

N-アセチルグルタミン酸合成酵素の活性変化 による尿素合成の制御機構

石 田 久 枝*

(昭和52年6月16日受付)

要 旨

尿素回路は単に受動的な窒素終末処理機構であるにとどまらず、生体の窒素平衡を維持する積極的な役割をになっている。尿素合成経路の初段酵素に必須の活性化物質であり、同時に尿素合成を調節する主要因のひとつである N-アセチルグルタミン酸 (AGA) を合成する特異的な酵素 (AGA 合成酵素) の生理的な意義を明らかにするため、*in vivo* での食餌条件に対応する本酵素活性の変化に焦点をしばって実験を行い、以下の結果を得た。

1) マウスを1日3時間の制限給餌で飼育して AGA 合成酵素活性を経時的に測定したところ、摂食開始後6~9時間にピークをもつ活性の日内変動が明らかになった。さらにピークがおもにアルギニンによる酵素の活性化倍率の上昇によるものであるところから、AGA 合成酵素蛋白質の何らかの質的変換による調節機構の存在が示唆された。

2) 蛋白質含有量の異なる合成食餌でマウスを飼育し8日間にわたる酵素活性の変化をしらべたところ、20%カゼイン食群にくらべて60%カゼイン食群で活性はやや上昇し、無カゼイン食では著しく低下した。この変化は同時に測定した尿素回路の3酵素の活性変化とほぼ同調していた。このことは AGA 合成酵素と尿素回路との緊密な連関を証明するとともに、AGA が長期的には合成酵素の量の変化によって制御されていることを示している。

Keywords: N-アセチルグルタミン酸合成酵素, 日内変動, 摂取蛋白質量, 尿素合成制御機構, マウス肝ミトコンドリア

略 語 一 覧: AGA; N-アセチル-L- グルタミン酸。

AGA 合成酵素: N-アセチルグルタミン酸合成酵素。

CPS-I; カルバミルリン酸合成酵素-I。

OTC; オルニチントランスカルバミラーゼ。

序 文

尿素は蛋白質やアミノ酸窒素の終末代謝産物であり、尿素回路の役割は、余剰窒素の処理といういわば消極的なものであると一般には考えられていた。ところが近年、種々の尿素合成調節機構が明らかにされてくるとともに、生体の窒素平衡の保持に対する尿素合成経路の積極的な役割が注目されつつある。なかでもアセチルグル

タミン酸 (AGA) は尿素合成初段のカルバミルリン酸合成酵素-I (CPS-I) の活性発現に必須の活性化物質であり¹⁾、尿素合成に対するその調節的役割が証明された^{2,3)}。さらに AGA を合成する特異的な酵素 (AGA 合成酵素) と L-アルギニンによるその活性化の発見⁴⁾は、本酵素が AGA 準位の変動を介して窒素代謝を調節する重要な因子のひとつであることを示唆している。

本論文では AGA 合成酵素の生理的意味を明らかに

* 千葉大学医学部第2生化学教室

HISAE ISHIDA: A Regulatory Mechanism of Urea Synthesis by the Activity of N-acetylglutamate Synthetase.

Second Department of Biochemistry, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280.

Received for publication, June 17, 1977.

するために、次の2つの *in vivo* の条件下における本酵素の対応を調べた。すなわち第1に摂食に伴う短期間の酵素活性の経時変化、第2に摂取蛋白質量の変化に伴う長期的な経時変化である。その結果、1) AGA 合成酵素活性に日内変動があること、2) 摂取蛋白質量の変化に対して酵素レベルでの適応があり、しかもそれが尿素回路諸酵素の適応にほぼ同調していることが明らかになった。

実 験 方 法

1. 実験材料

実験動物は、市販の固型飼料（船橋農場、蛋白質含量24%）で飼育された生後5週目の dd-Y 系雄性マウス（船橋農場）を用いた。0, 20, 60%カゼインを含む合成食は Harper²⁾の組成により調製した。[U-¹⁴C] グルタミン酸は Radiochemical Centre, Amersham, England より購入し、KH¹⁴CO₃ は Ba¹⁴CO₃ より調製した⁶⁾。CPS-I 活性測定に用いたオルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) は Marshall & Cohen⁷⁾に従いウシ肝より精製した。

2. 酵素標品の調製

マウスをエーテル麻酔下に失血死させ素早く肝を摘出し、それに氷冷の等張ショ糖溶液（9 ml/g liver）を加えてホモジナイズした。その一部をとってアルギナーゼの活性測定に用い、大部分のホモジネートより Myers & Slater⁸⁾の方法に準じてミトコンドリアを分離し、超音波で破碎後105,000 g で1時間遠心した上清をとり、これを用いて AGA 合成酵素、CPS-I、OTC の活性を測定した。なお AGA 合成酵素は不安定であり、超音波破碎の操作は予備実験の結果にもとづき常に同一条件下で正確に40秒間おこなった。

3. 酵素活性の測定

アルギナーゼは Brown & Cohen⁹⁾、CPS-I は Kerson & Appel¹⁰⁾、OTC は Marshall & Cohen⁷⁾に従って各々活性を測定した。

4. AGA 合成酵素活性の測定

重定・橘⁴⁾の方法に従い、¹⁴C-グルタミン酸を基質に用いて測定した。本酵素の活性は非常に低く、最大活性で測定しても基質として加えたグルタミン酸の0.1%程度が AGA に変換されるにすぎない。一方、グルタミン酸は生体内に広く分布するアミノ酸であり多数の酵素反応の基質となるため、今回用いたミトコンドリア上清のような粗酵素標品では ¹⁴C-AGA 以外の放射性代謝産物が大量に生成される。これらの中には AGA と簡

単には分離できないものも多く、合成された ¹⁴C-AGA を測定するために以下の操作を行って分離する必要がある。酵素反応液をまずダウエックス50 (H⁺ 型) のカラム (0.2ml) に通し、通過液をダウエックス1 (HCOO⁻ 型) カラム (0.2ml) にのせた。ダウエックス1に吸着した AGA を0.3M ピリジン-ギ酸緩衝液 (pH 4.0) で溶出し、溶出液を乾固後少量の水に溶かし濾紙にのせ、溶媒（エーテル：ベンゼン：ギ酸：水を21：9：7：2の割合で混合）中で約5時間展開し、AGA のスポットを切り出してカウントした。全操作を通じて AGA の回収率はほぼ80%であった。本酵素の活性が低いために、基質のグルタミン酸に微量の放射性不純物が混在しても非常に大きな誤差を生じうる。このため実験に先立って ¹⁴C-グルタミン酸をダウエックス50 (H⁺ 型) カラムに吸着、溶出を行い精製した。

実 験 成 績

1. AGA 合成酵素活性の日内変動

摂食に関連した本酵素の短期的な活性変化を明らかにするために以下の実験を行った。マウスを図1のように一定の明暗間隔、一定時間の給餌で3日間飼育したのち、24時間内の AGA 合成酵素活性の経時変化を3時間おきにしらべた。酵素活性は L-アルギニン存在下および非存在下に測定した。すでに報告されているように⁴⁾本酵素の活性が L-アルギニンで促進されることは重要な性質のひとつである。図1に示すように1 mM アルギニン存在下で測定した酵素活性は摂食開始後6時間で著明に上昇し、9時間で最高となるが、12時間後にはもとのレベル以下にまで低下した。一方、アルギニン非存在下の酵素活性の経時変化にも明らかな日内変動が観察されたが、その振幅は小さく、アルギニンによる活性化の程度（活性化倍率）は必ずしも一定ではなかった。以上の結果から、AGA 合成酵素の日内変動が明らかになったが、この場合の活性変化が短時間のうちにおこることから酵素量の増減のみによるものではなく、酵素の何らかの質的变化を反映したアルギニン活性化倍率の変化が関係していることが強く示唆された。

2. カゼイン食投与による尿素回路諸酵素および AGA 合成酵素の長期的変動

Schimke¹¹⁾は、ラット肝の尿素回路諸酵素の活性が摂取蛋白質量に応じて変動し4～8日間で新しいレベルに達する事を観察した。これは環境条件の変化への生体の合目的な対応のひとつで、いわば酵素レベルでの適応現象である。AGA 合成酵素にこのような適応の機構が

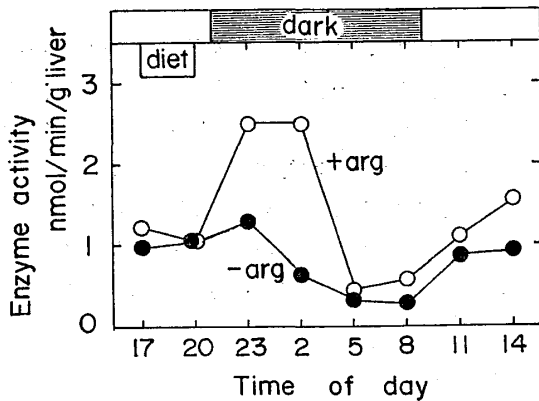


Fig. 1. Diurnal change in the activity of AGA synthetase. A total of 24 mice were kept under controlled lighting conditions (light on at 9:00 a.m., off at 9:00 p.m.) and fed on a normal laboratory chow (given at 5:00 p.m., and withdrawn at 8:00 p.m.) for three days. During the last 24-hour period, groups of 3 animals were killed every 3 hours, the mitochondrial fractions were immediately prepared from each mouse liver, and stored at 0°C as mitochondrial pellet. After the 24-hour period, all the mitochondrial fractions were resuspended in 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), sonicated, and centrifuged at 105,000 g for 1 hour. Enzyme activity was assayed in the reaction mixture containing 1 mM [14 C] glutamate (5,000 cpm/nmol), 0.5mM acetyl-CoA, 1 mM L-arginine, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 50mM Tris-HCl (pH 8.5) and the enzyme preparation (corresponding to 10 mg of liver) in a total volume of 0.1 ml. Incubation was performed for 30min at 37°C, and [14 C] AGA formed was isolated as described in the text. The activities represent the mean value of 3 animals assayed without L-arginine (●—●) or with 1mM L-arginine (○—○).

あればそれを明らかにし、同時に尿素回路との関連をしらべるために以下の実験を計画した。

マウスを3群に分けて、各々0、20、60%のカゼインを含む合成食で飼育した。食餌の変換後3および8日目に各群3匹ずつ殺してAGA合成酵素活性を測定すると同時に、尿素回路諸酵素のうちミトコンドリア内にあるCPS-IとOTCおよび細胞質にあるアルギナーゼを

Table 1. Effects of dietary protein on body weight, liver weight, and liver protein content in mice.

	Control	Casein contents in diet		
		0%	20%	60%
Body weight (% of control)	100*	72	113	122
Liver weight (g)	1.5	0.8	1.1	1.3
Liver protein** (mg/g liver)	131	52	139	139
Diet consumption (g/day/mouse)	—	9.5	5.3	5.9
Protein intake (g/day/mouse)	—	0	1.1	3.4

* The initial body weight were 22 to 29g (mean, 26g).

** Protein was determined in the supernatant of liver homogenate.

Groups of mice were grown for 8 days on diets containing 0, 20, and 60 % casein. Each value represents the mean of 3 animals.

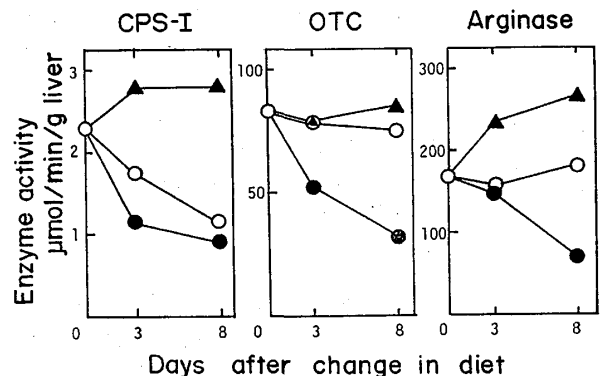


Fig. 2. Effects of dietary protein on levels of some urea cycle enzymes in mouse liver. Activities of CPS-I, OTC, and arginase were assayed as described in the text. Each point represents the mean of 3 animals. Groups of mice were grown for 3 or 8 days on diet containing 0 (●—●), 20 (○—○), or 60 (▲—▲) % casein.

選んで活性を測定した。表1には、合成食飼育の各群における体重変化、肝の重量および蛋白質含量、食餌摂取量と摂取蛋白質量を示してあるが、無カゼイン食群では体重、肝重量、肝の蛋白質含量のいずれも明らかに減少している。このような食餌条件のもとでのCPS-I、OTC、アルギナーゼの活性変化を図2に示した。CPS-Iの活性をみると、60%カゼイン食群では食餌変換後3日

AGA Synthetase

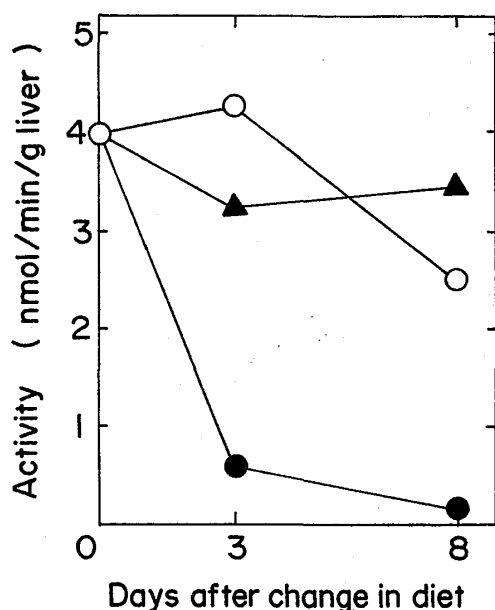


Fig. 3. Changes in the activity of AGA synthetase in response to dietary protein contents. The activity of the enzyme was assayed in the presence of L-arginine. Other conditions were the same as in Fig. 1. Each value represents the mean of 3 animals. Casein contents of diet were 0 (●—●), 20 (○—○), and 60 (▲—▲) %, respectively.

で120%に上昇し、これは8日目にも同じレベルであった。20%カゼイン食群では3日目で対照の76%、8日目で50%と漸減した。無カゼイン食群の活性減少はさらに顕著で、3日で50%、8日で40%に減少した。他の2酵素、OTC およびアルギナーゼでも8日目にはほぼ同様にカゼイン含量に対応する酵素活性の変化が観察された。図3は同時に測定した AGA 合成酵素活性の変化である。この場合、本酵素をその最大活性で測定するために1mM の L-アルギニンを反応液中に加えてある。60%カゼイン食群の AGA 合成酵素活性は、合成食に変換3日後には対照の81%で、同じく3日目の20%カゼイン食群の値(107%)より低い。しかし8日目にはやや回復し、20%カゼイン食群の62%より明らかに高くなった。このように、20%と60%カゼイン食群の差は本酵素ではやや不定であるものの、数回行った同種の実験でも8日目になると60%カゼイン食群の酵素活性の方が20%食群のそれより常に高かった。一方、無カゼイン食の効果は著しく、3日目にはすでに対照群の16%、8日目

には4%と激減した。

以上の結果から、AGA 合成酵素において、他の3酵素(図2)と同様な食餌蛋白質量に対応した活性変化が明らかになった。しかし一方、AGA 合成酵素に特徴的なことは第1に20%と60%カゼイン食群の差が小さいことと、第2に無カゼイン食に変換後の急速かつ著しい活性低下である。これは AGA の尿素合成調節上の役割を考察するにあたって非常に興味深い現象である。

考 察

AGA 合成酵素の活性が L-アルギニンによって促進される⁴⁾ことは重要な事実であり、このことが尿素合成の調節に大きな意味をもつことは、ラット肝スライス¹²⁾、肝浮遊細胞³⁾、肝ミトコンドリア¹³⁾においてアルギニンによってシトルリンおよび尿素合成が促進されたという実験結果からも明らかである。これに加えて今回の実験から AGA の合成を酵素レベルで調節する2つの異った機構の存在を示唆する結果を得た。

第1は図1に示した本酵素活性の日内変動である。動物にとっての食餌環境は、1日のうちでも摂食と飢餓のくり返しであり決して一定ではない。おそらくこれを反映して、肝内 AGA レベル¹⁴⁾および尿素排泄量¹⁵⁾には摂食に伴う日内変動が観察されている。今回はじめて明らかにされた AGA 合成酵素活性の日内変動は、摂食に伴う短期間の AGA レベルの変動^{12,14)}が、基質や活性化物質などの濃度変化のみによるものではなく、酵素の側からもこれに関与する可能性のあることを示唆している。さらに本酵素の活性変動にはアルギニンによる活性化倍率の変化が関与しており、その背景に酵素蛋白の質的な変化があると考えられる。このことは今後の研究にきわめて興味深いまた重要な課題を与えている。

第2に明らかになったことは、摂取蛋白質量に応じた AGA 合成酵素のおそらく酵素量の変化を伴った長期的な変動である(図3)。なおこの実験では午前9~10時の一定時刻に動物を殺しているの、図1に示した日内変動による影響はほとんど考慮しなくてよい。また各点においてアルギニン非存在下の酵素活性を測定しアルギニン活性化倍率を比較したが、有意の差異はみとめられなかった。AGA 合成酵素の長期的変動(図3)が、尿素回路諸酵素の変動(図2)とほぼ同調したことは環境変化に対応する両者間の緊密な連関を表わしており、尿素回路のいずれの適応状態においても AGA レベルが重要な調節因子であることを強く示唆するものである。ところで、動物は蛋白質を摂取できなくなった場合にはす

みやかに窒素の排出量を減少させて窒素平衡を保たねばならない。AGA 非存在下の CPS-I の活性がほぼゼロに近い¹⁾という事実、AGA の半減期が20分と短い¹²⁾こと、および今回観察された AGA 合成酵素の無蛋白食変換後の急激な減少とをあわせて考えるならば、AGA の主要な生理的意義のひとつはその細胞内準位の低下によって尿素合成をすみやかに停止させることにあるのではないかと推察される。さらに20%と60%カゼイン食群との間で肝内 AGA レベルには明らかな差が認められた²⁾にもかかわらず、本酵素活性には大きな差が無かった(図3)ことは、おそらく肝は20%カゼイン食ですでに最大の AGA 合成の潜在能力を有しており、それ以上の蛋白質摂取に対する AGA 準位の調節が、L-アルギニン、アセチル-CoA、グルタミン酸の細胞内濃度など、酵素量以外の要因によって行われる可能性を示唆している。

稿を終えるに当り、終始ご懇篤な指導と校閲をたまわった橘正道教授、森正敬助手に深く謝意を表わすとともに、生化学第2教室各位のご助力に感謝いたします。

本論文は学位審査論文である。

SUMMARY

N-Acetylglutamate has been known to be a critical factor for control of mitochondrial carbamoyl phosphate synthetase I, the first enzyme of the urea cycle. In order to further define the regulatory role of N-acetylglutamate, experiments were undertaken to examine changes in the activity of N-acetylglutamate synthetase (AGA synthetase) in mouse liver in response to various dietary conditions.

1) The enzyme activity, assayed in the presence of 1 mM L-arginine, underwent marked diurnal changes, reaching a maximum 6-9 hours after the start of feeding. On the other hand, changes in the enzyme activity assayed without L-arginine were less marked. Therefore, the circadian change in the activity with L-arginine was due principally to the change in the sensitivity of the enzyme to activation by L-arginine, suggesting involvement of some unknown mechanisms which modify the enzyme molecule.

2) The effects of dietary protein contents on

the mouse liver enzymes, AGA synthetase, carbamoyl phosphate synthetase I, ornithine carbamoyltransferase, and arginase, were studied. The activities of these four enzymes increased in the mice fed on a 60% casein diet compared with those fed on a 20% casein diet, and decreased in those fed on a casein-free diet, indicating a parallelism between AGA synthetase and the members of the urea cycle enzymes. These observations suggest that the amount of AGA synthetase is partially responsible for the change in intramitochondrial AGA level in animals adapted to different amounts of dietary protein.

文 献

- 1) Hall, L. M., Metzenberg, R. L. and Cohen, P. P.: Isolation and characterization of a naturally occurring cofactor of carbamoyl phosphate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **230**, 1013-1021, 1958.
- 2) Shigesada, K. and Tatibana, M.: Role of acetylglutamate in ureotelism. 1. Occurrence and biosynthesis of N-acetylglutamate in mouse and rat tissues. *J. Biol. Chem.* **246**, 5588-5595, 1971.
- 3) Aoyagi, K.: in preparation.
- 4) Shigesada, K. and Tatibana, M.: Enzymatic synthesis of acetylglutamate by mammalian liver preparations and its stimulation by arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 1117-1124, 1971.
- 5) Harper, A. E.: Amino acid balance and imbalance. Dietary level of protein and amino acid imbalance. *J. Nutr.* **68**, 405-419, 1958.
- 6) Tatibana, M. and Ito, K.: Carbamyl phosphate synthetase of the hematopoietic mouse spleen and the control of pyrimidine biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 221-227, 1967.
- 7) Marshall, M. and Cohen, P. P.: Ornithine transcarbamylase from *Streptococcus faecalis* and bovine liver. Isolation and subunit structure. *J. Biol. Chem.* **247**, 1641-1653, 1972.

- 8) Myers, D. K. and Slater, E. C.: The enzymatic hydrolysis of adenosine triphosphate by liver mitochondria. 1. Activities at different pH values. *Biochem. J.* **67**, 558-572, 1957.
 - 9) Brown, G. W., Jr. and Cohen, P. P.: Comparative biochemistry of urea synthesis. Methods for the quantitative assay of urea cycle enzymes in liver. *J. Biol. Chem.* **234**, 1769-1774, 1959.
 - 10) Kerson, L. A. and Appel, S. H.: Kinetic studies on rat liver carbamoyl phosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* **243**, 4279-4285, 1968.
 - 11) Schimke, R. T.: Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. *J. Biol. Chem.* **237**, 459-468, 1962.
 - 12) Tatibana, M. and Shigesada, K.: Regulation of urea biosynthesis by the acetylglutamate-arginine system. In: *The Urea Cycle*. Grisolia, S., ed. pp. 301-313, John Wiley & Sons, New York, 1976.
 - 13) Noda, T., Personal communication.
 - 14) Shigesada, K. and Tatibana, M.: Manuscript in preparation.
 - 15) Elwyn, D. H., Parikh, H. C. and Shoemaker, W. C.: Amino acid movement between gut, liver, and periphery in unanesthetized dog, *Am. J. Physiol.* **215**, 1260-1275, 1968.
-