

アラニンスルフィン酸の脱SO₂反応

千葉大学医学部医化学教室(主任 赤松教授)

中 村 彰

AKIRA NAKAMURA

含硫アミノ酸が体内で酸化されて硫酸を生成することは既に Pirie, Hele⁽¹⁾, Medes⁽²⁾によつて明らかにされている。即ち, Pirie 等は投与システインSの約70%が2日間に硫酸塩として尿中に排泄されたことを犬で観察し, Medes は注射又は経口的に投与されたシステインSの73~95%が硫酸にまで酸化されたことを人体で認めている。

斯様な生体内に於けるシステイン酸化による硫酸生成の機序は, 簡単な反応でなく特殊な酵素系の介在を必要とする複雑な中間反応を含むものと考えられる。この硫酸生成の機序に関する研究は Pirie⁽³⁾, Medes⁽⁴⁾, Medes, Floyd⁽⁵⁾によつて行われている。しかし, その詳細については, なお, 明白にされていない。

当教室に於ては既に戦争中システインから硫酸が生ずる過程でアラニンスルフィン酸, 亜硫酸を経由することを, アラニンスルフィン酸にねずみ肝抽出液を作用させて酵素的に生ずる硫酸が更に試験液除蛋白液を過マンガン酸カリ処理すると増量する成績から確認して, その実験成績を酵素班協議会で報告した。しかし, 戦災によりその記録を焼失せる為戦後再び実験に着手し前回の報告を再確認することが出来たので報告する。

なお, Fromageot⁽⁶⁾はアラニンスルフィン酸から嫌氣的条件下でアラニン及び亜硫酸を生成する脱SO₂酵素の研究を行つているが, 私の実験は之と全く別個に行つたものである。

脱SO₂反応による生成物アラニンを戦時中にはベンツオイル・アラニンとして同定したが, この度は濾紙クロマトグラフによつて証明した。なお, 併せてこの脱SO₂反応を営む酵素の至適酸度, 金属及びCNイオンの影響, 並びに補酵素について検討した。

実 験 之 部

I. 基 質

1) アラニンスルフィン酸Ba塩 Schubert⁽⁷⁾の方法に従つて合成した教室保存の標品を用いた。

分析: Ba(実測値43.8%, 理論値44.8%)。

2) システイン酸 融点264~267°C。

II. 酵 素 液

Medes⁽⁴⁾の方法により調製した。ねずみの首を切り離し, 直ちに開腹して肝動脈, 門脈, 肝静脈の順に生理的食塩水を灌流して肝臓から血液を完全に駆逐した後肝臓を取出して, 肝重量の3倍容の10%蔗糖液を加えて十分にホモゲナイズし30分間放置する。その後3000回転20分間遠心沈澱し, その上清を硝子製濾過器で濾過して実験に供した。

III. 定 量 法

1) 除蛋白は醋酸ウラニール法によつた。即ち, 共栓付遠心管に被検液2.0mlをとり, 之に4% NaF 2滴, 0.4% 醋酸ウラニール6.0mlを加え, 強く振盪混和した後遠心沈澱して澄明な除蛋白液を得る。

2) 過マンガン酸カリ処理。澄明な除蛋白液2.0mlを目盛付遠心管にとり, 毛細管ピペットでM/250過マンガン酸カリ液を滴下しつゝ被検液が微紅色を呈し褪色せざるまで加える。

3) 硫酸の定量。田中法⁽⁸⁾に従つた。過マンガン酸カリ処理液に0.04% Thymolblau液1滴を加え, 之に毛細管ピペットで10% 塩酸を溶液が微紅色を呈するまで加える。次いで, 氷醋酸0.5ml, 0.1% ベンチデン・アセトン4.0mlを加えて強く振盪し, 流水中にて30分間冷却放置した後析出せるベンチデン硫酸を3000回転30分間遠心沈澱して透明な上清

を捨て、沈澱にアセトン7 mlを加えて再遠沈して上清を捨て、60°Cの温水中で加温し残存するアセトンを完全に蒸発させる。このベンチデン硫酸の沈澱に1% Borax-Natron 液1.0 mlを加え、60°Cに加温して沈澱を完全に溶解させた後室温に冷却し水を加えて7.0 mlとする。次いで、0.5% β -Naphthochinonsulfon 酸 Na 液1.0 mlを加え、赤色呈色液に5分後アセトン2.0 mlを追加し全量10.0 mlとし Purflich 光度計 (Filter S 50) で測定する。

既知濃度の無機硫酸塩での定量試験の成績は第1表の如く吸光度は濃度に比例する。

第1表

K_2SO_4	M/8000	M/4000	M/2000	M/1000
吸光度系数	0.106	0.210	0.404	0.798

IV. 実験方法

基質 M/200 アラニンスルフィン酸 K 液はアラニンスルフィン酸 Ba 塩 153.25 mg にメスコルベン中で M/200 K_2SO_4 液を加えて全量100.0 mlとして濾過し Ba を定量的に除去して調製した。緩衝液は Michaelis の M/10 Veronal 緩衝液 (pH 7.0) を用いた。実験温度は37°Cである

試験液組成は特記しない限り下記の如く調製し、トルオールを重畳して行つた。なお、盲検としては基質液に代うるに水、及び酵素液に代うるに水の両者を以つてした。

M/200 基質	4.0 ml
酵素液	2.0 ml
緩衝液	4.0 ml

生成硫酸の測定法は上記の如くであるが、実験成績に表示せる硫酸生成率は初期基質濃度に対する生成硫酸濃度の百分比を以つて示した。なお、測定に際して基質及び酵素液に由来する硫酸量を盲検として差引いたことは云うまでもない。

濾紙クロマトグラフの展開時の溶媒は10% アンモニア水加フェノール、呈色は0.2% ニンヒドリン・ブタノール溶液を以て行つた。

実験成績

1. 過マンガン酸カリ処理による生成硫酸量の増加

アラニンスルフィン酸にねずみ肝抽出液を作用させて生成される硫酸は第一次生成物の自然酸化によるものであるから、除蛋白液に過マンガン酸カリ処理を行わない場合の硫酸生成量と過マンガン酸カリ

処理を行つた場合の硫酸生成量とを比較した。この結果は第2表に示せる如く過マンガン酸カリ処理によつて被検液中に含まるる硫酸量は増加する。

第2表 過マンガン酸カリ処理による生成硫酸量の増加

	実験時間	生成硫酸	硫酸生成率
	時間	$M \times 10^{-3}$	%
過マンガン酸 処 理	2	1.24	62.0
	4	1.39	69.6
	6	1.60	80.1
過マンガン酸 無 処 理	2	0.324	16.2
	4	0.63	31.5
	6	0.66	33.0

アラニンスルフィン酸初期濃度 2×10^{-3} M, pH 7.0, 37°C, Veronal 緩衝液。

2. アラニンスルフィン酸脱 SO_2 反応の至適酸度
ねずみ肝抽出液による脱 SO_2 反応は第3表に示せる如く pH 7.0 に於いて最大であつた。

第3表 至 適 酸 度

pH	実験時間	生成硫酸	硫酸生成率
	時間	$M \times 10^{-3}$	%
6.0	2	0.636	31.8
	4	1.304	65.2
7.0	2	1.090	54.5
	4	1.972	98.6
8.0	2	0.600	30.0
	4	1.378	68.9

アラニンスルフィン酸初期濃度 2×10^{-3} M, 37°C, Veronal 緩衝液。

3. 脱 SO_2 酵素液の透析

アラニンスルフィン酸脱 SO_2 酵素の補酵素を検討する為にねずみ肝抽出液を流水中にて2日間透析し、之を用いて硫酸の生成を調べた。その結果は第4表に示す如く酵素液透析により脱 SO_2 作用は消失した。更に透析酵素液にねずみ肝抽出液の加熱濾液を加えると再活性化が認められた。

4. 脱 SO_2 に対する金属イオンの影響

試験液に $MnCl_2$, $FeCl_2$, $CaCl_2$, $CuCl_2$, $CoCl_2$, $MgCl_2$ を加えて酵素的硫酸生成実験を行つた。その結果は第5表に示せる如く Cu イオンの存在は脱 SO_2 反応を阻害する。しかし、Mn, Fe, Ca, Co, Mg 各イオンの存在は何等の影響も認められなかつた。表中の対照とは金属塩を加えない場合を云い、各種金属塩の終濃度は Mn, Fe, Ca, Cu には

第4表 透析酵素液に加熱酵素濃液添加

酵 素 液	実験時間	生成硫酸	硫酸生成率
		M×10 ⁻³	%
透析酵素液	1	0	0
	3	0	0
透析酵素液+ 加熱酵素濃液	1	0.286	22.9
	3	1.142	91.7
未透析酵素液	1	0.484	38.7
	3	1.288	103.0

試験液組成: M/200 基質 2.0 ml + 酵素液 2.0 ml + 加熱酵素濃液又は蒸溜水 1.0 ml + 緩衝液 3.0 ml
アラニンスルフィン酸初期濃度 1.25 × 10⁻³ M, pH 7.0, 37°C, Veronal 緩衝液。

第5表 諸種金属塩溶液の添加

実 験	金 属 塩	生成硫酸	硫酸生成率
		M×10 ⁻³	%
実験 I	MnCl ₂	1.320	79.2
	FeCl ₂	1.410	84.7
	CaCl ₂	1.232	74.0
	CuCl ₂	0.152	9.1
	対 照	1.440	86.4
実験 II	CoCl ₂	0.825	55.0
	MgCl ₂	0.757	50.5
	対 照	0.945	63.0

試験液組成: 実験 I M/200 基質 3.0 ml + 酵素液 2.0 ml + M/100 金属塩 1.0 ml + 緩衝液 3.0 ml.
実験 II M/200 基質 3.0 ml + 酵素液 2.0 ml + M/100 金属塩 1.0 ml + 緩衝液 4.0 ml 但し対照は添加金属塩の代わりに蒸溜水を加う。
アラニンスルフィン酸初期濃度 実験 I 1.66 × 10⁻³ M, 実験 II 1.5 × 10⁻³ M, pH 7.0, 37°C, Veronal 緩衝液, 実験時間 3 時間。

M/900, Co, Mg にては M/1000 である。

5. 脱 SO₂ に対する CN イオンの影響

第6表に示せる如く CN イオンによる阻害作用が認められた。

6. アラニンスルフィン酸脱 SO₂ 酵素のシステイン酸に対する作用

第7表に示せる如くシステイン酸からは酵素的に硫酸は生成されない。

7. 濾紙クロマトグラフによるアラニンの証明

アラニンスルフィン酸 (初期濃度 2 × 10⁻³ M) にねずみ肝抽出液を作用させ、その醋酸ウラニル除蛋白液について濾紙クロマトグラフによる生成有機分子の検討を行った。その結果、対照としてとつたアラニンのスポットと一致する処に除蛋白液中より

第6表 CN の添加

	実験時間	生成硫酸	硫酸生成率
		M×10 ⁻³	%
NaCN 添加	2	0.038	1.9
	4	0.020	1.0
対 照	2	1.240	62.0
	4	1.392	69.6

試験液組成: M/200 基質 4.0 ml + 酵素液 2.0 ml + M/1000 NaCN 1.0 ml + 緩衝液 3.0 ml.
但し対照は NaCN の代わりに蒸溜水を加う。
アラニンスルフィン酸初期濃度 2 × 10⁻³ M, pH 7.0, 37°C, Veronal 緩衝液。

第7表 システイン酸よりの硫酸生成

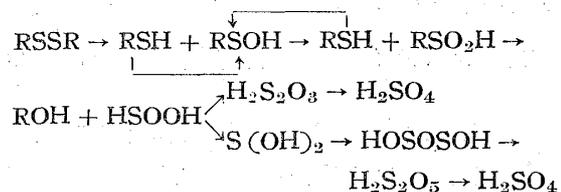
基 質	実験時間	生成硫酸	硫酸生成率
		M×10 ⁻³	%
システイン酸	2	0.026	1.3
	4	0.046	2.3
アラニンス ルスイン酸	2	1.240	62.0
	4	1.392	69.6

基質初期濃度 2 × 10⁻³ M
pH 7.0, 37°C, Veronal 緩衝液

ニヒドリリンにより呈色するスポットを認めた。且つ、アラニンに相当するスポット以外の呈色は認められなかつた。

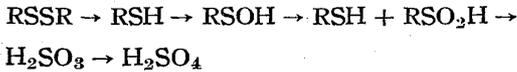
考 按

Medes 等⁽⁴⁾⁽⁵⁾ はねずみの肝臓切片及びその抽出液を用いて含硫アミノ酸及びその誘導体よりの硫酸生成実験を行った。その結果、彼はシスチンは先ず非酵素的、且つ、可逆的にシステイン・スルフェン酸とシステインに水解され、システインはシステインオキシダーゼによりシステイン・スルフェン酸に酸化され、かくて生ずるスルフェン酸は不同変化 Dismutation によつてアラニンスルフィン酸とシステインを生じ、このシステインはシステイン・スルフェン酸への酸化、スルフェン酸の不同変化のサイクルに介入するが、アラニンスルフィン酸は水解されてアミノ酸とスルフォキシル酸の異性体を生じ、チオ硫酸又はピロ重硫酸を経て硫酸に自然酸化されると云う代謝経路を考えた。



Pirie⁽⁶⁾ に含硫アミノ酸が硫酸にまで酸化される

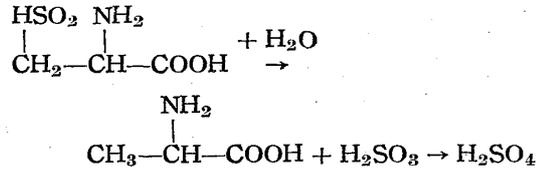
ことをねずみの肝臓及び腎臓切片を用いて観察した。これにもつぎ彼はシスチンは予めシステインに還元されてからシステインスルフェン酸、アラニンスルフィン酸を経由して亜硫酸を生成し、之が自然酸化されて硫酸を生成する代謝経路を暗示した。



私はアラニンスルフィン酸にねずみ肝抽出液を作用させ、その除蛋白液に過マンガン酸カリ処理を行うと、過マンガン酸カリ処理を行わない場合よりも、より多く被検液中に硫酸が存在することを認めた。従つて、アラニンスルフィン酸にねずみ肝抽出液を作用させた時酵素的に生成されるものは酸化剤により容易に硫酸となる labil な含 S 酸であることが考えられる。この含 S 酸がチオ硫酸又はピロ亜硫酸、或いは亜硫酸であるか否かと云うことは、之等の含 S 酸が容易に酸化されて硫酸となることから同定は出来ない。しかし、アラニンスルフィン酸より酵素的硫酸生成の過程について Medes の仮説に従うと、アラニンスルフィン酸より無機スルフィン酸が生成される時遊離する有機分子はセリンでなければならない。他方、Pirie の亜硫酸生成説に従うとアラニンが生成される。しかるに、私の濾紙クロマトグラフによる生成有機分子同定の結果ではセリンを証明し得ずアラニンを証明した。なお、戦時中に大量のアラニンスルフィン酸を供試して水解物としてアラニンがそのベンツオイル体として単離されたことを附記する。

従つて、試験液除蛋白液に過マンガン酸カリ処理によつて容易に酸化されて硫酸となる含 S 酸が存在

すること、並びに脱 S アミノ酸としてアラニンが証明されたことから、アラニンスルフィン酸より硫酸生成に至る過程は下記の如きものである。



なお、これと無関係に Fromageot⁽⁶⁾ はアラニンスルフィン酸から酵素的にアラニンの生成するを認めている。

又、酵素を透析すると試験液中に硫酸生成が認められなくなるが、加熱酵素濾液を透析酵素液に加えると硫酸生成が再び認められたことから、アラニンスルフィン酸脱 SO₂ 酵素の補酵素は透析性、耐熱性であることが明らかである。

システインをシステイン酸に酸化する酵素は Medes⁽⁷⁾ によりシステインオキシダーゼ B と命名された。しかし、このシステイン酸が如何に代謝されるかは未解決の点が少くない。著者はシステイン酸が生体に於ける硫酸生成の中間体となり得るか否かを検討する為めに、システイン酸にねずみ肝抽出液を作用させたが、酵素的に生成される硫酸は認めることが出来なかつた。従つて、システインよりの硫酸生成は専らアラニンスルフィン酸を経由するものであつて、システイン酸はこの過程の中間体とはなり得ないこと、又システイン酸より硫酸生成が行われるとすればそれは Cohen⁽⁸⁾ の所説の如くアミノ転移によりスルフォピルビン酸を経由する過程に基づくものと考えられる。

総 括

1. アラニンスルフィン酸にねずみ肝抽出液を作用させると硫酸を生じてくるが、この硫酸量は過マンガン酸カリ処理により高まり、同時に生成アラニンを濾紙クロマトグラフによつて証明したことから酵素的に脱 SO₂ 反応が行われる。



2. アラニンスルフィン酸脱 SO₂ 酵素による亜硫酸生成反応の至適酸度は pH 7.0 である。又この酵素は Cu 又は CN イオンで阻害される。補酵素は透析性、耐熱性である。

3. システイン酸からは酵素的に硫酸を生じない。

本研究は文部省より赤松教授に与えられた科学研究費によつて行われ、その間終始御懇篤なる御指導を賜つた赤松教授に対し深甚なる謝意を表します。

文 献

1. Hele, T. S., Pirie, N. W.: *Biochem. J.*, **25**, 1095 (1931)
 2. Medes, G.: *Biochem. J.*, **31**, 1330 (1937)
 3. Pirie, N. W.: *Biochem. J.*, **28**, 305 (1934)
 4. Medes, G.: *Biochem. J.*, **33**, 1559 (1939)
 5. Medes, G., Floyd, N.: *Biochem. J.*, **36**, 259 (1942)
 6. Fromageot, C.: *The Enzymes*, **2**, 248 (1951)
 7. Schubert, M. P.: *J. amer. chem. Soc.*, **55**, 3336 (1933)
 8. 田中清意: *J. Biochem.*, **28**, 37 (1938)
 9. Cohen, P. P.: *J. biol. Chem.*, **136**, 565 (1940)
-