ニワトリ腎臓 Ornithine Transcarbamylase の性質

辻 莊一・福島 豊一

神戸大学農学部, 神戸市 657

(1979. 3. 5 受付)

ニワトリの腎臓にも Ornithine Transcarbamylase (OTC) 活性がわずかに存在するが¹⁾, 活性が低いためにこれに関する研究はほとんど知られていない。著者らは, この OTC 活性がニワトリの品種間や系統間で変異に富み, 活性のほとんどないものから極めて強いものまで広く分布していることを明らかにした^{1,2)}。また, それらのニワトリのうちでも White Leghorn (WL) 種の一系統の OTC 活性はとくに強く, その活性が主として不完全優性を示す常染色体上の遺伝子 (遺伝子記号 O_e^b) によって支配されていることを明らかにした³⁾。ところで, 今日までこのニワトリ腎臓 OTC に関して酵素化学的検討を加えた報告は知られておらず, 本酵素の生理的意義を論じるためにも, その性質を明らかにしておく必要がある。そこで, 著者らは上記の活性の強い系統のひなを用い, ニワトリ OTC の単一タンパク質への精製法を検討し, ほぼ単一と考えられる酵素たんぱく質を得たので, その方法を略記するとともに若干の酵素化学的性質について記述する。

材料と方法

活性の強い OTC の変異体の遺伝子 O_e^b をホモまたはヘテロに持つ WL 種の種鶏 (雄 8 羽, 雌 62 羽) を選抜し, 雄はその内からホモの個体を 5 羽選び, 62 羽の雌に交配してひなを得た。そのひなに市販の幼すう用飼料を給与して 7 から 10 日齢まで飼育した。1 回の酵素精製に供したひなの羽数は 200 から 500 羽で, 腎臓重量にして 140 から 350 g である。精製に供した腎臓の 1 g あたりの活性は 135 unit であった。酵素単位は 37°C, 1 時間あたり 1 μ mole の citrulline を生成する酵素量を 1 unit とした。比活性はたんぱく質 1 mg あたりの unit

であらわした。また, 新鮮ウシ肝臓 1.8 kg から MAR-SCHALL and COHEN の方法⁴⁾を用いて OTC を精製し, ニワトリ OTC の比較対照とした。

結果と考察

ニワトリ OTC の精製

ひなを断頭放血して腎臓を採取し, 氷冷 0.16M KCl にてホモジナイズし, 10,000 $\times$ g 遠心の沈澱分画を得て凍結した。この分画に 1 mM β -Mercaptoethanol (EtSH), 0.5 mM L-Ornithine $\cdot$ HCl を含む 0.05 M Potassium Phosphate Buffer を, 最初のホモジネートと同量になるように加えホモジナイズした。次いで, 0.05% Triton X-100 と 0.05% Cetyltrimethylammoniumbromide を加えてホモジナイズを続け, OTC を可溶化した。遠心後の上清分画に 60°C 1 分間と 65°C 5 分間の熱処理を加え, 熱変性したたんぱく質を除いた。この段階で比活性は 8.6 となった。熱処理上清を室温下で約 1/10 容に減圧濃縮し, Ammonium sulfate を加え, その飽和度 40~55% の分画を集めた。この分画を Biogel P-6 で脱塩し, 0.05M Tris-HCl Buffer (10 mM EtSH, 0.5 mM L-Ornithine $\cdot$ HCl を含む) で平衡化した DEAE $^{+}$ Cellulose カラムに吸着させ, KCl 濃度 0.05M と 0.1M との間に溶出される分画を集めた。この操作で比活性は 1,170 となった。この分画を Polyacrylamide ゲルのディスク電気泳動にかけると, Coomassie Blue に濃染するバンド 1 本と非常にうすく染まる 2 本のバンドとが認められた。この分画を濃縮し, 上記と同様の Tris-HCl Buffer (ただし, EtSH は含まない) で平衡化した Thiopropyl Sepharose カラムでの吸着と溶出, Biogel P-300 によるゲル濾過によって精製した。この最終溶出分画の比活性

Purification and Properties of Ornithine Transcarbamylase from Chick Kidney: Soichi TSUJI and Toyokazu FUKUSHIMA (Faculty of Agriculture, Kobe University, Kobe-shi 657)

Table 1. Some properties of ornithine transcarbamylase from the chick kidney and bovine liver.

	Ornithine transcarbamylase, sources	
	Chick kidney	Bovine liver
Specific activity (Units/mg of protein)	5,300	21,700
Optimum pH*	7.5	>8.5
Km value for L-Ornithine		
Carbamyl phosphate, 0.5 mM	1.0×10^{-3} M	3.1×10^{-3} M
Carbamyl phosphate, 0.05 mM	0.8×10^{-3} M	
Km value for Carbamyl phosphate	0.5×10^{-4} M	0.4×10^{-4} M
Inhibitors**		
<i>p</i> -Chrolomercuribenzoic acid	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M
L-Norvaline	0.5×10^{-3} M	1×10^{-3} M

* 0.25 M Triethanolamine-HCl buffer.
inhibition.

** Concentration of inhibitor at 50%

は5,325であった。この分画をディスク電気泳動すると単一と考えられるたんぱく質のバンド1本が認められた。通常のひな腎臓の比活性は0.5から1.0と推定されるので、その精製率は5,000倍以上である。しかしその回収率は良いとはいえず約4%であった。

酵素化学的性質

精製ニワトリ腎臓 OTC およびウシ肝臓 OTC を用いて若干の酵素化学的性質について検討した。表1に示すように、精製酵素の比活性は Triethanolamine-HCl Buffer, pH 7.5 を用いて、ニワトリ OTC が 5,300、ウシ OTC が 21,700 でニワトリ酵素はウシのそれに比して比活性は約1/4である。小野によればウサギ肝臓 OTC の比活性は 6,000⁵⁾で、とくにニワトリ OTC の比活性が低いとはいえない。Triethanol amine-HCl Buffer を用いて測定したニワトリ OTC の至適 pH は 7.5 で、著者らの粗抽出酵素での結果¹⁾と同一であった。これに対してウシ OTC の至適 pH は 8.5 以上でプラトーな形となり、ニワトリ OTC とは全く異った。次に基質 Ornithine に対する MICHAELIS 定数 (Km 値) は表1に示すごとく、もう一方の基質である Carbamyl phosphate (CP) 濃度が 0.5 mM と 0.05 mM で、それぞれ 1.00 mM と 0.85 mM でほとんど変化はないが、ウシ OTC では CP 濃度の上昇につれて Ornithine に対する Km 値が上昇することが知られている⁴⁾。CP に対する Km 値はニワトリ OTC, 0.05 mM, ウシ OTC が 0.04 mM であって、その差はほとんどない。なお、精製ウシ OTC の至適 pH は MARSHALL and COHEN⁶⁾によれば

pH 8.5 付近でプラトーであり、その pH での CP に対する Km 値は 0.034 mM と本実験とほぼ同じ値を示すが、CP の濃度や pH で Km 値が変りうることも指摘している。以上の結果から至適 pH において若干の相違のあるものの、pH 7.5 付近の生理的状態では、ニワトリ OTC と ウシ OTC の酵素反応上の機能にはほとんど差異のないことが明らかである。また、阻害剤に対する両 OTC の動向は基本的に同じで、*p*-Chrolomercuribenzoic acid (*p*-CMB) は非拮抗的阻害をするが、L-Norvaline と無機リン酸はそれぞれ L-Ornithine と CP の拮抗阻害剤となる。表に示すように、阻害に要する *p*-CMB の濃度は両 OTC で若干異なり、ともに精製酵素であるにもかかわらず、ニワトリ OTC の阻害にはウシ OTC の阻害に要する *p*-CMB の 10 倍量を必要とした。

著者らの研究によって、ニワトリ OTC 活性はホルモンの投与や食餌中のたんぱく質量の変化に無反応なこと⁶⁾、アルギニンもしくは尿素の合成にかかわっていないと推定されること⁸⁾、さらにはこの酵素を欠く品種が何ら支障なく生存していること²⁾などが明らかになり、その生理的意義には疑問な点が多い。しかしながら、本酵素の酵素化学的性質は、哺乳動物の代表としてとりあげたウシ OTC と極めて類似した点が多く、機能的な尿素サイクルを持つ種と持たない種における酵素の触媒能力の類似は、注目すべき事柄と考えられる。

この研究の一部は文部省科学研究費「特定研究、実験動物の純化と開発、課題番号 210707」の援助によるもの

である。

文 献

- 1) TSUJI, S., Jap. J. Zootech. Sci., **45**: 502-509. 1974.
- 2) 辻 莊一, 実験動物, **27**: 24-26. 1978.
- 3) TSUJI, S. and T. FUKUSHIMA, Biochem. Genet., **14**: 507-515. 1976.
- 4) MARSHALL, M. and P.P. COHEN, J. Biol. Chem., **247**: 1641-1653. 1972.
- 5) 小野克彦 (私信)
- 6) MARSHALL, M. and P.P. COHEN, J. Biol. Chem., **247**: 1654-1668. 1972.
- 7) 辻 莊一・福島 豊一, 日畜会報, **47**: 698-703. 1976.
- 8) 辻 莊一・福島 豊一, 日畜会報, **47**: 246-253. 1976.