次亜塩素酸による酵素の阻害について

和久敬蔵, 伊藤弘子, 中沢泰男

東京医科歯科大学医学部¹⁾

Inhibition of Several Enzymes by Hypochlorite

KEIZO WAKU, HIROKO ITO and YASUO NAKAZAWA

School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University¹⁾

(Received June 2, 1972)

In order to study the effect of free chlorine in city water on digestive enzymes, inhibition of the activities of crystalline enzyme preparations was measured at various concentrations of hypochlorite. Most of the enzymic activities were found to be somewhat affected at the concentration as small as 0.2 ppm of free chlorine, while swine pancreatic amylase exhibited a slight insensitivity. More than 40% of the activities of all enzymes tested were inhibited by the concentration of 1.0 ppm of chlorine under the experimental conditions used in this study.

ま え が き

水道水には、0.1 ppm 以上の遊離塩素を含有するよう水道法により規定されているが、遊離塩素の生体に及ぼす影響については、未だ充分研究されているとはいえず、わずかに、安藤ら²⁾が、人赤血球の膜の性質が遊離塩素として 1.0 ppm 以上の濃度で変化を生じること、また、山田ら³⁾が Hela 細胞の増殖が、安藤らの実験と同様に 1.0 ppm 以上の濃度で妨害されることを見いだしている。われわれは、水道水を飲用したとき、接触する機会が多いと考えられる消化酵素に対する影響を調べるモデル実験として、*in vitro* で市販の結晶酵素に対する遊離塩素の影響を研究した。結晶酵素を用いた理由としては、酵素が純粋であること、また、酵素の化学変化を原因とする不活性化が起これば、その変化を観察するのに適しており、そのアミノ酸の一次構造が判明しているものが多いので、酵素の活性中心と関連が付きやすいからである。また、化学変化の機構が解明されれば、一般に細胞表面などに存在する蛋白に対する遊離塩素の影響を明らかにしようという観点からも有用であると思われる。

実験方法

1. 実験材料 1) 次亜塩素酸溶液の調製——市販の次亜塩素酸溶液は微量の金属など、酵素の阻害作用を

有する物質が含有されている可能性があるので、過マンガン酸カリウムと塩酸から塩素ガスを発生させ、0.5% 過マンガン酸カリウムおよび水で洗い、0.5N NaOH 溶液中に導入して次亜塩素酸溶液を調製し、50% NaOH で pH 11.6 とした。本溶液はヨウ素法で滴定した結果、遊離塩素 1.02% を含有する。

2) 酵素標品——活性測定に用いた酵素は、いずれも結晶標品で、牛脾臓トリプシン、牛脾臓キモトリプシン (Nutritional Biochem. Co., Cleveland, Ohio, U.S.A.)、ブタ胃ペプシン、ブタ脾臓アミラーゼ、牛脾臓リボヌクレアーゼ (Worthington Biochem. Co., Freehold, New Jersey, U.S.A.)、馬肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ (Miles-Servac Ltd., Maidenhead, Berks, England) である。

3) 基質——基質は BAEE (N-benzoyl-L-arginine ethyl ester, Nutritional Biochem. Co.), ATEE (N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester, 半井化学薬品株式会社)、人赤血球ヘモグロビンを用いた。アミロースは東京理科大学薬学部滝谷研究室で精製したものを使用した。また RNA (リボ核酸, *Candida utilis*) は興人株式会社製のものを以下の方法で精製した。RNA 10 g を水 500 ml にとかし、1.0N NaOH で中和、酢酸ナトリウムを 5% に

1) Location: 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo (東京都文京区湯島 1-5-45)。

2) 安藤正典, 佐谷戸安好, 外村正治, 外村 晶, 豊島 聡, 大沢利昭, 衛生化学, 18, 13 (1972)。

3) 山田正篤, 張 東玄, 日本薬学会第91年会, 福岡, 1971年4月。

なるように加え、2倍量のエタノールを加えRNAを沈殿させる。上記操作を更に一度くりかえし、沈殿を透析、凍結乾燥させた。

4) DPN—Sigma Co., Ltd. (St. Louis, Mo., U.S.A.) のものを使用した。

2. 酵素の活性測定 1) トリプシン—Schwert and Takenaka⁴⁾の方法により活性測定を行なった。トリプシン 6 μ g を含有する 0.001N HCl 20 μ l, 次亜塩素酸ナトリウム液 10 μ l を 0.05M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 1 ml に加えた。この際、次亜塩素酸ナトリウム液は総量 1.03 ml 中で遊離塩素として 0.2, 0.4, 0.6 ppm になるように調製しておいた。室温 (25°) で 1 時間インキュベート後、0.006M BAEE 0.1 ml を加えて一定時間後 253 m μ の吸光度の増加を測定した。次亜塩素酸ナトリウムを含まない 0.1N NaOH (塩酸で中和し pH を 11.6 としたもの) 10 μ l を次亜塩素酸ナトリウム液の代わりに加えたものを盲検の値とした (以下の酵素活性測定の際はすべてこの操作を行なった)。

2) キモトリプシン—Schwert and Takenaka⁴⁾の活性検定法を用いて活性測定を行なった。キモトリプシン溶液 (600 μ g/ml, 0.001M HCl) 10 μ l, 次亜塩素酸ナトリウム液 10 μ l, インキュベーション液中で 0.1, 0.5, 1.0 ppm になるように調製) を 0.05M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 1 ml に加え 25° 恒温槽中で 1 時間インキュベートし、その 0.5 ml に 0.05M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 0.5 ml および 0.01M ATEE 1 ml を加え、一定時間後 237 m μ における吸光度の減少を測定した。

3) ペプシン—Herriott⁵⁾の方法により活性測定を行なった。ペプシン 10 μ g を水 1 ml にとかし、次亜塩素酸ナトリウム溶液を pH 11.0 に再調製し、その 10 μ l (インキュベーション液中で遊離塩素が 0.1, 0.5, 1.0 ppm になるように調製) を加えた。このインキュベーション液は pH 8.0 である。これを 25°, 1 時間インキュベートし、その 0.1 ml をとり 0.06N HCl にとかした 1.17% ヘモグロビン溶液 0.5 ml を加えた。一定時間反応後 5% トリクロル酢酸 1 ml を加え 20 分室温放置、遠心分離 (3000回転) し、上清 0.5 ml に 0.5N NaOH 1 ml,

フェノール試液 (処方) 0.3 ml を加え生じる青色を 660 m μ で測定した。

4) アミラーゼ—Bernfeld⁶⁾の方法によって活性測定を行なった。アミラーゼ 5 μ g を 0.01M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 1 ml にとかし、これに次亜塩素酸ナトリウム溶液 10 μ l を加えインキュベーション液中で遊離塩素 0.5, 1.5, 2.0 ppm になるようにした。25°, 1 時間インキュベート後この 0.3 ml をとり 1% アミロース溶液 (0.02M リン酸緩衝液, pH 7.0) 0.5 ml, 0.01M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 0.2 ml を加え発色試薬 (3,5-ジニトロサリチル酸 1 g を 2N NaOH 20 ml と水 50 ml にとかし、ロッシェル塩 30 g を加えたのち、水を加えて 100 ml とする) 1 ml を加えて 100°, 5 分加熱し、冷却後水で全量を 10 ml とし、540 m μ で吸光度を測定した。

5) リボスクレアーゼ (RNase)—McDonald⁷⁾の方法により測定した。RNase 2 μ g を 1 ml の 0.05M リン酸緩衝液 (pH 8.0) にとかし、次亜塩素酸ナトリウム溶液 10 μ l を遊離塩素として 0.1, 1.0, 10.0 ppm になるように加えた。25°, 1 時間インキュベートした後、その 0.25 ml (RNase 0.5 μ g), 0.05M リン酸緩衝液 0.25 ml, RNA 溶液 0.5 ml (RNA 5 mg を 0.1M 酢酸緩衝液 pH 5.0 にとかしたもの) を加え、一定時間反応後、TCA 試薬 (トリクロル酢酸 2.5 g および酢酸ウラニル 0.25 g を水 100 ml に溶解) 1 ml を加え 30 分放置したのち遠心分離 3000 回転) し、上清 1 ml に水 5 ml を加え、260 m μ の吸光度を測定した。

6) アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)—Bonnichsen and Brink⁸⁾の方法により測定した。ADH 8.2 μ g を 0.05M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 0.5 ml にとかし、次亜塩素酸ナトリウム溶液 10 μ l (インキュベーション液中で 0.1, 0.3, 0.5 ppm になるように調製) を加え 25°, 1 時間インキュベートした。エタノール 0.1 ml, 0.1M グリシン緩衝液 (pH 9.6) 3 ml, 1% DPN 水溶液 0.1 ml を加え、340 m μ の吸光度の増加を測定した。

3. 次亜塩素酸の基質に対する影響 1) BAEE に対する影響—0.006M BAEE (0.05M リン酸緩衝液, pH 8.0) 50 μ l を同緩衝液 1.0 ml に加え、253 m μ にお

- 4) G. W. Schwert, Y. Takenaka, *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 570 (1955).
- 5) R. M. Herriott, "Method in Enzymology," Vol. 2, ed. by S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1955, pp. 3—7.
- 6) P. Bernfeld, "Advances in Enzymology," Vol. 12, ed. by F. F. Nord, Interscience Publishers Inc., New York, N. Y., 1951, p. 385.
- 7) M. R. McDonald, "Method in Enzymology," Vol. 2, ed. by S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1955, p. 427.
- 8) R. K. Bonnichsen, N. G. Brink, "Method in Enzymology," Vol. 1, ed. by S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1955, p. 495.

ける吸光度を測定した。ついでこれに次亜塩素酸ナトリウム溶液 $10\mu\text{l}$ を加え、遊離塩素濃度 1.0 ppm とし、30秒—10分後にわたり吸光度を測定した。

2) ATEE に対する影響—— 0.01 M ATEE (0.05 M リン酸緩衝液, $\text{pH } 8.0$) $50\mu\text{l}$ を同緩衝液 1.0 ml に加え、 $237\text{ m}\mu$ における吸光度を測定した。これに次亜塩素酸ナトリウム溶液 $10\mu\text{l}$ を加えて、遊離塩素濃度 1.0 ppm とし、30秒—10分後における吸光度を測定した。

3) ADH 活性測定時の基質に対する影響—— 1% DPN 水溶液 0.1 ml , エタノール 0.1 ml を 0.1 M グリシン緩衝液 ($\text{pH } 9.6$) 3 ml に加え、 $340\text{ m}\mu$ における吸光度を測定した。これに次亜塩素酸ナトリウム溶液 $10\mu\text{l}$ を加え、遊離塩素濃度を 1.0 ppm とし、30秒—10分後にわたり吸光度を測定した。

結 果

Fig. 1 はトリプシンの活性に対する遊離塩素の阻害を示したものであり、 0.2 ppm で阻害をおこし始め、 0.6 ppm では、ほぼ 25% の活性にまで減少した。

Fig. 1. Inhibition of Bovine Pancreatic Trypsin by Hypochlorite

Fig. 2 はキモトリプシンの活性に対する遊離塩素の阻害を示したものであり、遊離塩素濃度 0.1 ppm から阻害をおこし始め、 1.2 ppm で、ほぼ 25% の活性を示した。

Fig. 2. Inhibition of Bovine Pancreatic Chymotrypsin by Hypochlorite

Fig. 3 はペプシンの活性に対する遊離塩素の阻害を示したもので、 0.1 ppm から阻害をおこし始め、 1.0 ppm で、ほぼ 30% の活性にまで減少した。

Fig. 3. Inhibition of Swine Gastric Pepsin by Hypochlorite

Fig. 4 はアミラーゼの活性に対する遊離塩素の阻害を示したものであり、この場合は他の酵素と異なり 0.5 ppm から阻害をおこし始め、 2.0 ppm では 20% の活性を示すにいたった。

Fig. 4. Inhibition of Swine Pancreatic Amylase by Hypochlorite

Fig. 5 は RNase の活性に対する遊離塩素の阻害を示したものであり、 0.1 ppm から阻害をおこし始め、 10.0 ppm ではほぼ完全に阻害された。この酵素は完全に阻害される遊離塩素の濃度は他の酵素より多く 10.0 ppm を必要とした。

Fig. 5. Inhibition of Bovine Pancreatic Ribonuclease by Hypochlorite

Fig. 6 は ADH の活性に対する遊離塩素の阻害を示したものであり、この酵素は、いわゆる消化酵素ではないが、典型的な SH 酵素であり、遊離塩素の酸化作用に対し鋭敏であろうという予想の下に行なわれた。結果は 0.1 ppm から阻害を起し始め、 0.5 ppm では完全に阻害

Fig. 6. Inhibition of Horse Liver Alcohol Dehydrogenase by Hypochlorite

された。

以上の酵素反応において基質あるいは補酵素に対し遊離塩素が化学変化を与えると酵素の見かけ上の反応速度に影響を与えることになるが、本実験で用いた反応系のうち、遊離塩素量に比し基質量あるいは補酵素量の少ない、トリプシン、キモトリプシンおよび ADH の活性測定系において遊離塩素の影響は Table I に示すようにほとんど認められなかった。

TABLE I. Effect of Hypochlorite on the Substrate or Cofactor

Time	Absorbancy		
	BAEE 253 mμ	ATEE 237 mμ	DPN 340 mμ
Before adding hypochlorite	0.816	0.822	0.042
30 sec after adding	0.816	0.836	0.042
1 min	0.816	0.836	0.042
2 min	0.818	0.836	0.042
3 min	0.818	0.836	0.043
4 min	0.818	0.836	0.043
5 min	0.818	0.836	0.043
10 min	0.818	0.840	0.034

考 察

水道法による遊離塩素の水道水中の含有量は 0.1 ppm 以上であると定められているが、本実験に示されたように、飲用した場合に水に触れる機会が多いと考えられる消化酵素に対し、ほぼ 0.1 ppm 以上の遊離塩素で阻害が認められた。はじめにのべたように人赤血球の実験、Hela 細胞の実験によると、1.0 ppm 以上ではなんらかの影響が出ているが、本実験では 0.1 ppm より阻害が起

った。この理由については、1) 使用した酵素が数 μg で非常に少量であること、2) 酵素がすべて結晶で非常に純粋なことがあげられる。

本実験において用いた加水分解酵素は消化管中に分泌され、水道水中の遊離塩素と接触する可能性を有するものである。この中には活性中心が判明しているものもあり、たとえばキモトリプシンはアスパラギン酸、ヒスチジン、セリンが活性中心に関与し、⁹⁾ トリプシンもほぼ同様であり、¹⁰⁾ リボヌクレアーゼは 2 個のヒスチジンと 1 個のリジンとが活性中心に与っている¹¹⁾といわれる。それぞれ関与しているアミノ酸残基は異っているが、遊離塩素のそれぞれの酵素の失活に有効な濃度は特に大きな差異は見いだされなかった。これに対し ADH はシステインの SH 基が活性中心を構成しており、¹²⁾ 加水分解酵素に対する比較の意味で用いたものであるが、加水分解酵素に比し遊離塩素にやや鋭敏であった。これら酵素の不活性化の機構については今後の研究に待たねばならないが、たとえば遊離塩素が活性中心に作用しなくても他のアミノ酸残基に作用し、それが原因で蛋白の二次、三次、四次元の構造が変化し不活性化をひきおこしているという可能性も考えられる。

ただし、この実験は *in vitro* における一種のモデル実験であって、実際には水道水を飲用した際、消化塩素に達する前に唾液および口中、食道、胃壁などの細胞膜、食物などに接触するので、飲料水の遊離塩素が消化酵素に実際に接触するか否か、又接触するとすれば、どの程度の濃度になるのかは今後の研究にまたなければならない。また、沢村ら¹³⁾ はペプシンの場合、残留塩素が 10—20 ppm の濃度にまで存在する場合に酵素活性が消失すると述べている。しかしながら酵素と遊離塩素と接触する際、どのようなことがどんな濃度でおこるかの知見を得ておくことの意義の大きさについては論をまたず、本実験の意義もそこに存在するものと考ええる。

謝辞 本研究はその費用の一部を厚生省医療研究助成補助金によった。ここに謝意を表する。またアミラーゼおよびアミロース標品を分与された東京理科大学薬学部 滝谷昭司教授、ヘモグロビン標品を恵与された本学医学部 笹月健彦博士に厚く感謝する。

- 9) G. P. Hess, J. A. Rupley, *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 1013 (1971).
- 10) P. Desnuelle, "The Enzymes," Vol. 4, ed. by P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback. Academic Press Inc., New York, N. Y., 1960, p. 119.
- 11) E. A. Barnard, *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 677 (1969).
- 12) H. Sund. H. Theorell, "The Enzymes," Vol. 7, ed. by P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1963, p. 25.
- 13) 沢村良二, 馬場厚子, 赤木順子, 日本薬学会第92年会, 大阪, 1972年4月.