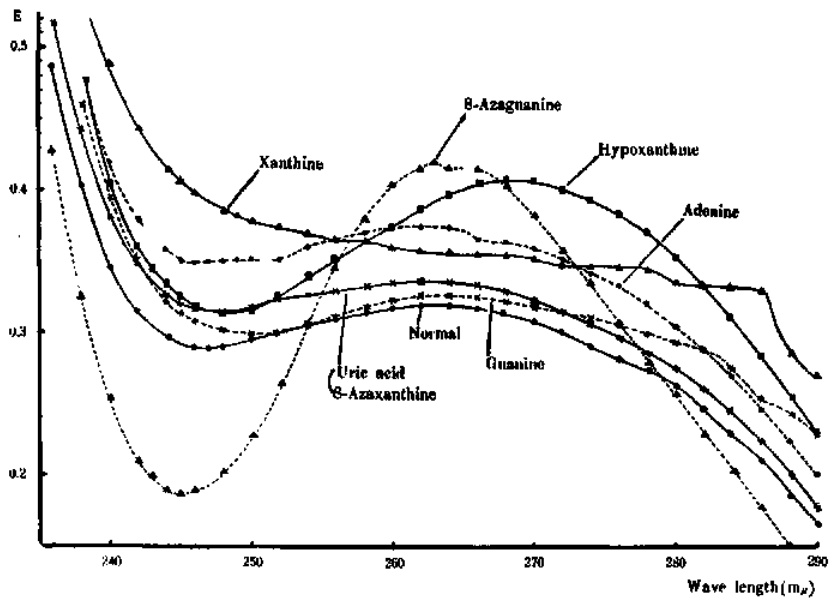


Fig. 2. Effect of some purine on the spectrum of purified cattle liver enzyme.

Table 7. Effect of purines on purified enzyme.

Conc. of purine, M		0	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}	5×10^{-6}	10^{-6}
Uric acid	NO ₂ formed, μ M	7.7	2.7		6.3		6.7
	inhibition, %		64.9		18.2		13.0
Xanthine	NO ₂ formed, μ M	6.1		2.0	3.0	3.0	3.0
	inhibition, %			67.2	50.8	50.8	50.8
Hypoxanthine	NO ₂ formed, μ M	6.1		2.9	3.8	3.9	4.5
	inhibition, %			52.5	37.7	36.2	26.2
Adenine	NO ₂ formed, μ M	4.2		0.9	1.2	1.4	2.2
	inhibition, %			78.6	71.4	66.7	47.6
Guanine	NO ₂ formed, μ M	4.2		2.7	3.6	4.2	
	inhibition, %			35.7	14.3	0	
Azaguanine	NO ₂ formed, μ M	8.4		0.8	1.2	1.5	2.0
	inhibition, %			90.5	85.7	82.1	76.2
Azaxanthine	NO ₂ formed, μ M	8.4		0.7	0.9	1.7	2.0
	inhibition, %			91.7	89.3	79.8	76.2

In each test 20mg of the enzyme preparation were used with 2×10^{-2} M acetaldehyde.

調製後約1ヶ月冷蔵したために酵素標品の活性は低下しているが第7表の結果は一応の傾向を示すものと思われ、プリン類が精製酵素に対しても阻害作用を示し特に8位の炭素が窒素で置換されたアザ化合物が強く還元を抑制した。又表には引用しなかつたがカフェイン、テオフィリンが殆ど無効な事も粗酵素液の場合と同様であつた。他方、可視部では明白ではなかつたが、第2図から紫外部の吸収スペクトルに若干の変化が観察されプリン阻害が酵素蛋白との結合に由来するとの前報での推定を支持するものと思われる。

尚スペクトルの変化特にキサンチンによるものは精製酵素がキサンチン酸化酵素活性をも常に示す事を報告した際、基質キサンチン、ヒポキサンチンの添加によつて酵素の吸収スペクトルが変化するか否かを観察する必要がある事を指摘されたが、¹²⁾ それに対する解答でもある。

このようにして従来から主張されているキサンチン酸化酵素の重要性は否定し得ないとしても之迄観察したプリン類の阻害現象特にキサンチン乃至ヒポキサンチンの影響から硝酸還元に関与する部分はキサンチン酸化酵素の活性中心とは異なると思われる推定は牛肝酵素にも適用される。

本研究に用いた費用の一部は文部省科学研究助成費によつた。

総 括

硝酸還元酵素に対するプリンの影響に関して牛肝酵素を用いて補足実験を行い、廿日鼠及び雞肝酵素に於けると類似の阻害効果を観察した。更にアセトアルデヒドの添加、酵素使用量の増加或は活性の高い酵素を用いて硝酸還元力を高めると阻害率は低下した。

アルデヒドを加えた精製酵素での硝酸還元系についても固有水素供与体及び硝酸還元酵素に共働する脱水素酵素を含む粗酵素液に於けると同様のプリン阻害が確められた。又精製酵素の紫外線吸収スペクトルもプリン類の添加により変化した。

文 献

- 1) Dixon, M. and Thurlow, S., 1924. *Biochem. J.* **18**: 989.
- 2) Bernheim, F. and Dixon, M., 1928. *Biochem. J.* **22**: 125.
- 3) 大村浩久, 1954. 九大農学芸誌, **14**: 423.
- 4) 大村浩久, 1956. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **10**: 365.
- 5) 大村浩久, 1957. 九大農学芸誌, **16**: 225.
- 6) 大村浩久, 1957. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**: 126.
- 7) 大村浩久, 1958. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **22**: 387.
- 8) 大村浩久, 1958. 九大農学芸誌, **16**: 517.
- 9) 大村浩久・高橋平八郎, 1959. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**: 83.
- 10) 大村浩久, 1959. 九大農学芸誌, **17**: 205.
- 11) 大村浩久, 1959. *Enzymologia*, **20**: 271.
- 12) 日本農芸化学会誌編集委員会, 私信, 1958年8月.

Summary

From a supplementary experiment with the cattle liver which contains much higher activity of the aldehyde oxidase than that of mouse and fowl livers, it was found that the nitrate reductase of the former was also inhibited similarly by some purines as cases of the latters. Furthermore, the rate of inhibition by uric acid was lowered when the activity of the nitrate reductase had been activated by addition of acetaldehyde, increase of the amounts of enzyme employed or selection of liver of high activity.

Concerning the nitrate reducing system of the purified preparation of cattle liver enzyme too, the purine inhibition coincided well with those of crude enzyme homogenate, though the former was not accompanied with the inherent hydrogen donators as well as some dehydrogenases which can couple with the nitrate reductase. A variation of ultraviolet absorption spectrum of the enzyme of high purity was brought about by addition of purines which suggest the combination of purines with enzyme protein.