ビタミン C と蛋白代謝との関係 (8)

Relationship between Vitamin C and Protein Metabolism (VIII)

白鼠及びモルモット肝組織並びにその抽出酵素の
尿素生成に対するビタミン C の影響

Influence of Vitamin C on the Urea Synthesis by Liver Homogenate and
Extracted Enzyme of Liver in the Albino Rat and Guinea Pig.

(昭和33年8月8日受理)

広 部 り う
(Ryu Hirobe)

The activity of urea formation of rat's and guinea pig's liver homogenates and that of arginase extracted from their livers were compared in the presence and absence of *l*-ascorbic acid and the following results were obtained.

1) The activity of urea formation in the liver of rats fed on diets containing various amounts of protein was higher in a high protein diet than in a low protein diet.

2) The activity of urea formation in liver and of arginase extracted from the liver of rat and guinea pig were higher slightly in the presence of *l*-ascorbic acid than in the absence of it.

著者は前報⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾において (1) 白鼠尿中 V.C, 総窒素および尿素態窒素の増減はその摂取蛋白量の増減に従うこと, (2) 飼料中蛋白質の一部をアンモニウム塩で置き換えてもその尿中 V.C, 総窒素および尿素態窒素含量の関係は (1) の場合のごとくであること, (3) 白鼠飼料中の蛋白含量の増減は臓器中の V.C 含量の増減をともなうことを報告した。以上の実験結果を総合すれば白鼠飼料中の蛋白 (又は蛋白代替うるアンモニウム塩を含めて) の増減は臓器中 V.C 含量の増減をともない, 尿中 V.C および尿素態窒素の増減をともなうということになる。尿素形成に重要な役割を演ずるアルギナーゼは Fe^{++} -V.C により促進されるといわれるので肝中尿素生成と V.C とは果して関係ありやということを検討するために本実験を行つた。F. N. Gurd¹⁾ は蛋白欠乏食で飼育した白鼠肝の貯蔵蛋白の失われるにつれて肝中アルギナーゼの減少することを認め Miller²⁾ は無蛋白白鼠の肝中アルギナーゼ等の減少することを認めている。Mohamed³⁾ は肝アルギナーゼの調製法について Mn^{++} を添加し, アセトン沈澱法, その作用の至適 pH 等を述べている。児玉桂三氏⁴⁾ はアルギナーゼの性質, 作用の測定法等について, また赤堀四郎氏⁵⁾ もこれらについて述べている。

実験および結果

実験 [I]

成熟した白鼠を出血死させ, 肝臓をとり出し氷上で冷

却し, 乳鉢で粥状にする。これを4個のフラスコに分け下記のごとく添加物質を加えて 38°C に数時間保ち, 後三塩化酢酸で除蛋白し, pH を 7.4 に整えてその生成アンモニア態窒素及び尿素態窒素を (Van Slyke, Cullen 法)¹⁰⁾ により測定した。

A. 15g 肝粥 + 9cc $\text{M}/15$ 磷酸ソーダ緩衝液 pH7.4

B. (A) + 1cc L-アスコルビン酸 (1mg)

C. (A) + 0.25cc 塩化アンモニウム (0.5mg)

D. (C) + 1cc L-アスコルビン酸 (1mg)

(A, B, C は水で D と同容量に整える)

結果を第1表に示す。

これによれば L-アスコルビン酸添加の場合, 対照に比して生成尿素態窒素量がやや大である。しかしその差は多くは数%で著明な影響はない。また保温時間2時間の場合が変化が最も規律的で, (C) の平均 0.99mg に対し, (D) は 1.21mg を示した。

実験 [II]

白鼠を無蛋白食群, 10%蛋白食群, 20%蛋白食群 (標準食) の3群に分け (第2表のごとくで, その他の添加飼料は従前のとおりにする)

9日間飼育したものの肝臓組織を用いて実験 [I] 同様の測定を行つた。結果を第3表に示す。

これによれば生成尿素量は無蛋白食群 < 半蛋白食群 < 標準食群となつている。V.C 添加の場合が対照に比して一般に生成尿素量大であるが, その影響は無蛋白及び低蛋白において著明にあらわれるようである。

第 1 表 Influence of V.C on the activity of Urea formation in Rat's liver homogenate
38°C

Number of Animals	Time of incubation (hour)	per 10g tissue							
		(A) Tissue + H ₂ O		(B) Tissue + V.C		(C) Tissue + NH ₄ Cl		(D) Tissue + NH ₄ Cl + V.C	
		Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg
1	0	0.43	0.78	0.43	0.70	0.88	0.77	0.95	0.78
2		0.35	0.86	0.36	0.84	0.83	0.72	0.92	0.82
3		0.39	1.47	0.39	1.46	1.16	1.26	1.17	1.64
4		0.49	1.36	0.49	1.26	1.26	1.07	1.27	1.09
5		0.51	0.58	0.51	0.88	1.17	1.03	1.17	1.10
Average		0.43	1.01	0.44	1.03	1.06	0.97	1.10	1.09
1	0.5	0.53	0.75	0.53	0.75	0.76	0.82	1.11	0.70
2		0.43	0.79	0.43	0.85	1.07	0.36	1.07	0.57
3		0.77	1.35	0.77	1.26	1.26	1.54	1.26	1.64
4		0.87	1.36	0.87	1.45	1.55	1.36	1.46	1.37
5		0.82	0.74	0.52	1.03	1.26	1.03	1.56	1.10
Average		0.68	1.00	0.62	1.07	1.18	1.02	1.92	1.08
1	1.0	0.53	0.66	0.57	0.67	0.98	0.67	1.27	0.77
2		0.53	0.96	0.64	0.97	1.07	0.81	1.13	0.93
3		0.77	1.45	0.87	1.55	1.35	1.64	1.65	1.64
4		0.87	1.46	0.92	1.49	1.65	1.36	1.96	1.37
5		0.91	0.89	0.91	1.03	1.56	0.74	1.54	1.32
Average		0.72	1.08	0.78	1.14	1.32	1.04	1.51	1.21
1	2.0	0.60	0.82	0.67	0.98	1.17	0.75	1.17	0.85
2		0.60	0.83	0.60	0.84	1.05	0.83	1.13	0.99
3		0.78	1.73	0.78	1.85	1.55	1.24	1.51	1.79
4		0.98	1.47	0.98	1.47	1.77	1.37	1.77	1.47
5		0.99	1.20	0.88	1.40	1.90	0.74	1.61	0.96
Average		0.79	1.21	0.78	1.31	1.49	0.99	1.44	1.21
1	4.0	0.87	1.03	0.87	1.03	1.41	0.99	1.41	1.06
2		0.78	0.99	0.71	0.96	1.03	0.57	1.27	0.78
3		1.16	1.84	1.12	1.80	1.84	2.14	1.75	2.05
4		1.48	1.57	1.47	1.37	1.74	1.95	1.74	2.10
5		1.46	1.09	1.10	1.31	2.19	1.17	2.05	0.80
Average		1.15	1.30	1.05	1.29	1.64	1.36	1.64	1.36

第 2 表 Composition of the Diet (%)

Group	Whole amount	Starch	Fish-meal	Soybean oil	Mocollum's Salt No. 185
Non-protein diet	100	85	0	10	5
Half-protein diet	100	75	10	10	5
Normal diet	100	65	20	10	5

第3表 Influence of V.C on the activity of Urea formation in the Rat liver. 38°C 2 hours.

Group	Animal No.	Body Weight		Weight of Liver g	per 10g tissue								
		Before g	After g		N mg	(A) Tissue + H ₂ O		(B) Tissue + V.C.		(C) Tissue + NH ₄ Cl		(D) Tissue + NH ₄ Cl + V.C	
						Am- monia N mg	Urea N mg	Am- monia N mg	Urea N mg	Am- monia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg
Non- protein diet	7	249	224	7.2	221	1.02	0.09	1.11	0.09	1.54	0.26	1.63	0.23
	10	246	213	7.1	225	1.02	0.17	0.94	0.43	1.88	0.17	1.88	0.34
	3	219	208	7.0	231	0.92	0.29	0.86	0.36	1.73	0.17	1.73	0.35
	14	232	213	6.4	235	0.94	0.34	0.94	0.34	1.71	0.17	1.63	0.42
	Ave.				226	0.98	0.22	0.96	0.31	1.72	0.19	1.72	0.34
10% protein diet	5	233	234	7.8	302	0.80	1.30	0.80	1.30	1.50	0.80	1.50	1.00
	17	232	242	8.1	245	1.00	0.50	1.00	0.60	1.40	1.00	1.40	1.00
	8	212	220	7.0	263	0.70	0.50	0.70	0.80	1.50	0.60	1.50	0.90
	11	244	221	7.8	263	0.95	0.40	0.95	0.50	1.50	0.70	1.50	0.90
	Ave.				268	0.86	0.68	0.86	0.80	1.48	0.78	1.48	0.95
20% protein diet	6	235	243	8.7	350	1.00	1.20	1.09	1.20	1.80	1.20	1.75	1.30
	9	215	235	8.3	324	0.95	1.10	0.95	1.20	1.70	1.10	1.70	1.30
	15	227	240	8.3	306	1.10	0.50	1.10	0.50	1.80	0.60	1.70	0.70
	2	218	236	8.3	353	1.02	1.23	1.02	1.37	1.75	0.81	1.67	1.09
	Ave.				333	1.02	1.01	1.04	1.06	1.76	0.93	1.71	1.10

実験〔Ⅲ〕

白鼠肝を磨碎し、グリセリン水(1:1容)を加えて遠沈し、上清酵素液⁴⁾をアルギニンに加え、L-アスコルビン酸液を添加条件として(2cc0.1Mアルギニン+1cc0.1N苛性ソーダ+3cc水+2cc $\frac{N}{10}$ グリシン- $\frac{N}{10}$ NaOH 緩衝液 pH9.2+2cc上清酵素液)をA液とし、A液に0.03, 0.06, 0.09mg L-アスコルビン酸を加え、38°C 1時間保温後実験〔Ⅰ〕同様の方法にて尿素生成作用量を測定した。結果を第4表に示す。これによれば肝抽出液はアルギニンに作用して尿素を生成する際V.Cの存在はいく分その作用を強めると認められる。

実験〔Ⅳ〕

上記実験〔Ⅲ〕の肝抽出酵素液をアセトン沈澱法⁴⁾によ

り酵素液を精製して実験〔Ⅲ〕同様の測定を行つた。なおアセトン洗滌を1~3回とし、その作用を検した。結果を第5表に示す。

これによれば本酵素液はL-アスコルビン酸添加によりその尿素生成作用が僅かながら強められる。

実験〔Ⅴ〕

白鼠肝抽出酵素液をアセトン法により精製しMn⁺⁺を添加³⁾⁵⁾して実験〔Ⅳ〕同様に測定した。その結果を第6表に示す。

これによればMn⁺⁺酵素液もL-アスコルビン酸添加により実験〔Ⅳ〕同様その尿素生成作用は強められ、またアセトン沈澱を行つてMn⁺⁺を加えればその作用を強めると認められる。

第4表 Influence of V.C, on the activity of Arginase extracted from Rat liver

Experiments No.	Arginine + Arginase		Arginine + Arginase + 0.03mg V.C		Arginine + Arginase + 0.06mg V.C		Arginine + Arginase + 0.09mg V.C	
	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg
1	0	4.00	0	4.46	0	4.54	0	4.64
2	0.02	3.68	0	3.76	0	3.78	0	3.90
3	0.02	3.64	0	3.60	0	3.86	0	3.92
Average	0.03	3.77	0	3.94	0	4.06	0	4.15

第 5 表 Influence of V.C on the activity of Rat liver Arginase purified by Acetone

Washing times with Acetone	Argi- nase	Arginine + Arginase		Arginine + Arginase + 0.03mgV.C		Arginine + Arginase + 0.06mgV.C		Arginine + Arginase + 0.09mgV.C	
	N mg ml	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg
1	0.59	0	3.40	0	3.46	0	3.50	0	3.50
2	0.91	0	3.86	0	3.84	0	3.90	0	3.98
3	1.03	0	4.24	0	4.34	0	4.34	0	4.36
Average	0.84	0	3.83	0	3.88	0	3.91	0	3.95

第 6 表 Influence of V.C on the activity of Rat liver Arginase in the presence of Mn⁺⁺

Experiments No.	Argi- nase	Mn ⁺⁺	Arginine + Arginase		Arginine + Arginase + 0.03mgV.C		Arginine + Arginase + 0.06mgV.C		Arginine + Arginase + 0.06mgV.C	
	N mg ml		Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg
1	0.82	+	0	3.84	0	4.36	0	4.04	0	4.18
		0	0	3.64	0	4.16	0	4.04	0	4.08
2	0.98	+	0	4.00	0	4.36	0	4.36	0	4.40
		0	0	3.70	0	4.20	0	4.20	0	4.30
3	1.39	+	0	4.26	0	4.38	0	4.42	0	4.54
		0	0	4.00	0	4.20	0	4.28	0	4.32
Average	1.06	+	0	4.03	0	4.37	0	4.27	0	4.37
		0	0	3.75	0	4.19	0	4.17	0	4.23

実 験〔VI〕

上記実験〔II〕同様なる肝組織の尿素生成作用の場合に Mn⁺⁺を添加してその作用を検した。その結果を第7表に示す。これによれば肝組織尿素生成作用は Mn⁺⁺添加によつて幾分強められ、従来の成績と一致する。

実 験〔VII〕

普通食を与えて飼育した成熟モルモットをクロロホルム麻酔死させその直後血液を流出させ、肝臓を剔出し、冷却後嚙碎し、実験〔I〕同様の方法でその生成尿素を測定した。その結果を第8表に示す。

これによればモルモット肝ホモジネートの尿素生成作用は L-アスコルビン酸添加によりその作用が促進されることを示す。

実 験〔VIII〕

モルモット肝よりアルギナーゼをアセトン沈澱法によつて精製した実験〔III〕同様の方法によりその尿素生成作用を測定した。結果を第9表に示す。

これによればモルモット肝の抽出アルギナーゼ液の尿素生成作用は L-アスコルビン酸添加によりやや促進されると認められる。

第 7 表 Influence of V.C on the activity of Urea formation in Rat liver Homogenate with and without Mn⁺⁺

Experi- ments No.	Ani- mal No.	Body wei- ght	Liver wei- ght	Mn ⁺⁺	per 10g tissue								
					N mg	Tissue + H ₂ O		Tissue + V.C		Tissue + NH ₄ Cl		Tissue + NH ₄ Cl + V.C	
						Ammo- nia N mg	Urea N mg	Ammo- nia N mg	Urea N mg	Ammo- nia N mg	Urea N mg	Ammo- nia N mg	Urea N mg
1	1	250	9.8	+ 0	311	0.79 1.17	1.05 1.00	0.90 1.07	1.45 1.15	1.98 1.95	1.26 1.09	1.99 1.95	1.40 1.36
2	2	200	8.7	+ 0	296	0.90 1.22	1.40 1.06	0.93 1.06	1.65 1.47	1.65 1.96	1.41 1.15	1.82 1.88	1.47 1.40
3	3	280	13.5	+ 0	223	0.82 1.06	2.00 1.87	0.84 1.08	1.92 1.84	1.59 1.56	1.84 1.70	1.71 1.56	2.26 1.98
Average				+ 0	227	0.84 1.15	1.48 1.31	0.89 1.07	1.67 1.49	1.74 1.82	1.50 1.31	1.84 1.80	1.71 1.58

第8表 Influence of V.C on the activity of Urea formation in Guinea pig liver Homogenate

Experiments No.	Body weight g	Liver weight g	per 10g tissue								
			N mg	Tissue + H ₂ O		Tissue + V.C		Tissue + NH ₄ Cl		Tissue + NH ₄ Cl + V.C	
				Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg
1	422	21.9	290	1.20	1.25	1.15	2.70	1.80	2.40	1.90	2.50
2	435	17.4	383	1.23	2.25	1.11	2.75	1.63	2.48	1.86	2.60
3	458	16.9	280	1.50	2.20	1.30	3.00	1.90	2.40	2.00	2.50
Average			318	1.31	1.90	1.19	2.82	1.78	2.43	1.92	2.53

第9表 Influence of V.C on the activity of Guinea pig liver Arginase

Experiments No.	Arginase N mg ml	Arginine + Arginase		Arginine + Arginase + 0.03mg V.C		Arginine + Arginase + 0.06mg V.C		Arginine + Arginase + 0.09mg V.C	
		Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg	Ammonia N mg	Urea N mg
1	2.70	0	4.52	0	4.56	0	4.66	0	4.66
2	2.40	0	4.52	0	4.62	0	4.62	0	4.62
3	2.94	0	4.61	0	4.70	0	4.72	0	4.74
4	2.94	0	4.52	0	4.54	0	4.66	0	4.68
5	2.90	0	4.50	0	4.62	0	4.66	0	4.68
Average	2.78	0	4.53	0	4.61	0	4.66	0	4.68

考 察

1) 白鼠肝組織による尿素生成の際、V.Cを添加した場合と、モルモット肝組織による同様な実験結果をくらべると後者の方がV.Cによる促進作用は著明であるが、これは肝自体のV.C含有量は白鼠の方が高値⁸⁾¹²⁾であるから、実験の際の添加V.Cの効果が、不鮮明になるのは当然ではないだろうか。同様に説明づけられるのは実験〔I〕であつて、その尿素生成作用のV.C添加による促進の程度はその肝中V.C含量の多い標準食群が最低でV.C含有量の最低なる無蛋白食群が最高となつている点である。

2) 肝組織およびその抽出液に Mn^{++} を添加すればその尿素生成作用を促進しているが、これは友田氏¹¹⁾がアルギナーゼの Mn^{++} に賦活性を確めているのに一致している。

3) 白鼠肝組織の尿素生成作用はその飼料中の蛋白含量の多少に平行することは F. N. Gurd¹⁾ が白鼠を用いて蛋白欠乏食飼育により、肝の貯蔵蛋白が失われるにつれて、その肝中アルギナーゼの減少することを認めていること、又 L. L. Miller²⁾ は無蛋白食白鼠肝中アルギナーゼの減少することを認めていることに一致している。

要 約

1) 白鼠肝切片粥は試験管内で尿素生成作用を現わ

し、その作用は飼料中の蛋白質の多いもの程強い。

2) モルモット肝切片粥も尿素生成作用を認めることができる。

3) 白鼠及びモルモット肝および肝抽出液の尿素生成作用は、L-アスコルビン酸添加によつて若干促進されるようである。

終りに臨み御指導御校閲を賜りました東大教授神立博士、群大教授山添博士、労研所長勝木博士、労研生化学第2研究室主任高木博士に、謹んで感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) F. N. Gurd: Nutr. Rev. **3**, 78 (1950)
- 2) L. L. Miller: J. Biol. Chem. **186**, 253 (1950)
- 3) M. S. Mohamed., D. M. Greenberg: Arch Bioch. **166**, 25 (1946)
- 4) 児玉桂三: 酵素研究法 I 河出書房 p. 274 (1950)
- 5) 赤堀四郎: 酵素研究法 II 朝倉書店 p. 204 (1950)
- 6) 広部りう: 労働科学 **34**, 6, 431 (1958)
- 7) " : " **34**, 7 (1958)
- 8) " : 栄養と食糧 **9**, 3, 55 (1956)
- 9) " : " **9**, 6, 50 (1956)
- 10) H. B. Hawk et al.: Practical physiological chemistry 13th Ed. 883, 889 (1954)
- 11) 友田昇一: J. Biochem., **32**, 307 (1940)
- 12) 広部りう: 労働科学 (投稿中)

(労働科学研究所労働化学第二研究室)