海棲動物種における Urease および Glyoxylate aminotransferase の細胞内分布

九州歯科大学保存学第1講座 (主任: 長野三代太教授)

森 敏 夫・長 野 三代太

九州歯科大学学生化学講座 (主任: 野口知雄教授)

藤 原 智 子・高 田 義 一・野 口 知 雄

昭和57年4月17日受付

Urease and Glyoxylate Aminotransferase in Marine Animals

Toshio Mori and Miyota Nagano

Department of Operative Dentistry (Chief : Prof. Miyota Nagano)

Satoko Fujiwara, Yoshikazu Takada and Tomoo Noguchi

Department of Biochemistry (Chief : Prof. Tomoo Noguchi)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

The end product of purine metabolism varies from species to species. In human and other primates and birds, the end product is uric acid because they do not possess uricase (EC 1.7.3.3) activity. In mammals other than primates and some reptiles, the end product is allantoin; uricase is responsible for the hydrolysis of uric acid to allantoin. In most fishes and amphibia, the allantoin formed is further degraded to urea and glyoxylate via allantoinic acid by allantoinase (EC 3.5.2.5) and allantoinicase (EC 3.5.3.4). In some marine invertebrates and crustaceans, the urea formed is hydrolyzed to NH_3 and CO_2 by urease (EC 3.5.1.5). In marine fish and crustacean liver, degradative enzymes of purines to urate are located only in the cytosol and degradative enzymes of urate to urea and glyoxylate only in the peroxisomes (Noguchi, T., Takada, Y., and Fujiwara, S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 5272—5275). Because the degradation of purines is much less complete in higher animals, it is apparent that certain peroxisomal enzymes have been lost during animal evolution, e.g. uricase, allantoinase and allantoinicase.

In the present study, the subcellular distribution of the two enzymes, involved in further metabolism of urea and glyoxylate, was examined by centrifugation in a sucrose density gradient with marine animal species.

Urease was located only in the cytosol of crustacean and mollusc liver; the activity was not detected in fish liver.

In fish, crustaceous and mollusc liver, the conversion of glyoxylate to glycine was suggested to be mainly catalysed by alanine : glyoxylate aminotransferase (EC 2.6.1.44). Hepatic alanine : glyoxylate aminotransferase was located both in the mitochondrial matrix and in the cytosol in each species.

These findings suggest that peroxisomal urea is transported to the cytosol followed by its degradation to NH_3 for the excretion of purine nitrogens and peroxisomal glyoxylate to the cytosol or mitochondria followed by its conversion to glycine to bring a purine cycle to completion or for the reutilization of purine carbons.

緒 言

プリン塩基の分解において、尿酸までの経路は全動物種に共通して存在するのに対し、尿酸以降の分解は動物種により異なる^{1,2)}。ヒトおよびその他の霊長類では尿酸の分解酵素が欠損しているため、プリン分解の最終産物は尿酸である。霊長類以外の哺乳動物や爬虫類の一部では尿酸は Uricase (Urate oxidoreductase, EC 1.7.3.3) によってアラントインに分解されるが、アラントインの分解酵素が欠落しているため、プリン分解の最終産物はアラントインである。魚類の大部分や両生類では、アラントインは Allantoinase (Allantoin amidohydrolase, EC 3.5.2.5) および Allantoicase (Allantoate amidinohydrolase, EC 3.5.3.4) によってアラントイン酸を経由して尿素とグリオキシル酸にまで分解される。さらに海棲の無脊椎動物の一部や海棲甲殻類では尿素はさらに Urease (Urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) により炭酸ガスとアンモニアにまで分解される。このようにプリンの分解は高等な動物ほど不完全である。

最近我々は海棲の魚類および甲殻類の肝臓において、全動物種に共通なプリン塩基から尿酸までの分解が細胞質 (Cytosol) で進行するのに対し、尿酸から尿素およびグリオキシル酸までの分解がペルオキシゾームで進行することを明らかにし、動物進化の過程でペルオキシゾームの酵素 (Uricase, Allantoinase および Allantoicase) が選択的に脱落したことを示唆した³⁾。そこで今回はプリン塩基の完全分解系を持つ動物種の肝臓を用いて、尿素およびグリオキシル酸の代謝に関与する二種の酵素 (Urease と Alanine : glyoxylate aminotransferase, EC 2.6.1.44) の細胞内分布を明らかにした。

実験材料と方法

I. 動物

海棲魚類としてサバ (*Pneumatophorus Japonicus*)、イワシ (*Sardinops melanosticta*)、メジナ (*Girella punctata*) およびメバル (*Sebastes inermis*)、海棲甲殻類としてキノコエビ (*Metapenaeus monoceros*)、シャコ (*Oratosquilla oratoria*)、海棲軟体動物として赤貝 (*Scapharca broughtonii*)、ハマグリ (*Tapes philippinarum*) を用いた。

II. 方法

A. 酵素活性の測定

Urease⁴⁾, Alanine : glyoxylate aminotransferase⁵⁾, Allantoinase⁶⁾, Allantoicase⁶⁾, Uricase⁶⁾, Caltalase (EC 1.11.1.6)⁷⁾, Cytochrome c oxidase (EC 1.9.3.1)⁸⁾, Glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.3)⁹⁾, Acid phosphatase (EC 3.1.3.2)¹⁰⁾, Glucose 6-phosphatase (EC 3.1.3.9)¹¹⁾, Monoamine oxidase (EC 1.4.3.4)¹²⁾, Kynurenine 3-hydroxylase (EC 1.14.13.9)¹³⁾ の活性測定は既法に従った。酵素活性は 37°C で 1 分間に 1 μmol の基質の減少もしくは生成物の生成を触媒する酵素量を 1 単位 (unit) として示した。

B. 肝臓抽出液の調製

すべての操作は 0—4°C で行った。肝臓 (または肝脾腺) は湿重量の 4 倍量の 5mM リン酸カリ緩衝液 (pH 7.5) でホモジナイズした。つづいてホモジネイトを 10KHz で 1 分間、超音波処理したのち、105000 $\times g$ で 60 分間遠心し、その上清を肝臓抽出液とした。

C. 肝臓ホモジネイトの蔗糖密度勾配遠心による細胞分画法

すべての操作は 0—4°C で行った。既法³⁾に従い肝臓ホモジネイトを調製したのち、これを 250 $\times g$ で 5 分間遠心し、核および細胞の破片を除去した。つづいて 0.5g の肝臓に相当する上清を 3 ml の 57% 蔗糖液をクッションとした 33ml の直線状の蔗糖密度勾配 (34—54%, w/v) に重層し、vertical rotar (RPV 50T-160) を用

いて Hitachi 55P-72 型超遠心機で $132,400 \times g$ で 80 分間遠心した。遠心後、遠心管の底から 2.5ml ずつ分画した。

結 果

Fig. 1 にハマグリ肝臓ホモジネイトの蔗糖密度勾配遠心法による細胞分画像を示す。Urease 活性は可溶

Fig. 1 Subcellular distribution of urease in the liver of short-necked clam. The postnuclear supernatant was prepared from short-necked clam liver (0.8g) and subjected to sucrose density gradient centrifugation as described in the text. After the centrifugation; fractions of 2 ml were collected. Urease (○), cytochrome c oxidase (●), catalase (△) and urate oxidase (▲).

性の上清画分にはのみ回収され顆粒画分(沈降画分)には検出されなかった。ミトコンドリアの標識酵素として Cytochrome c oxidase を、ペルオキシゾームの標識酵素として Catalase と Uricase を用いた。ミトコンドリアは密度約 1.18g/ml のところに、またペルオキシゾームは密度約 1.25g/ml のところに沈降した。リソゾームの局在酵素である Acid phosphatase は密度約 1.20g/ml のところに、ミクロゾームの局在酵素である Glucose 6-phosphatase は密度約 1.05g/ml のところに沈降した。これらの結果は、ハマグリ肝臓では Urease は細胞質に局在することを示している。他の軟体動物(赤貝肝臓)および他の甲殻類(エビ肝臓およびシャコ肝臓)についても同様の実験を行い、いずれも Urease が細胞質に局在することを明らかにした。海棲魚類(サバ、イワシ、メジナおよびメバル)肝臓抽出液には Urease 活性は検出されなかった。

前述の海棲魚類、甲殻類および軟体動物肝臓抽出

液を用いて、グリオキシル酸(5mM)を amino acceptor として各種 L-アミノ酸(40mM)、即ちアラニン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、グルタミン、アスパラギン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンに対するアミノ基転移活性を測定した。その結果、いずれの種においてもアラニンに対して特に高い活性が認められた。グルタミン酸に対する活性はアラニンの場合の約 1/10 であり、他のアミノ酸にはほとんど活性を示さなかった(アラニンに対する活性の 1/10 以下)。これらの結果から、プリンをグリオキシル酸と尿素に分解する能力をもつ動物種では、プリンの炭素骨格の一部の再利用のための初発反応であるグリオキシル酸からグリシンへの変換は、主に Alanine : glyoxylate aminotransferase によって触媒されるものと考えられる。

Fig. 2 にサバ肝臓ホモジネイトの蔗糖密度勾配遠心法による細胞分画像を示す。ミトコンドリアおよびペルオキシゾームの標識酵素としてそれぞれ Glutamate dehydrogenase および Catalase を測定した。Alanine : glyoxylate aminotransferase 活性の大部分はミトコンドリア画分に、残りは可溶性画分に回収されたが、ペルオキシゾーム画分には検出されなかった。また、ミクロゾームの局在酵素である Glucose 6-phosphatase および

Fig. 2 Subcellular distribution of alanine : glyoxylate aminotransferase in mackerel liver. The postnuclear supernatant was prepared from mackerel liver (0.8g) and subjected to sucrose density gradient centrifugation as described in the text. After the centrifugation, fractions of 2 ml were collected. Alanine : glyoxylate aminotransferase (AGT, ●), glutamate dehydrogenase (GDH, △), catalase (○).

リソゾームの Acid phosphatase の分布は Alanine : glyoxylate aminotransferase の分布とは異なっていた。ミトコンドリアの Matrix の標識酵素である Glutamate dehydrogenase に対する Alanine : glyoxylate aminotransferase の活性比はミトコンドリア画分よりも可溶性画分の方がかなり高かった。サバ肝臓のミトコンドリア画分 (Fig. 2 で 7, 8 および 9 の画分) を集め、ジグトニン法^{14, 15)} によってミトコンドリアをさらに分画した。Outer membrane の標識酵素として Monoamine oxidase および Kynurenine 3-hydroxylase を用いた。Inner membrane および Matrix の標識酵素としてそれぞれ Cytochrome c oxidase および Glutamate dehydrogenase を測定した。その結果, Alanine : glyoxylate aminotransferase 活性の多くが Matrix 画分に回収された。これらの標識酵素の分布は Okamoto, H.¹³⁾ および Shneitmann, C.¹⁶⁾ らの研究報告と一致している。以上の結果から, Alanine : glyoxylate aminotransferase はミトコンドリアの Matrix に局在することが明らかとなった。他の海棲の魚類 (イワシ, メジナ, メバル), 甲殻類 (エビ, シャコ) および軟体動物 (アサリ, ハマグリ) の肝臓あるいは肝臓で同じ実験を行ったところ, サバ肝臓と同様にいずれも Alanine : glyoxylate aminotransferase はミトコンドリアの Matrix および細胞質の両画分に存在することが明らかとなった。

考 察

Fig. 3 に示すように, プリン塩基をより完全に分解する動物種の肝臓において, プリン塩基は細胞質 (Cytosol) で尿酸にまで分解し, つづいて尿酸はペルオキシゾームに移行し, アラントイン, アラントイン酸をへて尿素とグリオキシル酸にまで分解される^{1, 2)}。さらに尿素は, 今回明らかにしたように細胞質の Urease によって炭酸ガスとアンモニアに分解され, プリンの窒素がアンモニアとして排出されるものと考えられる。一方, グリオキシル酸はおそらくは細胞質またはミトコンドリアに移行し Alanine : glyoxylate aminotransferase によりグリシンに変化し, プリンの炭素骨格の一部が蛋白質, ポルフィリン, 糖, クレアチンなどの合成に再利用されるものと考えられる (Fig. 3)。

以上のことから, 海棲の魚類, 甲殻類および軟体動物の肝臓にはプリン塩基の窒素の排出とプリン塩基の炭素骨格の一部の再利用という両機能を演じているものと考えられる。他方, Alanine : glyoxylate aminotransferase

Fig. 3 Schematic representation of the proposed intracellular location of the enzymes involved in routes for the excretion of purine nitrogen and for the reutilization of purine carbon. 1, Adenase; 2, guanase; 3, xanthine oxidase; 4, urate oxidase; 5, allantoinase; 6, allantoicase; 7, urease; 8, alanine : glyoxylate aminotransferase.

ase は哺乳動物を含めほとんどの動物種の肝臓に分布しており, Alanine : glyoxylate aminotransferase 1 と Alanine : glyoxylate aminotransferase 2 の二種のアイソザイムが存在している^{5, 17-20)}。Alanine : glyoxylate aminotransferase 1 は動物種によって細胞内分布が異なる。例えば, 霊長類のヒト, サルおよび草食動物のウサギ, モルモットではペルオキシゾームに, 肉食動物のイヌ, ネコではミトコンドリアに局在する。雑食性のラット, マウスではミトコンドリアとペルオキシゾームの両オルガネラに存在し, 偶蹄類の牛, 豚および魚類には欠損している。一方, Alanine : glyoxylate aminotransferase 2 は上記動物種のうちヒト, サル, ウサギ, モルモット以外の種の肝臓に存在し, いずれもミトコンドリアに局在している。Alanine : glyoxylate aminotransferase 1 はいずれの種のものも分子量 40000 の 2 個の同一サブユニットからなり, 免疫学的に類似性を示す。Alanine : glyoxylate aminotransferase 1 と Alanine : glyoxylate aminotransferase 2 は免疫学的類似性をもたない。海棲の魚類, 甲殻類および軟体動物の Alanine : glyoxylate aminotransferase の細胞内分布並びに酵素学的, 物理学的および免疫学的性質を哺乳動物や鳥類, その他の動物種の Alanine : glyoxylate aminotransferase アイソザイムと比較することは動物進化を考える上で興味深く, 今後の研究課題である。

結 論

海棲の動物の肝臓を用いて、尿素およびグリオキシル酸を代謝する2種の酵素の細胞内分布を明らかにした。

Urease は細胞礎質 (Cytosol) に局在していたが、本酵素は魚類の肝臓に検出されなかった。魚類、甲殻類、軟体動物の肝臓のホモジネイトはグリオキシル酸をアミノ基受容体とすると、アラニンに対して高い活性を示し、その他のアミノ酸にはほとんど作用しなかった。これらの種において肝臓の Alanine : glyoxylate aminotran-

sferase はいずれもミトコンドリアの Matrix と細胞礎質に分布していた。

以上からペルオキシゾームで産生される尿素はプリンの窒素を排出するために、細胞礎質で Urease によってアンモニアに分解され、ペルオキシゾームで産生されるグリオキシル酸はプリンの炭素の一部を再利用するために細胞礎質あるいはミトコンドリアの Matrix で Alanine : glyoxylate aminotransferase によりグリシンに変化するものと思われる。

引 用 文 献

- 1) Florkin, M. : Biosynthesis of the purine nucleus. In : *A history of biochemistry* (ed. by Florkin, M. and Stotz, E.H.). Elsevier, Amsterdam, 1978, 325—355.
- 2) White, A., Handler, P. and Smith, E.L. : *Principles of Biochemistry*. 5th ed., McGraw-Hill Book company, New York and Tronto, 1973, 558—583.
- 3) Noguchi, T., Takada, Y. and Fujiwara, S. : Degradation of uric acid to urea and glyoxylate in peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 254 : 5272—5275, 1979.
- 4) Sumner, J.B. : Urease. In : *Methods Enzymol.* 2 : 378—379, 1955.
- 5) Noguchi, T., Okuno, E., Takada, Y., Minatogawa, Y., Okai, K. and Kido, R. : Characteristics of hepatic alanine : glyoxylate aminotransferase in different mammalian species. *Biochem. J.* 169 : 113—122, 1978.
- 6) Gregory, R. B. : Synthesis and total excretion of waste nitrogen by fish of the periophthalmus (mudskipper) and scartelaos families. *Comp. Biochem. Physiol.* 57A : 33—36, 1977.
- 7) Sinha, A.K. : Colorimetric assay of catalase. *Anal. Biochem.* 47 : 389—394, 1972.
- 8) McGroarty, E., Hsieh, B., Wied, D.M., Gee, R. and Tolbert, N.E. : Alpha hydroxy acid oxidation by peroxisomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 161 : 194—210, 1974.
- 9) Beaufay, H., Bendall, B.S., Baudhuin, P. and de Duve, C. : Tissue fractionation studies, 12. intracellular distribution of some dehydrogenase, alkaline deoxyribonuclease and iron in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 73 : 623—628, 1959.
- 10) Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. and Grassl, M. : Enzymes as Biochemical Reagents. In : *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. by Bergmeyer, H.U.). Academic Press, New York, 1974, 425—522.
- 11) Bagniski, E.S., Foa, P.P. and Zak, B. : Glucose-6-phosphatase. In : *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. by Bergmeyer, H.U.). Academic Press, New York, 1974, 876—880.
- 12) Tabor, C.W., Tabor, H. and Rosenthal, S.M. : Amine oxidase. *Methods Enzymol.* 2 : 390—396, 1955.
- 13) Okamoto, H., Yamamoto, S., Nozaki, M. and Hayaishi, O. : On the submitochondrial localization of L-kynurenine-3-hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26 : 309—314, 1967.
- 14) Greenawalt, J.W. : The isolation of outer and inner mitochondrial membranes. *Methods Enzymol.* 31 : 310—323, 1974.
- 15) Noguchi, T., Takada, Y. and Oota, Y. : Intraperoxisomal and intramitochondrial localization

- and assay of pyruvate (glyoxylate) aminotransferase from rat liver. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **360** : 919—927, 1979.
- 16) **Schneitman, C., Erwin, V.G. and Greenawalt, J.W.** : Intracellular distribution of some dehydrogenases, alkaline deoxyribonuclease and iron in rat-liver tissue. *J. Cell. Biol.* **32** : 719—735, 1967.
- 17) **Noguchi, T., Minatogawa, Y., Takada, Y., Okuno, E. and Kido, R.** : Subcellular distribution of pyruvate (glyoxylate) aminotransferase in rat liver. *Biochem. J.* **170** : 173—175, 1978.
- 18) **Noguchi, T. and Takada, Y.** : Purification and properties of peroxisomal pyruvate (glyoxylate) aminotransferase from rat liver. *Biochem. J.* **175** : 765—768, 1978.
- 19) **Noguchi, T. and Takada, Y.** : Peroxisomal localization of serine : pyruvate aminotransferase in human liver. *J. Biol. Chem.* **253** : 7598—7600, 1978.
- 20) **Noguchi, T. and Takada, Y.** : Peroxisomal localization of alanine : glyoxylate aminotransferase in human liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **196** : 645—647, 1979.
- 21) **Takada, Y. and Noguchi, T.** : Subcellular distribution and physical and immunological properties of hepatic alanine : glyoxylate aminotransferase in different mammalian species. *Comp. Biochem. Physiol.* 1982. (In press)