

トランスアミジナーゼに就て

千葉大学医学部医化学教室 (主任 赤松 茂教授)

秋 月 登

NOBORU AKITSUKI

(昭和 34 年 12 月 16 日受付)

アルギニンとグリシンからグリコシアミンが酵素的に合成されることは、Borsook ら⁽¹⁾以来、多くの人達によつて研究されてきたが、我が教室に於いて中村⁽²⁾は従来の方法にまさる酵素の特殊性を利用したアルギニン及びグリコシアミン定量法を用いて兎腎トランスアミジナーゼの研究を行つた。中村の方法は試験液中のアルギニン及びグリコシアミンの総量と、強力なる肝アルギナーゼによりアルギニンを完全に分解した後のグリコシアミン量を坂口反応で呈色せしめ、その差からアルギニン量を求める方法で、除蛋白試薬の特殊性を利用する方法や、Borsook らがはじめ行つたパームチットによる方法に比べて特殊性が高く、また微生物学的方法や、イオン交換樹脂カラムによる方法より実施がはるかに容易な点が勝っている。私は中村のあとに引きつぎ彼の酵素を用いての分別定量方法に加うるに我が教室渡辺⁽³⁾による坂口反応を利用する呈色法を用いて豚腎トランスアミジナーゼについての実験を行い、水溶性酵素を製出し、之について行つた実験成績を報告する。また動物細胞内構造物中の酵素分布について検した結果についても記す。

実 験 の 部

測 定 法

坂口反応を原理とする渡辺法⁽³⁾によりアルギニン及びグリコシアミンを測定した。

即ち、試料 2.0 ml にスルフォ混液 (スルフォサリチル酸 2.5%, グリシン $M/50$, オキシシン 0.01% を含む) 2.0 ml を加え、混合して約 10 分後濾過あるいは遠沈により沈澱を除き、濾液 2.0 ml を 10 ml 目盛付試験管にとり、氷冷した後 2.5% 苛性ソーダ液 1.0 ml を加え、之にヒポプロミット液 (5% 苛性ソーダ液に臭素 1 g を加えて調製する。褐色瓶に入れ冷暗所に保存する。) 1.0 ml を加え、水を以て全容を 10 ml とし、プルフリッヒ光度計 (フィルター S_{50}) で測定する。アルギニンは橙色に呈色し、試料中 $M/4,000$ を含む時に吸光係数は 0.71, グリコシアミン

は橙黄色で、同じく $M/4,000$ の時に吸光係数は 0.49 を示す。

本報告に於ける実験では試料中にアルギン及びグリコシアミンが混在するから、この両者を分別定量する必要がある。

実験にあつて、まず試験液の組成を示すと、一般には次の如くである。

$M/200$ アルギニン液	1.0 ml
$M/50$ グリシン液	1.0 ml
pH 7.0 $M/10$ 磷酸塩緩衝液	2.0 ml
酵 素 液	1.0 ml
計	5.0 ml

37° 所定時間孵置せる上記試験液から 1.0 ml ずつを 2 本の試験管にとり、そのうち 1 本には水 1.0 ml を加えて直ちに前記スルフォ混液 2.0 ml を加え、濾液 2.0 ml を 10 ml 目盛付試験管にとり氷冷して、苛性ソーダ液、次いでヒポプロミット液を順次加え、水を以て全容 10 ml として、呈色せる橙色を測定する。この吸光係数は試料中のアルギニン及びグリコシアミンの吸光係数の和である。他の 1 本は 100°C 5 分間沸騰水浴中で加温してトランスアミジナーゼ作用を止め、冷却後飽和炭酸ソーダ液で pH を略 9 になる様に補正し、アルギナーゼ液 (豚肝自家消化液) 1.0 ml を加えて 37°C 1 時間後、スルフォ混液 2.0 ml を加え、濾液 2.0 ml を 10 ml 目盛付試験管にとり、以下上記の如くにして呈色せしめる。この時の橙黄色はアルギナーゼにより分解されなかつたグリコシアミンにより発現したものである。この吸光係数を前記のアルギニン、グリコシアミン混合液の吸光係数から差し引けば混合液中のアルギニンの吸光係数が求められる。

上記アルギナーゼは次の如くにして調製する。即ち、豚肝を約 5 倍容の水と共にホモゲナイズし、トルオール及びクロロフォルムを加えて、2 日間 37°C で自家消化せしめ、之を濾過して、濾液を流水に透析して、トルオールを加えて氷室中に保存する。このアルギナーゼ作用は極めて強力であつて、3 倍稀

积液を用いてもなお同容の $M/1000$ アルギニン液を 1 時間以内に 100% 水解する。冷暗所に保存すれば 1 年後もなお使用にたえる。然し酵素によるアルギニンの完全除去がこの定量に於いては要点であるから、試験液の測定と同一条件にてアルギニンが完全に分解される事を確認する必要がある。

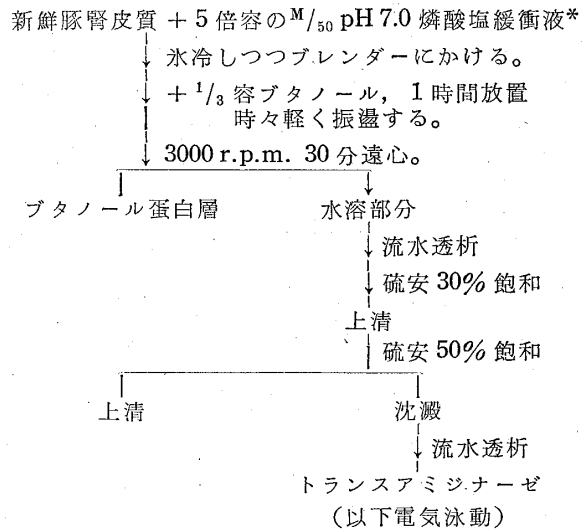
トランスアミジナーゼの精製

新鮮な豚腎の皮膜及び脂肪を除き、皮質のみを切り取つて、之の 5 倍容の $M/50$ pH 7.0 の磷酸塩緩衝液を加え、氷冷下ブレンダーにかけてホモゲナイズする。はじめ等容の緩衝液にてブレンダーにかけたものをポッターのガラスホモゲナイザーで氷冷しつつすりつぶしてから、緩衝液を加えてブレンダーにかけた方が酵素の収量がやや良い様に思われる。之等の操作は手早くすべて氷冷下行う必要がある。このホモゲネートに約 $1/3$ 容のブタノールを加えて軽く振盪混和して約 1 時間（この間時々軽く振盪する）後に遠心する。約 3000 r.p.m. 30 分後には上部にブタノール及び蛋白との混合物、下部に水溶部分に分れるから、この下層の部分を集め、之をブタノール臭がなくなるまで流水に透析する。大体一晩で除かれる。この操作は、使用する磷酸塩緩衝液にあらかじめブタノールを飽和させたものを用いてもよい。ブタノールは約 $1/10$ 容ほど溶ける。この場合は遠心した時にブタノール層が上部に集まらず、沈澱と上清に分れるから、上層の水溶部分を用う。

次いでブタノールが完全に除かれた透析液に固形硫安を加えて 30% 飽和とし、約 1 時間後遠沈してその沈澱を除き上清に更に硫安を加えて 50% 飽和とする。約 1 時間後遠心してその沈澱を集め、少量の水に溶かして硫安が除かれるまで流水に透析する。30% 硫安分劃の時上清が透明とならぬ時は一晩氷室に放置してから遠沈する。得られた硫安 30-50% 分劃は帯褐色透明液でトランスアミジナーゼ活性はこの部分に最も強いが、氷室に保存するもなおその効力の減退が甚だしく、数日の使用に耐えるのみである（表 1）。

この硫安 30-50% の分劃はアルギナーゼを含めぬこともあるが、多少含有することが多いので、之を分離するために澱粉を支持体とする Zone electrophoresis を行つた。装置は東亜工業製のものを用いた。泳動材料は一晩氷室中にて $M/20$, pH 9 ペロナル緩衝液約 2L に透析し、泳動緩衝液はこの buffer を用いる。装置は氷箱内に静置し、10°C 以上にならぬ様注意する。セルの全長は 40 cm, 原点

表 1. トランスアミジナーゼの精製法

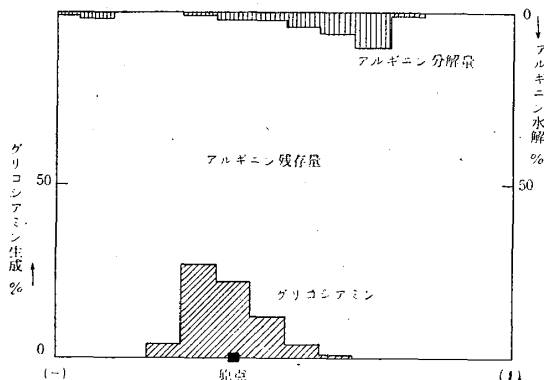


* この緩衝液をあらかじめ n ブタノールで飽和させておいて用いてもよい。この時は、次のブタノール操作ははぶかれ、遠沈した場合水溶部分は上層にある。

総ての操作は出来るだけ氷冷しつつ行う。

は陰極から 15-16 cm の所に置いた。一晩（約 18 時間）150 Volt, 7 mA 通電した後適当な長さ（図 1 の場合は 3 cm）のセグメントに切断するのであるが、切断する前に濾紙ストリップを澱粉柱に密着させて液を浸み入ませ、乾熱乾燥させる。之をブロムフェノールブルー稀醋酸液に約 10 分間浸し、1% 醋酸で過剰のブロムフェノールブルーが全部溶出するまで洗う。蛋白の量に応じて緑～青色の着色がみられる。セグメントに切断せる澱粉柱は同容の水で洗い出して、この液についてトランスアミジナーゼ作用とアルギナーゼ作用とを検する。図 1 に示される如く両酵素作用の極大部位は分離する。アルギナーゼは陽極側に移動し、大部分の蛋白はほぼアルギナーゼと同様に陽極に移動する。トランスアミジナーゼの極大値を示す部位はほとんど原点の近くに止まり、このセグメントはほとんど蛋白をふくまず、スルフォサリチル酸液によりほとんど白濁をみとめない。図 1 に於いて斜線の部分はグリコシアミン生成量でトランスアミジナーゼの活性を示し、上部の縦線部位は、前項に記せる方法によつて測定せる生成グリコシアミン濃度と、残存アルギニン濃度との合計を初期のアルギニン濃度から差し引いた値の百分率で、これは水解されたアルギニン量すなわちアルギナーゼの活性を示す。図 1 は両酵素の極大値を示す部分が分離することを明瞭に示すため、硫安の 30-50% 分劃せし後になおアルギナーゼを多量含んで

図1. Zone electrophoresis によるトランスアミジナーゼ, アルギナーゼの移動



澱粉柱の長さは 40 cm, pH 9 $M/_{20}$ ペロナール緩衝液, 150 Volt. 7 mA. 18 時間, 氷箱中にて泳動。3 cm の長さに分ち, 同容の水にて溶出。酵素試験液組成は本文にあり。

居た酵素標本についての泳動図を示したため, アルギナーゼは泳動時尾をひいて, トランスアミジナーゼ活性極大部位にもなおアルギナーゼ作用が僅かみとめられるが, 硫酸分割にてアルギナーゼ量は一般に減少し, 泳動後にはトランスアミナーゼ活性極大部位にはアルギナーゼ作用はみとめられない。

精製酵素に対する添加物の影響

ピリドキシン, ピリドキサル, ピリドキサミン, ベタイン, メチオニン, メタノール, ホモセリン, チオグリコル酸, ギアセチルシステアミン, システイン, ホモシステイン, CoA, ATP 等の諸種濃度及び之等物質のいくつかの組合せのトランスアミジナーゼ作用に対する影響を検したが, いずれの場合も有意の差をみとめ得なかつた。

トランスアミジナーゼの可逆反応

アルギニンからグリコシアミンが生成されることは前記の如くであるが, この反応の逆反応すなわち, グリコシアミンとオルニチンからアルギニンの生成を検した。反応液組成は下の如くである。

$M/_{200}$ グリコシアミン	1.0 ml
$M/_{50}$ オルニチン	1.0 ml
$M/_{10}$ pH 7.0 磷酸塩緩衝液	2.0 ml
酵 素 液	1.0 ml
計	5.0 ml

トルオールを加えて一晚 37°C に孵置した後グリコシアミン残存量ならびにアルギニン生成量を測定せしも, 変化はみられなかつた。定量法として坂口反応を用いるため, グリコシアミン量を増す事は, 定量時試料を稀釈せねばならぬ故, 之を高濃度に用いる事を止め, 反応が逆に進む様オルニチン濃度を

4 倍としたのであるが, オルニチンの阻害のため反応が認められぬ事も考えられるので, この反応液中のオルニチン量を $M/_{1000}$ 1.0 ml とし, 一方この系に前記の強力なアルギナーゼを加えたものについて試験した。アルギナーゼにより生成されたアルギニンは直ちにオルニチンと尿素になり, もし反応が可逆的なりとすれば, 反応は逆方向にのみ進行するわけであるが, このアルギナーゼ添加の場合もグリコシアミンの減少, アルギニンの生成はみとめられなかつた (表 2)。

表 2. グリコシアミン + オルニチンに対するトランスアミジナーゼの作用

	アルギナーゼ添加の有無	第一段	第二段
酵素 I	+ アルギナーゼ*	102 % 100	98 % 98
酵素 II	+ アルギナーゼ	100 98	98 98

実験液組成 $M/_{200}$ グリコシアミン 1.0 ml + $M/_{1000}$ オルニチン 1.0 ml + pH 7.0 $M/_{10}$ 磷酸塩緩衝液 2.0 ml + トランスアミジナーゼ 1.0 ml。

* アルギナーゼ添加の場合は, $M/_{1000}$ オルニチン 1.0 ml の代りに $M/_{100}$ オルニチン 0.1 ml, アルギナーゼ 0.9 ml とする。

第一段は, 1 晩孵置後, 1 ml をとり水 1 ml を加えて直ちにスルフオ混液を加えて呈色操作せるもので, 反応液中の坂口反応陽性物質の総量を示す。% は, 初期グリコシアミンの吸光係数に対する百分率。

第二段は, 100° 5 分加温後アルギナーゼを加えてアルギニンを完全に水解せしめた後の吸光係数, すなわち, グリコシアミン残存量。

細胞内に於ける transamidinase の分布

細胞成分の分離は等張蔗糖液による方法⁽⁴⁾に従つた。使用せる遠心器は Spinco Model L で rotor は No. 21 である。

まず臓器細片を 9 倍容の 0.25 M 蔗糖液 (等張) とガラスホモゲナイザーで約 2 分間すりつぶし, 之を 10 分間 600 × g で遠沈し, この上清を 8,500 × g 10 分間遠沈する。沈澱は原液と同容の蔗糖液で洗い, 再び 8,500 × g, 10 分間遠心して, この沈澱をミトコントリアとする。さきの上清及びこの洗液を合し, 18,000 × g 1 時間遠沈し, この沈澱を原液と同量の蔗糖液で洗い, 再び遠心して沈澱をとる。之をミクロゾームとする。実験にあたっては, ホモゲネート原液及び, ミクロゾームの上清をも用いている。

材料として用いたのは家兎, ネズミの腎皮質及び

表 3. 臓器細胞成分によるグリコシアミン生成

	ホモゲネート	ミトコンドリア	ミクロゾーム	上 清	ミトコンドリア, ミクロゾーム, 上清の混合
	%	15 %	2%	1%	%
ラッテ腎	25	27	6	12	
兎 腎	9	9	6	2	10
鶏 肝 I	14	23	8	2	
〃 II					

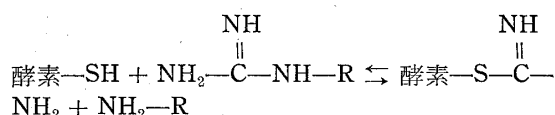
$M/_{200}$ アルギニン 1.0 ml + $M/_{50}$ グリシン 1.0 ml + $M/_{10}$ pH 7 磷酸塩緩衝液 2.0 ml + 酵素液 1.0 ml, 37° 1 晩, トルオール滴下。

ミトコンドリア及びミクロゾームはホモゲネート約 3 ml 分のものが用いられた。

雞の肝である。trans amidinase 作用は大体ミトコンドリア部分に集つている (表 3)。

考 按

Walker⁽⁵⁾はトランスアミジナーゼが Cu^{++} , p-クロル・メルクリ・安息香酸 (PCMB) により強く阻害されるが, PCMB の阻害は, 大量のシステインにより復活されることから, この酵素の活性基に—SH が存する事を推定し, またホルムアミジンジスルフィドが極めて強い阻害をすることはこの物質が活性基たる—SH とジスルフィドを形成するからで, またフェリシアニドの存在のもとにチオールヒスチジン, チオウラシル, チオオキシプリンが強い阻害を示すことは, 之等の化合物がフェリシアニドにより酸化されるとき, 酵素の—SH とジスルフィドを形成するためであろうと述べている。このときシステインが阻害しないのはフェリシアニド酸化の時システインは酵素の—SH と結合するよりも同じシステイン同志で結合する力が強く, シスチンになるからであろうという。之等の成績はトランスアミジナーゼが SH 酵素であることを証明する条件を満たすものではあろうが, Walker はさらに, アルギノサクシナーゼの反応が中間体を経て行われるとの説から類推して, トランスアミジナーゼ作用に際して, この酵素とアミジン基とが酵素の—SH 基を介して結合して



なる中間体を形成するであろうことを, 数々の実験成績から間接に証明し得るという。有機化学において S-メチルイソチオウレアがグアニジノ体を作ることとはこの様な中間体が, 生体内に生ずる可能性の根拠となるとのべている。然し彼はこの酵素との高

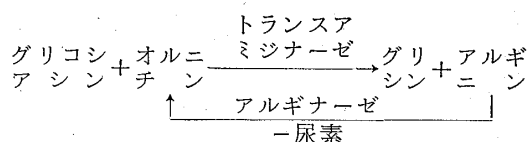
分子のメチルイソチオウレア置換体を直接に証明してはいない。

之に対して, Ratner ら⁽⁶⁾はトランスアミジナーゼ作用に關与するアルギニン, カナバニン, グリコシアミン, オルニチン, カナリン, グリシン等の夫々の K_s , K_i の測定及び転位反応の作用機作を解析して, この Walker の言う中間体の存在を否定している。

之等の論争に対する批判はこのたびの実験成績を以てしては何とも定める事は出来ぬが, もし酵素—S—C(NH)NH₂ なる中間体が出来るものならば受客体が水となつた場合にはこの酵素はアルギナーゼ作用と同様の作用をもつ事になる。Ratner らはトランスアミジナーゼを精製して約 80 倍までしたにもかかわらずなおアルギナーゼがわずかに残存して居り, Mn^{++} の賦活により残存アルギナーゼ量を推定して, なおこのアルギナーゼ作用による以外にトランスアミジナーゼによる水解を見んとしたが当然之は不可能な事であつた。その意味に於いてはこの報告に於けるアルギナーゼを全く含まぬトランスアミジナーゼは Rctner の説に対する一つの支持となるかもしれない。この酵素液はスルフオ除蛋白で白濁をほとんどの場合生ぜぬ程でその蛋白量に対する活性は極めて高いものと思われる。

トランスアミジナーゼの可逆性に関しては既にこの研究の初期に行なわれた。Broch, Schoenheimer ら⁽⁷⁾はこの反応の不可逆なることを述べたがその後多くの研究者により現在はこの反応が可逆的な事が信ぜられている様である。共鳴しているアミジン基は“Energy rich”であるが, トランスアミジネーションに於けるレベルに於いてはこのエネルギーの変化は少く, そのためエネルギーを授受する補酵素を必要としないのだとの考えもある。私の場合たしかに, 補酵素となり得る様な多数の化合物を共試したにもかかわらず之等が認むべき著変を示さなかつた事は他学者の報告と同様であるが, この逆反応を証明することはできなかつた。

この際同位元素を用いる事が出来なかつたが, グリコシアミンに少量のオルニチンを加えて, 之にトランスアミジナーゼとともに強力なアルギナーゼを添加した。もし逆反応が進行するならば,



となり、反応液中には最後はオルニチン、グリシン、尿素のみとなり坂口反応陽性物質は残らぬ事となるわけであるが、グリコシアミンの減少として有意の差をみとめることができなかった。

総 括

1) トランスアミジナーゼをアルギナーゼから分離精製し得た。

2) ピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミン、ペタイン、メチオニン、メタノール、ホモセリン、チオグリコル酸、システイン、ホモシステイン、ジアセチルシステアミン、CoA、ATP 及び之等のいくつかの組合せに於いて、トランスアミジナーゼの著明な活性の変化はみとめられなかった。

3) グリコシアミン + オルニチン → グリシン + アルギニンの反応はみとめられなかった。

4) 家兎、鼠の腎、鶏肝のトランスアミジナーゼはミトコンドリア部分に存する。

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た。ここに深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) Borsook, H., & Dubnoff, J. W.: Science, 91, 551, 1940; J. Biol. Chem., 138, 389, 1941.
- 2) 中村 彰: 千葉医会誌, 30, 566, 1955.
- 3) 渡辺剛夫: 同上, 34, 86, 1959.
- 4) Schneider, W. C.: J. Biol. Chem., 176, 259, 1948.
- 5) Walker, J. B.: J. Biol. Chem., 221, 771, 1956; J. Biol. Chem., 224, 57, 1957; J. Biol. Chem., 231, 1, 1958.
- 6) Ratner, S., & Rochovansky, O.: Arch. Biochem. Biophysicus 63, 277, 1956; Arch. Biochem. Biophysicus 63, 296, 1956.
- 7) Broch, K., & Schoenheimer, R.: J. Biol. Chem., 134, 785, 1940; J. Biol. Chem., 138, 167, 1941.