反芻動物による尿素利用の機作に関する研究 (第 4 報)*

ウレアーゼ作用に於ける中間物としてのカルバミン酸アンモニウムについて

副島正美, 菊池栄一, 菅原 潔, 志村憲助 (東北大学農学部生物化学研究室)

昭和 33 年 5 月 24 日 受 理

緒

論

前報に於て反芻動物に経口的に投与した尿素はウレアーゼによって水解され、生ずるアンモニウムイオンが反芻胃に於て利用されることを明らかにした⁽¹⁻³⁾。しかし、ウレアーゼ作用に於ける中間生成物であると推定されるカルバミン酸アンモニウムの有無に関しては異論があり^(4,5)、また時に現われる尿素飼料の反芻動物に対する毒性がカルバミン酸アンモニウムに帰因するとする説⁽⁶⁾に対しても充分な検討がなされていない現状である。

古く Sumner⁽⁴⁾ 等はウレアーゼの作用機作として次式の如き反応過程を推定した。

この際生成するカルバミン酸アンモニウムについては中性及び酸性の水溶液中では極めて不安定であるが、強アルカリ性では完全に安定であること及びその安定性が共存する物質の影響によって変動すること等が報告されているが⁽⁴⁾、さらに最近 Lipmann 等は中性でカルバミン酸塩が相当に安定であるという結果を報告している^(7,8)。

本報では上述の如き尿素飼料利用に伴う二、三の疑点を明らかにする為に、ウレアーゼ作用に於けるカルバミン酸アンモニウムの存在について検討した。

従来行われたカルバミン酸アンモニウムの定量は、この化合物が酸性で不安定であり、アルカリ性で安定である性質のみを利用する化学的方法によって専ら行われてきたのであるが、この方法は本研究の目的に対しては不充分であるので、尿素の加水分解に伴って起る反応系の容積の収縮現象を利用したジラトメトリー及び Warburg 検圧計によって測定するマノメトリーを併用した。その結果カルバミン酸アンモニウムの集積は全く認められなかった。またカルバミン酸塩とエステルとの性質を赤外線吸収スペクトル及び pK 値から比較説明し、前者の不安定性の原因について考察を行った。

実 験 の 部

A) ジラトメトリーによるウレアーゼ作用の検討

1. 実験方法

第 1 図 ジラトメーター設計図

a) ジラトメーターの設計：ジラトメーター（膨脹計）は反応系の容積収縮量より反応の進行状況を知る方法であって、従来屢々化学反応の動力学的研究に利用され、又プロテアーゼその他の酵素活性度測定法としても用いられた⁽⁹⁾。ウレアーゼもプロテアーゼと同一原理で使用し得ることが古く Saya⁽¹⁰⁾ によって報告されているが、我々は本研究の目的に便利ように新たに第 1 図の装置を設計した。材料は膨脹係数の出来るだけ小さなものがよいのでハリオガラスを採用した。装置の主要部は次の如くである。

すなわち、すり合せの蓋 F を持つ円筒部 A と下部に球 C を附した目盛りつき毛細管 D をガラス管 B で図の如く連結し、B と A との間にコック G を挿入した。また毛細管 D の上端 E を液溜めとし、円筒部 A と毛細管 D とをガラス棒 H で固着した。G は水中で操作する必要上、摺りに注意し、接着剤は生ゴムを約 10 倍量のラノリンに溶解し（約 1 週間 100° に放置）適量の白色ワセリンと混合して使用した。

b) ジラトメーターによるウレアーゼ作用の測定方法：測定に先立ち、精製した水銀及びカセットメーターを用いて B-C-D の内容（約 8 ml）、毛細管 D の半径及び目盛りの誤差を精密に測定して置く。また恒温槽は ±0.02° 以内に保持する必要がある。

* Studies on the Mechanism of Urea Utilization by Ruminant. Part IV. On the Non Existence of Ammonium Carbamate in Urea Hydrolysis by Urease.

By Masami SOEJIMA, Ejichi KIKUCHI, Kiyoshi SUGAWARA and Kensuke SHIMURA (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University)

適当な金属支持台によりジラトメーターを恒温槽中に固定し, Eにゴム管を附しAに清澄な基質溶液を入れる(8~12 ml). 別に透明な酵素液を恒温槽中に約 15 分間放置し温度が平衡に達した後, 反応開始時にその 0.1~1 ml を速かに基質に添加しよく攪拌した後, 直ちにコックGを開いて泡の入らぬ様Eの気圧で調節しつつC中に導入し液面を吸い上げGを閉じる(以上の操作を3分以内で行うことが望ましい). 尿素の分解が進行するにつれて容積の収縮が起り, D中の液面が低下するから一定時間毎に目盛りによりその値を記録する. 反応の途中で沈澱又は気泡を生ずるものを使用することは危険である.

測定後は内液を去り, 接着剤を拭き取った後, 温湯で洗いクローム硫酸混液を満たして水浴上に 30 乃至 60 分加温し, 更に水, N/100 硫酸, 水, アセトンの順にアスピレーターを利用して流し洗し, 60° 以下で乾燥する. 毛細管Dの内面は特によく洗滌せねばならない.

第2図 尿素分解量と容積収縮量との関係

▲—▲ 尿素分解量 ●—● 容積収縮量

第3図 酵素濃度の影響

c) 予備実験方法: 酵素標品及び基質の調製は第1報と同様な方法により刀豆及び牛第4胃粘膜より, 酵素標品を精製した. 基質溶液は精製尿素 30 g を M/2 磷酸緩衝液 (pH 7.1) に溶解し 1 l としたものを用いた.

2. 実験結果

a) 予備実験結果: 前述の方法でウレアーゼ作用を測定し, 尿素の分解量と容積収縮量との関係を検討した. その結果を第2図に示す. 図中縦軸は容積収縮量 (μl) であり NH_3 -μM はウレアーゼ作用により生成したアンモニアの濃度 (μM) である. 反応時間は酵素添加後の時間 (分) である. 尿素分解量は Conway 法⁽¹⁾ によって定量した. 反応停止液にはトリクロール酢酸液を用いた(終濃度は 5%). この実験条件下では酵素に対して基質濃度が著しく過剰であるために反応初期に於て零次反応となることが予想されたが, 実際に両者とも直線となり, 従って尿素の分解量と容積収縮量との間に完全な平行関係が成立することを認め

第4図 最適 pH

第 1 表 ウレアーゼ作用に於ける尿素分解量 1 モル 当りの容積収縮量

A] 刀豆ウレアーゼ*			
反応時間 (分)	容積収縮量 (μl)	尿素分解量 (mM)	容 積 / 尿 素 収 縮 量 / 分 解 量 (ml/M)
0~3.5	4.44	0.230	19.3
3.5~11.0	2.98	0.133	22.4
0~11.0	7.42	0.363	20.4
B] 刀豆ウレアーゼ**			
5.0~20.0	18.62	0.826	22.6
20.0~70.0	40.09	1.896	21.2
5.0~70.0	58.71	2.722	21.6
C] 牛胃ウレアーゼ***			
3.0~33.0	18.45	0.951	19.4
33.0~81.0	8.56	0.409	20.9
3.0~81.0	27.01	1.373	19.7

* 0.5% 酵素液 1ml, M/2 尿素 (M/2 磷酸緩衝液 pH 7.1) 10ml
毛細管径 0.135 mm, $37 \pm 0.02^\circ$

** 2.5% 酵素液 1ml, 毛細管径 0.517 mm, 他は A] と同じ

*** 3% 酵素液 1ml, 他は B] と同じ

た。なお本法によるウレアーゼ活性度の定量誤差は $\pm 3\%$ である。

さらにジラトメトリーがウレアーゼ作用の測定に使用し得ることを検定する目的で、酵素濃度の影響 (第 3 図), 至適 pH (第 4 図) の測定を行い Conway 法の結果とよく一致することを確認した。

b) ウレアーゼ作用により尿素 1 モルが分解した際の系の容積収縮量の測定: 尿素分解量と容積収縮量との量的関係を明らかにする目的で毛細管 C の半径 0.517 mm のジラトメーターにより比較的長時間 (1~2 時間) 酵素を作用させた場合と, 0.135 mm のジラトメーターを用いて比較的短時間 (10~30 分) 反応させた場合とについて実験を行った。その結果は第 1 表の如くで、尿素分解量 1 モルに対し 19.5~22.6 ml の値を得た。反応時間の長短及び酵素材料の差による結果のふれは誤差の範囲内であると認められた。

c) 有機酸アミドの加水分解時に於ける見掛けのモル容積の変化の測定: 尿素の水解により 1 モル当り 19.5~22.6 ml の容積変化が実験的に観察されたが、本研究の目的には $-\text{CO}-\text{NH}-$ 結合の水解反応に伴う系の容積変化の一般的な値を知っておくことが必要とされるので、二、三の有機酸アミドについてこれを測定した。

水溶液中に於ける見掛けのモル容積の算出は次の如く行った。

供試品を十分に乾燥した後正確に秤量し、一定量の水に溶解して約 0.5 モル溶液とした。これを内容 5 ml の Ostwald 型ピクノメーターに採り、ジラトメーターの場合と同一の恒温槽中に固定し、常法の如く比重を測定してこれより水溶液中に於ける溶質の占める見掛けのモル容積 φ_V を次式に従い算出した。

$$\varphi_V = \frac{V - n_1 V_1}{n_2} \quad (\text{温度及び大気圧は一定})$$

但し V は溶液全体の容積, V_1 は溶媒の見掛けのモル容積, n_2 は溶質のモル数, n_1 は溶媒のモル数である。

第 2 表 有機酸アミド等の見掛けのモル容積

試 料	見掛けのモル容積 (φ_V , ml/M)	差 (ml/M)	ΔV (ml/M)
H_2NCONH_2	43.5		
$\text{H}_2\text{NCO}_2\text{NH}_4$	?	?	?
H_4NHCO_3	47.1		
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	58.2	14.7	21.5
HCONH_2	38.7		
HCO_2NH_4	44.9	6.2	11.9
CH_3CONH_2	55.5		
$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$	62.6	7.1	11.0
$\text{C}_2\text{H}_5\text{CONH}_2$	67.3		
$\text{C}_2\text{H}_5\text{CO}_2\text{NH}_4$	73.4	6.1	12.1

実験結果を第 2 表に示した。供試品は表の如き 10 種の酸誘導体を精製し、これを上記の如く純水に溶解した。ただしその中でカルバミン酸アンモニウムは後に述べるように極めて不安定で容易に炭酸アンモニウムに水解するものであるからその値は正確ではない。

また水溶液中で尿素の 2 個の $-\text{CO}-\text{NH}-$ 結合が切断して炭酸アンモニウムが生成した場合の全容積の収縮量は第 2 表中の尿素及び炭酸アンモニウムのモル容積と、 35.5° に於ける水のモル容積 18.1 ml とから、 $(18.1 \times 2) - (58.2 - 43.5) = 21.5 \text{ ml/M}$ と計算される。

第 2 表の ΔV 欄にこのようにして算出した値が示してある。尿素の 2 個の $-\text{CO}-\text{NH}-$ 結合のうち、1 個が切断してカルバミン酸アンモニウムが生成した場合の容積変化は、前述の如く後者の φ_V が不正確であるから計算は困難である。しかし蟻酸アミド及びプロピオン酸アミドでは加水分解により生成するそれぞれのアンモニウム塩の φ_V の値から、 $-\text{CO}-\text{NH}_2$ の水解に伴う容積変化の計算は容易で、 $-\text{CO}-\text{NH}_2$ 1 モルに対し約 12.0 ml の値を与えることが出来る。第 1 表及び第 2 表の結果を総合すると、尿素水解の際に起る系の容積収縮量が反応時間の長短に関係なく 19.5~22.6 ml/M の範囲に存在することは、尿素はカルバミン酸アンモニウムを集積することなく直ちに炭酸アンモニウムに変化する事を暗示しているものと見做される。

B) Warburg マノメトリーによるウレアーゼ作用の検討

第5図 マノメトリーによるウレアーゼ作用の検討

○—○: Conway 法からの計算値
●—●: 測定値

1. 実験方法 Hahtanen 等がウレアーゼ作用の測定方法として提出した Warburg マノメトリー⁽¹²⁾ に準じカルバミン酸アンモニウムの集積の有無を検討した。装置は通常の Warburg 検圧計を用いた。酵素液は刀豆ウレアーゼを炭酸ガス飽和の 0.073 M 重曹溶液 (pH 7.0) に溶かし 0.02% としたものをを用い、また基質溶液は尿素を上記重曹溶液に溶解し、0.06% としたものをを用いた。反応に際しては主室に酵素液 2.3 ml, 側室に上記基質溶液 0.5 ml, 更に他の側室に反応停止剤として 9 N 硫酸 0.2 ml を入れ 37° で炭酸ガスを 10 分間通じ完全にガスを置換してから反応を開始し、炭酸ガス吸収量を測定した。この際同時に Conway 法により尿素分解量を定量し、系の炭酸ガス吸収量を計算によって求めた。

2. 実験結果 実験結果は第5図に示したように炭酸ガスの吸収量の測定値と Conway 法からの計算値とはよく一致している。ウレアーゼ反応の過程でもしもカルバミン酸アンモニウムが集積する場合には、(1) カルバミン酸と炭酸とのアンモニウムイオンに対する親和力について、前者が後者より強い場合には炭酸ガスの吸収は認められず、(2) 後者が前者より強い場合には炭酸

ガスの吸収が起るものと推定される。実際には両者の比較を厳密に行うことが不可能であるので上の結果から直

第6図 ウレアーゼ作用中カルバミン酸アンモニウムの検索

【I】 (a): 0.1 N 塩酸 (M/100)
(b): トリス緩衝液又は磷酸緩衝液 (M/100)

【II】 0.1 N 苛性ソーダ

第7図 カルバミン酸塩及びエステルの安定性

ちに遊離のカルバミン酸の集積を否定することは出来ないが、考察で論ずる様に (2) の可能性は非常に小さいのである。

C) Conway の微量拡散分析装置で行ったウレアーゼ作用の検討

カルバミン酸塩が酸性で速かに分解し、強アルカリ性で全く安定である性質を利用してウレアーゼ作用の中間物としてのカルバミン酸塩の存否をさらに検討した。すなわち2個の Conway の外皿にそれぞれ一定時間ウレアーゼを反応させた被検液を採り、一方には直ちに 2 N 塩酸を同量加えて 5 分後に強アルカリ性とし、他方には直ちに強アルカリを過剰に加えて、各々のアンモニヤを定量した。その結果は第6図に示した如くで重炭酸、磷酸及びトリス緩衝液の何れを用いた場合にも、酸処理によるアンモニヤ生成量の増加は認められなかった。すなわちカルバミン酸アンモニウムの集積はないと考えられる。

D) カルバミン酸塩及びエステルの安定性について

カルバミン酸アンモニウム、カルバ

第 8 図 赤外線吸収スペクトル

ミン酸カリ及びカルバミン酸エチルエステルを精製し、1 N 塩酸、M/10 燐酸緩衝液 (pH 7.0)、M/10 トリス緩衝液及び 1 N 苛性ソーダ中に夫々 10 μ M/ml 溶解し 35.5° に放置してその安定性を比較した。その結果は第 7 図の如くで、カルバミン酸塩は強酸性及び中性で直ちに分解しアルカリ性で安定である。一方カルバミン

酸エチルエステル (ウレタン) は何れの場合にも安定である。

E) カルバミン酸塩及びエステルの赤外部吸収スペクトル

カルバミン酸アンモニウム、カルバミン酸カリ及びカルバミン酸エチルエステルを精製し、それらの結晶の赤外部吸収スペクトルを測定した (臭化カリ-タブレット法)。

第 8 図のスペクトラムで最も著しい差は 3000 乃至 3500/cm の振動数に於ける吸収で、カルバミン酸エチルエステルは 3450/cm に極小が認められるのに対し、カルバミン酸カリウムは 2950/cm、カルバミン酸アンモニウムは 3100/cm に夫々極小が認められたことである。このことはカルバミン酸エチルエステルのアミノ基が典型的な $-\text{NH}_2$ 型であるのに対して、カルバミン酸塩のアミノ基が $-\text{NH}_3^+$ 型となっていることを示すもの⁽¹³⁾である。この結果は水溶液中に於ける安定性と直接的な関係をもつと考えられる。

考 察

ウレアーゼによって尿素が加水分解される際にカルバミン酸アンモニウムが集積する可能性については A)~C) の結果からほとんど否定され得たものと考えられる。また安定性の検討によって、カルバミン酸塩が中性乃至酸性で容易に水解され、エステルが同じ条件下で安定であることが認められたが、これは上の結果と同一の機作に基くものである。以下その機作について考察を加える。

まず、赤外部吸収スペクトルの判定の結果、エステルのアミノ基が $-\text{NH}_2$ 型であるのに対し、塩のそれが $-\text{NH}_3^+$ 型である事を認めた。すなわちカルバミン酸エステル又はアミド (尿素) の窒素原子の非共有電子対はカルボニル基の電子異性効果により N-C 間に向って惹かれているのに対し、カルバミン酸塩の場合は $-\text{C} \begin{smallmatrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}^- \end{smallmatrix} \longleftrightarrow -\text{C} \begin{smallmatrix} \text{O}^- \\ \parallel \\ \text{O} \end{smallmatrix}$ なる共鳴によってカルボニル基の効果は減殺されて居り、窒素原子の非共有電子対は固着しているものと見做される。このため、結晶格子内に於てカルバミン酸エステルは $-\text{COOC}_2\text{H}_5 \cdot \text{NH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5 \cdot \text{NH}_2$ なる構造をとり、カルバミン酸塩は $-\text{COO}^- \cdot \text{MeNH}_3^+ \cdot \text{COO}^- \cdot \text{MeNH}_2^+$ なる構造を持つと思われる (ただし Me は陽イオンを表す)。

水溶液中に於ては上記の $-\text{NH}-\text{CO}-$ の水解が H^+ によって接触されることは実験的に明らかであるから、 H^+ と結合すると考えられる窒素原子の非共有電子対が N-C 間に向って惹かれているエステルやアミドの方が、そのような効果の少い塩に比して水解され難いことは明らかである。この推定は次の如き化合物のアミノ基の解離の実測値からも支持される。すなわち CH_3-NH_2 の $\text{pK}_a^{(14)}$ は 10.64, CH_2-NH_2 の $\text{pK}_2^{(15)}$ は 9.60 である

$$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ | \\ \text{CONH}_2 \end{array}$$
 のに対して CH_2-NH_2 の $\text{pK}_a^{(15)}$ は 7.93 である。カルバミン酸のアミノ基の pK_a は上の例に比しメチレン基の遮蔽効果がないのでアンモニヤの $\text{pK}_a=9.25^{(14)}$ より若干小さくエステルや尿素の $\text{pK}_a \approx 0^{(14)}$ よりは遙かに大きくなるものと思われる。また一般にカルボキシル基は隣接アミノ基の誘起効果を受けて pK_a は小さくなるから、カルバミン酸のカルボキシル基の pK_a は当然蟻酸のそれ (3.77)⁽¹⁴⁾ よりも小さいであろう。

以上の考察を総合すると、カルバミン酸は塩基性〔Ⅰ〕、中性〔Ⅱ〕及び酸性〔Ⅲ〕水溶液中で次の各イオンとして存在する。

ここで〔Ⅰ〕は $\text{H}_2\text{N}-\text{C}\begin{smallmatrix} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{smallmatrix} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{N}^+=\text{C}\begin{smallmatrix} \diagup \text{O}^- \\ \diagdown \text{O}^- \end{smallmatrix} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{N}-\text{C}\begin{smallmatrix} \diagup \text{O}^- \\ \diagdown \text{O}^- \end{smallmatrix}$ の各限界構造間の共鳴により安定化されて居るのに対し、〔Ⅱ〕及び〔Ⅲ〕は直ちに水解して安定なアンモニウムイオン及び重炭酸イオンに変化すると考えられる。

要 約

(1) ウレアーゼ活性度測定方法としてのジラトメトリーを検討し、新型の装置を設計して、酵素活性度測定に充分使用し得ることを確認した。

(2) ウレアーゼ作用に於ける尿素 1 モル分解の際の系の容積収縮量をジラトメトリーで測定し 21.0 ± 1.5 ml を得た。この値は有機酸アンモニウム、有機酸アミドを用いてピクノメトリーで測定し計算した (尿素)→(カルバミン酸アンモニウム) 12.1 ml, (尿素)→(重炭酸アンモニウム) 21.5 ml と比較すると、実験誤差の範囲内で後者に一致すると認められた。すなわち尿素のウレアーゼによる水解反応に際してカルバミン酸アンモニウムの集積は認められなかった。

(3) Warburg のマノメトリーによりウレアーゼ反応の際の炭酸ガス吸収量を測定し、これを (尿素)→(炭酸アンモニウム) と仮定して得た計算値と比較し両者がよく一致することを認め、カルバミン酸アンモニウムの集積しないことを推定した。

(4) Conway 法を応用した化学的定量法により、ウレアーゼ作用に於て生成するカルバミン酸塩を定量し重炭酸緩衝液・磷酸緩衝液及びトリス緩衝液の何れの場合もカルバミン酸アンモニウムの生成せざることを確認した。

(5) カルバミン酸塩とエステルの水溶液中での安定性を検討し、前者が中性乃至酸性で著しく不安定であるのに対し後者が安定であることを認めた。この原因を赤外部吸収スペクトル及び解離恒数から検討し、窒素原子の非共有電子対の H^+ に対する親和力の差が安定性を支配するものであることを説明した。

最後に御指導を得た西川英次郎教授に対し深甚の謝意を表する。

(1) 志村憲助, 副島正美, 菊池栄一: 本誌, 32, 913 (1958).	(9) K. Linderstrøm-Lang: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 14, 117 (1950).
(2) 菊池栄一, 副島正美, 菅原 潔, 志村憲助: 同上, 32, 917 (1958).	(10) M. S. Saha: J. Indian Inst. Sci., A 15, pt 3, 17 (1932).
(3) 菅原 潔, 副島正美, 勾坂勝之助, 志村憲助: 同上, 32, 921 (1958).	(11) G. D. Fasman, C. Niemann: J. Am. Chem. Soc., 73, 1646 (1951).
(4) J. B. Sumner, D. B. Hand, R. G. Holloway: J. Biol. Chem., 91, 333 (1931).	(12) C. N. Hahtanen, L. S. Gall: J. Bact., 69, 102 (1955).
(5) W. Brandt: Biochem. Z., 291, 99 (1937).	(13) 化学の領域編集委員会: 赤外線吸収スペクトル, 付表 1 (1956) 南江堂.
(6) 海野義男, 檜垣繁光: 農技研報, G 2, 131 (1951).	(14) 日本化学会: 化学便覧, p. 868 (1958) 丸善.
(7) M. E. Jones, L. Spector, F. Lipmann: 3 éme congrès International de Biochimie, 67 (1955).	(15) D. M. Greenberg: Amino Acids and Proteins, p. 430 (1950) C. C. Thomas P.
(8) M. E. Jones, L. Spector, F. Lipmann: J. Am. Chem. Soc., 77, 819 (1955).	