グルタミン酸脱水素酵素の活性におよぼすトリエタノール アミンなどの影響^{*1}

林 弘祐, 須原清治

名古屋大学医学部附属病院薬剤部^{*2}

Effects of Triethanolamine and Related Compounds on the Enzyme Activity of Glutamic Acid Dehydrogenase^{*1}

HIROSUKE HAYASHI, and KIYOHARU SUHARA

Pharmacy of Nagoya University Hospital^{*2}

(Received November 16, 1982)

An investigation was attempted to determine the effects of triethanolamine, monoethanolamine, ammonium sulfate, hydrazine hydrate and hydroxylamine hydrochloride on the enzyme activity of glutamic acid dehydrogenase which is a pyridine enzyme playing an important role in the oxidation and reduction of living bodies. Results obtained were as follows:

1) Sodium glutamate and DPN were dissolved in a potassium phosphate buffer solution. Immediately after addition of the enzyme solution to the buffer, each of the above reagents in different concentrations was added to determine the effects of the mixtures on the enzyme activity for 6 minutes. Triethanolamine, monoethanolamine and hydrazine hydrate enhanced the enzyme activity. The largest increase, about 46%, was observed in the monoethanolamine mixture at the final concentration of 3.3×10^{-2} M. The second largest increase was found in triethanolamine and the smallest in hydrazine hydrate.

2) Hydroxylamine hydrochloride and ammonium sulfate inhibited the activity of glutamic acid dehydrogenase; ammonium sulfate inhibited the enzyme activity by about 50% at the final concentration of 5.0×10^{-3} M, and the percentage was higher than that caused by hydroxylamine hydrochloride.

Keywords—glutamic acid dehydrogenase; diphosphopyridinenucleotide; enzyme reaction; enhancement of enzyme activity; triethanolamine; monoethanolamine; hydrazine hydrate; inhibition of enzyme activity; ammonium sulfate; hydroxylamine hydrochloride

医薬品は生体に適用され、疾病の治療、診断、予防に用いられるので、これの有効性、安全性は重要となってくる。とくに最近、医薬品の副作用が重要視され、医薬品の安全性が叫ばれるようになった。現在用いられている医薬品あるいは医薬品添加物についても、現時点においてその使用量以内では生体に対する安全性が認められており、まるごとの生体についての影響は考えられなくても、その生体の酵素レベルにこれら医薬品、医薬品添加物がどのような影響をあたえるか、また、これが長期投与によって問題が起きることも考えられる。とくに近

年、医薬品の相互作用において、ある医薬品が生体の酵素誘導、あるいは酵素阻害によって、他の併用医薬品の作用に影響をあたえることによる投与医薬品の薬効の減弱あるいは副作用の発現^{1,2)}が問題となっており、医薬品の生体内酵素におよぼす影響もクローズアップされてきた。

著者らはこの点に着目し、医薬品およびその他の添加物が生体内酵素の酵素活性におよぼす影響について検討し、若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 実験材料

近年、抗生物質などが広く用いられるようになり、これに伴いビタミンとくにビタミンB₁、B₂の欠乏による副

^{*1} 日本薬学会東海支部病薬例会（岐阜，1977年）で発表。

^{*2} 名古屋市昭和区鶴舞町65；65，Tsurumai-cho，Showa-ku，Nagoya，466 Japan

作用が報告され^{3,4)} このビタミン欠乏症はいわゆるアリポフラビノーゼないしペラグラ様症状といわれている^{5,6)} が、これは抗生物質がフラビン酵素におよぼす阻害作用による問題と考えられている。しかし、同じビタミンB群で抗ペラグラ・ビタミンであるニコチン酸アミドの誘導体を補酵素とするピリジン酵素におよぼす医薬品の影響はあまり報告されていなく、わずかに八木⁷⁾ らの報告があるのみであるので、今回著者らはニコチン酸アミドの誘導体 diphospho-pyridine-nucleotide を補酵素とし、生体の酸化・還元、すなわち生体内の水素の伝達に重要な役割をはたすピリジン酵素のうちの一つであ

るグルタミン酸脱水素酵素を用い、この酵素活性におよぼす影響について検討した。

グルタミン酸脱水素酵素アポ酵素は久保⁸⁾ の方法にしたがい、Fig. 1に示す方法により調製し、これを0.05 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.6) に溶解したものを0.2 ml用いた。八木⁷⁾ はこのグルタミン酸脱水素酵素の酵素活性にビタミンB₂の溶解補助剤として用いられているニコチン酸アミドが阻害することを報告しているので、われわれも溶解補助剤として用いられているトリエタノールアミン、モノエタノールアミン、さらに硫酸アンモニウム、ヒドロキシルアミン、抱水ヒドラチンなど

Fig. 1. Procedure of Glutamic Acid Dehydrogenase

Table 1. Samples Used in This Experiment

Nicotinamide
Triethanolamine	$N(CH_2 \cdot CH_2 \cdot OH)_3$
Monoethanolamine	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot OH$
Ammonium Sulfate	$(NH_4)_2 SO_4$
Hydroxylamine Hydrochloride	$NH_2 \cdot OH - HCl$
Hydrazine Hydrate	$NH_2 \cdot NH_2 - H_2O$

Table 2. The Systems of Enzyme Reaction

	1	2	3
0.5M Sodium Glutamate	(ml) —	(ml) 0.2	(ml) 0.2
3 mM D P N	0.1	0.1	0.1
Enzyme Solution	0.2	0.2	0.2
0.5M Phosphate Buffer	3.7	3.5	3.3
Sample	—	—	0.2

Table 1 に示したように、アミンを中心に医薬品およびその他の添加物として用いられている化合物について、これがグルタミン酸脱水素酵素の活性にどのような影響をあたえるかを検討した。

Diphospho-pyridine-nucleotide (以後 DPN と略す) はグルタミン酸脱水素酵素の補酵素であるが、これは California Foundation 製のナトリウム塩を精製水で 3 mM の濃度に溶解して用いた。

グルタミン酸ナトリウム、基質としてのグルタミン酸ナトリウムは市販試薬の結晶を精製水に溶解し、0.5 M の濃度とした。

2. 実験方法

1) 酵素活性の測定法

グルタミン酸脱水素酵素は基質から水素を離脱し、その水素を DPN に与え DPN は DPNH となる。Fig. 2 に示すように、DPN は 260nm において著しい吸収帯を持っているが、DPNH となると 260nm における吸収帯はわずかに減少し、340nm のところに新たな吸収帯があらわれてくる。⁹⁾ したがって DPN→DPNH に変化する

と 340nm での吸光度が当然変化してくるので、定められた測定条件の下において吸光度が変化する割合は酵素活性に直接依存しており、一般に脱水素酵素の酵素単位は 1 分間に 340nm での吸光度の 0.001 の変化として定義されている。¹⁰⁾

著者らはグルタミン酸脱水素酵素の酵素活性と Table 1 の被検物が酵素におよぼす影響を検討するため、Table 2 に示すような酵素反応系を用いた。基質グルタミン酸ナトリウム、補酵素 DPN をリン酸カリウム緩衝液に溶解し、分光光度計の 10mm セル中に入れ、酵素液 0.2ml を添加後すみやかに攪拌して 340nm の吸光度の変化を 1 分ごとに 6 分間測定し酵素活性を求めた。同様にリン酸カリウム緩衝液 0.2ml のかわりに被検物を所定濃度より倍数希釈したものを 0.2ml 加えよく攪拌後、10 分間放置して、平衡に達してから酵素液を 0.2ml 添加して 1 分毎の 340nm の吸光度を測定し、被検物がグルタミン酸脱水素酵素の酵素活性におよぼす影響を検討した。また、対照としてグルタミン酸ナトリウムあるいは被検物を同量のリン酸カリウム緩衝液に置きかえたもの

Fig. 2. The Absorption Spectrum of DPN and DPNH

を同様に測定した。なお、本実験は室温 20~25°C で行った。

実験結果と考察

1. ゲルタミン酸脱水素酵素の活性化

基質、補酵素、グルタミン酸脱水素酵素による酵素反応系に対し、溶解補助剤として用いられているトリエタノールアミンを終濃度 (Table 2 の酵素反応系における全容積中の被検物のモル濃度、以後これを終濃度と記す) として $5.0 \times 10^{-2} \text{M}$ から各 2 倍に倍数希釈したものを添加した時の酵素活性におよぼす影響について Fig. 3 に示した。トリエタノールアミンはグルタミン酸脱水素酵素の作用を活性化し、それはトリエタノールアミンの添加濃度が高濃度になるにしたがい酵素活性化作用は大となり、終濃度 $5.0 \times 10^{-2} \text{M}$ においては無添加に比し約 34% 酵素作用を増強し、本実験における最も低濃度の $1.25 \times 10^{-2} \text{M}$ でも約 8.4% 酵素作用を活性化した。

モノエタノールアミン、抱水ヒドラチンも同様にグルタミン酸脱水素酵素の酵素活性を Fig. 4, 5 に示すように増強した。モノエタノールアミンはグルタミン酸脱水素酵素の活性化作用は最も強く、終濃度 $3.3 \times 10^{-2} \text{M}$ において約 46% 酵素作用が増強し、抱水ヒドラチンは前二者に比しその活性化作用は弱く、終濃度 $5.0 \times 10^{-2} \text{M}$ において約 25.6% グルタミン酸脱水素酵素作用の増強を示した。

Fig. 3. Effect of Triethanolamine on Glutamic Acid Dehydrogenase

Fig. 4. Effect of Monoethanolamine on Glutamic Acid Dehydrogenase

Fig. 5. Effect of Hydrazine Hydrate on Glutamic Acid Dehydrogenase

Fig. 6. Effect of Ammonium Sulfate on Glutamic Acid Dehydrogenase

Fig. 7. Effect of Hydroxylamine Hydrochloride on Glutamic Acid Dehydrogenase

2. グルタミン酸脱水素酵素の阻害

グルタミン酸脱水素酵素系に対し硫酸アンモニウム、ヒドロキシルアミンを添加した時、Fig. 6, 7に示したようにその酵素活性を阻害、減弱した。硫酸アンモニウムはグルタミン酸脱水素酵素に対し、終濃度 $5.0 \times 10^{-3} M$ より各2倍倍数希釈により添加した時、各濃度において酵素作用を大きく阻害した。終濃度 $5.0 \times 10^{-3} M$ において約50%、本実験における最も低濃度 $6.4 \times 10^{-4} M$ においても約16.8%グルタミン酸脱水素酵素の活性を阻害した。

ヒドロキシルアミンも同様にグルタミン酸脱水素酵素の活性を阻害したが、硫酸アンモニウムよりその阻害作用は弱く、硫酸アンモニウムの10倍に近い濃度 $5.0 \times 10^{-2} M$ でも約13.3%酵素活性を低下させたのみである。

以上のようにグルタミン酸脱水素酵素の酵素反応系にトリエタノールアミンなど医薬品その他の添加物を加えた時、トリエタノールアミン、モノエタノールアミン、抱水ヒドラチンの順でグルタミン酸脱水素酵素の活性を増強し、硫酸アンモニウム、次いでヒドロキシルアミンが酵素作用を阻害した。

最近、医薬品の相互作用において生体内酵素の誘導、阻害による副作用、薬効の減弱がいわれているが、このような肝ミクロゾームにおける薬物代謝酵素量を増加させる酵素誘導や生体の各臓器などの作用点あるいは受容体への競い合い阻害など生体レベルによる作用以外にも、*in vitro* における酵素、補酵素、基質による酵素反応系に直接およぼす阻害、活性化作用により酵素作用を変化し、それによる生体への影響も考えられる。しかし実際には医薬品その他の添加剤を生体に適用した時、これらの物質がこのような高濃度で生体内酵素に接触するとも考えにくく、また、決められている使用量以内においてはとくに副作用についても問題にしくなくてもよいかも知れないが、長期にわたる使用、高濃度による生体内酵素に対する影響、さらにそれらによる生体への副作用についても無視することはできないと考える。

結 論

生体内における酸化・還元、すなわち水素の伝達に重要な役割をはたすビリジン酵素の一つであるグルタミン酸脱水素酵素の酵素活性について、医薬品の溶解補助剤であるトリエタノールアミン、モノエタノールアミンなど医薬品その他の添加物、硫酸アンモニウム、ヒドロキシルアミン、抱水ヒドラチンなどアミンを中心にこれら化合物がどのような影響をおよぼすかについて検討し、次の結果を得た。

1. グルタミン酸ナトリウム, DPN をリン酸カリウム緩衝液に溶解し, これにグルタミン酸脱水素酵素液を添加, この酵素活性について前記各化合物の所定濃度に希釈したものを加え, 6 分間の酵素活性におよぼす影響を測定したところ, トリエタノールアミン, モノエタールアミン, 抱水ヒドラチンがグルタミン酸脱水素酵素の作用を増強した. これらのうちではモノエタノールアミンが終濃度 $3.3 \times 10^{-2} \text{M}$ において無添加に比し約46%酵素活性を増強し, 最も酵素活性の増強が大であった. 次にトリエタノールアミン, 最も酵素活性の増強作用が少なかったものは抱水ヒドラチンであった.

2. グルタミン酸脱水素酵素の酵素活性を阻害したものはヒドロキシルアミン, 硫酸アンモニウムであり, 硫酸アンモニウムは終濃度 $5.0 \times 10^{-3} \text{M}$ において約50%グルタミン酸脱水素酵素の活性を阻害し, それはヒドロキシルアミンの酵素活性阻害作用よりはるかに大であった.

文 献

- 1) W. D. Diamond, R. A. Buchanan : J. Clin. Pharmacol., 10, 306 (1970).
- 2) J. Christiansen, M. Dam : Acta Neurol Scand., 49, 543 (1973).
- 3) R. L. Brown : Arch. Otolaryng., 45, 35 (1947).
- 4) H. J. Harris : J. Am. Med. Assoc., 142, 161 (1950).
- 5) 青山進午, 岸川基明, 菊地三郎, 苅谷徹, 長谷川栄一, 藤原洋一, 伊藤吉夫, 水谷広治, 山田己年夫, 八木国夫 : 日本医事新報, 1606, 24 (1955).
- 6) K. Yagi, J. Okuda, T. Ozawa, K. Okada : Science, 124, 273 (1956).
- 7) 八木国夫, 八木鉦文 : 生化学, 32, 53 (1960).
- 8) H. Kubo, T. Yamano, M. Iwatsubo, H. Watari, T. Soyama, J. Shiraishi, S. Sawada, N. Kawashima, S. Mitani, K. Ito : Bull. Soc. Chim. Biol., XL, 431 (1958).
- 9) 江上不二夫編 : “標準生化学実験法,” 文光堂, 1953, p. 301.
- 10) 三浦義彰監訳 : “ハーバー・生化学,” 丸善, 1980, p. 58.