ミロペクテン区分の沃素呈色の吸収スペクトルが沈澱剤によって相違することから、アミロース区分中にアミロペクテンが、またアミロペクテン中にアミロースが混入してくる程度に差があることを推定した。次いで 40% HClO_4 溶液を展開剤として沃素蒸気中で行う澱粉のペーパークロマトグラフィーによって、それぞれの区分中に混在するアミロペクテン、アミロースを分離し、その沃素呈色の吸光度から混在割合を算出した。その結果 n -アミルアルコール、チモールによって澱粉からアミロース、アミロペクテンの両区分を同時に純度高く分別し得ることを認めた。

本研究の研究費の一部は総合研究：澱粉の利用に関する基礎的研究（代表者大阪大学産業科学研究所二国二郎教授）によった。種々御指導を賜っている二国二郎教授に深謝する。

本報告の要旨は 1957 年 4 月 9 日、日本農芸化学会大会に発表した。

(1) T. J. Schoch : <i>Advances in Carbohydrate Chemistry</i> , 1, 274 (1945).	(5) 滝 基次 : 本誌, 33, 245 (1959).
(2) T. J. Schoch : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 64, 2954 (1942).	(6) 二国二郎, 高岡研一, 不破英次 : 本誌, 26, 218 (1952).
(3) 滝 基次 : 本誌, 33, 448 (1959).	(7) 滝 基次 : 本誌, 33, 445 (1959).
(4) 佐藤静一 : 米澱粉に関する研究, 大雅堂,	

フラビンに関する研究 (第 2 報)*

リボフラビン欠乏時の蛋白代謝機構

白鼠各組織のトランスアミナーゼ及びリボヌクレ

アーゼ活性について (其の 1)

満田久輝, 河合文雄, 外村弁一郎 (京都大学農学部農芸化学教室)

昭和 34 年 3 月 9 日 受理

緒 言

鼠、ニワトリ其の他多くの高等動物のリボフラビン欠乏による成長の抑制は蛋白質の異常代謝に起因すると思われるが、如何なる諸点において正常の場合と異なるかは明らかにされていない。また従来欠乏によって組織のフラビン含量が減少し、その結果フラビン酵素の活性低下により生体酸化還元その他の反応に対する触媒機能が減退することが欠乏症状を現わす第 1 義的理由⁽¹⁾とされていたが、最近における Burch ら⁽²⁾の研究によってこの考えはかなり訂正されなければならないことになった。即ち白鼠各組織のフラビン酵素の活性を測定した結果、DPNH 脱水素酵素の如きは 3~4 週間の欠乏では各組織とも殆んど変化しないが、その他の酵素は組織によって程度を異にはするがそれぞれ活性が減少する。殊に肝における減少が著しく A. A. O., G. A. O., X. O.**などは 30~40% に低下する。しかし腎、心、脳ではそれ程著しい減少は見られないと報告している。そこで従来から考えられているように欠乏による成長の抑制はすべてのフラビン酵素の活性低下に原因するのではなく、或る特定の酵素特に肝における上述の数種の酵素活性低下が第 1 次的理由ではないかと考えられる。更にまたこれらの諸酵素は蛋白欠乏食の場合にも著しい活性低下が知られており⁽³⁾、動物の成長即ち体蛋白質の生成と密接な関係⁽⁴⁾を有することが伺われるのである。リボフラビン欠乏動物を対象とする研究は動的な蛋白代謝研究のための恰好の試料と考えられるので、著者らは目下総合的にこの問題を検討中である。即ち本問題を次の 3 点より追究している。

- (i) アミノ酸及び蛋白質の代謝 (ii) 核酸の代謝
(iii) 欠乏動物の肝におけるこれらのフラビン酵素に対する基質の蓄積の有無及び別の代謝系の存否

* Studies on Flavin. Part II. Mechanism of Protein Metabolism in Riboflavin Deficiency. Transaminase and Ribonuclease Activities of Rat Tissues (1).

By Hisateru MITSUDA, Fumio KAWAI and Benichiro TONOMURA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyoto University)

** A. A. O. ; D-アミノ酸オキシダーゼ G. A. O. ; グリコール酸オキシダーゼ
X. O. ; キサンチンオキシダーゼ

今回は問題追究の第1歩として、合成飼料により飼育した正常並びに欠乏白鼠について Burch らの実験を追試確認した後、同試料を用いて表題の酵素活性を測定した結果を報告する。

実験材料及び方法

供試動物及び飼育法 京大純系動物飼育室管理の Wistar 系白鼠 3 匹ずつを 2 群に分ち、その 1 群は第 1 表に示す基本飼料* を与え欠乏群とし、他の 1 群には飼料 100 g 当りリボフラビン 3 mg を混じったものを与え正常群とし夫々自由採食せしめた。第 1 図は飼育経過を体重曲線で示したものである。

第 1 表 リボフラビン欠乏合成飼料の組成

基 本 飼 料		ビタミン混合液(内訳)		混 合 塩 (内訳)	
無ビタミンカゼイン	20 g	コリン塩酸塩	7.5 g	リン酸カルシウム	10 g
ブドウ糖	20 g	チアミン塩酸塩	50 mg	第 2 リン酸カリ	37 g
トウモロコシ澱粉	47 g	ニコチンアミド	200 mg	食 塩	20 g
混 合 塩	3 g	ピリドキシン塩酸塩	60 mg	硫酸マグネシウム	8 g
大 豆 油	8 g	パントテン酸カルシウム	60 mg	モリブデン酸ソーダ	0.11 g
肝 油	2 g	ビ オ チ ン	1 mg	クエン酸ソーダ	15 g
ビタミン混合液	1 ml	葉 酸	20 mg	クエン酸鉄	2 g
		イノシトール	1 g	乳酸カルシウム	8 g
		ビ タ ミ ン B ₁₂	2 mg		

以上を適量の水と混和し、
だんごとする

以上を水で 100 ml とする

試料調製法 6~7 週間後

白鼠を軽くエーテル麻酔し斬首脱血した後、心、腎、肝、筋肉を剔出し急冷する。所要量を秤量し測定の目的に応じ次の如くガラスホモゲナイザーで磨砕する。

(i) 各組織の 1 g を冷 0.01 M リン酸緩衝液、pH 7.8 の 10 倍量と共に磨砕しフラビン含量並にトランスアミナーゼ活性測定用とする。(ii) 2~4 g の肝を冷 0.02 M ピロリン酸緩衝液、pH 8.3 の 5 倍量と共に磨砕し

フラビン酵素活性測定用とする。(iii) 2 g の肝を 10 倍量の、1 g の腎を 20 倍量の、4 g の筋を 5 倍量の冷蒸溜水と共に磨砕し遠心分離 (3000 r. p. m., 10 分) した上液をリボスクレアーゼ活性測定用原液並に窒素定量用とする。

測定法 フラビン含量はホモジネートの一定量に 2° 以下で 20% 三塩化酢酸の同量を加え 10 分間放置後遠心分離し上液について Bessey ら⁽⁵⁾の方法に従い直接螢光法によりフラビン各型の定量を行った。使用装置、計算法などは前報⁽⁶⁾の通りである。フラビン酵素としての G. A. O. は Kun⁽⁷⁾の方法で、X. O. は芦田ら⁽⁴⁾の方法で、A. A. O. は一般に用いられる方法⁽⁸⁾ですべてワールブルグ検圧法により 1 時間当りの酸素吸収量で活性を比較した。トランスアミナーゼ活性は、Awapara⁽⁹⁾の方法によりアラニン或はアスパラギン酸と α -ケトグルタル酸を基質とし生成したグルタミン酸を、南瓜から調製したグルタミン酸脱炭酸酵素を用いワールブルグ検圧計により炭酸ガス発生量⁽¹⁰⁾から計算した。リボスクレアーゼ活性は酵母リボ核酸を基質とし、酸可溶性区分の紫外線吸収を測定する方法によった。緩衝液の種類、イオン強度により活性が相違することが報ぜられており⁽¹¹⁾、この点を考慮して第 2 表に示す如く McDonald⁽¹²⁾の方法に準じた方法によった。窒素はセミマイクロケルダール法により測定した。

実験結果並びに考察

フラビン含量とフラビン酵素 リボフラビン欠乏による総フラビン量の変化については説田ら⁽¹³⁾の報告が

* 1 部の組成を変更した以外は Burch らの実験に準拠した。

第 1 図 リボフラビン欠乏白鼠 (♂) の体重曲線

第 2 表 リボヌクレアーゼ活性測定法

試験区	基質 ¹⁾ 1 ml 酵素液 ²⁾ 1 ml	37°, 30 分	沈澱剤 ³⁾ 2 ml	濾過 (東洋濾紙 No. 131)	吸光度測定 260 mμ (濾液を蒸留水で 5 倍に稀釈)	E
対照区	基質 1 ml 沈澱剤 2 ml 酵素液 1 ml					E ₀

$$(計算法)^{4)} \quad \frac{(E - E_0) \times 40}{0.35} \times \frac{1}{\text{酵素液 N 量 (mg)}} \times \frac{1}{1000} = P \text{ (mg)} \dots \left(\begin{array}{l} \text{N 1 mg 当たり 1 時間に加水分} \\ \text{解された酸可溶性部分の P mg} \end{array} \right)$$

1) 酵母リボ核酸を 5 mg/ml (P として約 0.5 mg/ml) の濃度に各緩衝液に溶解する。

2) 酵素液を水で稀釈し (0.2~1.0 mg N/ml), 吸光度と比例関係を示す範囲の濃度 3 点を選ぶ。

3) 0.25% 酢酸ウラニウムを含む 0.2N 過クロール酸。

4) 1N 過クロール酸中の酵母核酸の 260 mμ における吸光度平均値 (Ely Prot=0.35)。

M. Ogur & G. Rosen: Arch. Biochem., 25, 262 (1950).

第 3 表 リボフラビン欠乏白鼠各組織のフラビン含量とフラビン酵素活性

組織	正 常 群 (♀)						欠 乏 群 (♀)					
	フラビン含量*			酵 素 活 度**			フラビン含量*			酵 素 活 度**		
	重量 (g)	FR+FMN	FAD	X.O.	G.A.O.	A.A.O.	重量 (g)	FR+FMN	FAD	X.O.	G.A.O.	A.A.O.
肝	6.27 ±0.23	5.70 ±0.3	25.8 ±1.5	195 ±15	500 ±50	116 ±8	4.87 ±1.48	0.80 ±0.1	11.4 ±1.5	103 ±13	80 ±20	39 ±3
腎	1.46 ±0.10	14.0 ±1.0	21.2 ±1.1				1.07 ±0.22	7.35 ±0.4	16.5 ±0.3			
心	0.64 ±0.07	1.60 ±0.3	17.5 ±0.7				0.46 ±0.10	1.15 ±0.2	10.3 ±0.3			

各値も 3 匹の平均値

* 新鮮組織 1g 当たりのリボフラビンとしての γ 数

** 新鮮組織 1g 当たりの 1 時間の酵素吸収量 (μl)

あるが、フラビン各型の変化を明らかにしたのは Burch ら⁽¹²⁾である。即ち欠乏によって各組織の総量は勿論減少するが、腎、心などの FMN 及び FAD* の量比は正常のものと大差ない。しかし肝では FMN が著しく減少すると述べている。最近山桐⁽¹⁴⁾は同様の実験を行ったが FMN の量は正常のものと大差ないと報告している**。著者らはその正否を検討し且つ肝のフラビン酵素活性についても追試し第 3 表の結果を得た。動物組織中の free riboflavin (FR) は無視し得る量であり、表中 (FR+FMN) の値は殆んど FMN と見做して差支えない。本表によれば心では欠乏により FMN, FAD 共に同じ程度 (60~70%) に減少する。然るに肝では FAD は約 45% に減少し FMN は僅少量になる。腎では FAD は心と同程度に減少し FMN は約 50% に減少する。即ち肝における FMN の減少が特に著しい。これらの事実は Burch らの報告と全く一致した結果である。またフラビン酵素についても X.O. は約 50% に、G.A.O. は約 20% に、A.A.O. は約 30% 以下にそれぞれ活性が低下していることも確認し得た。以上の結果は Burch らの実験と全く同様であって、供試動物は体重曲線、毛並など外観の兆候とも併せ考え、所期の如くリボフラビン欠乏群及び正常群として取扱って間違いないと考える。

トランスアミナーゼ活性 本酵素の活性測定法としては多数の方法⁽¹⁵⁾があるが、Awapara が蛋白欠乏食白

第 4 表 リボフラビン欠乏白鼠各組織のトランスアミナーゼ活性*

組織	正常群 (♀)		欠乏群 (♀)	
	GOT	GPT	GOT	GPT
肝	167 ± 11	255 ± 20	257 ± 10	278 ± 15
腎	184 ± 14	56 ± 5	228 ± 20	65 ± 8
心	308 ± 6	110 ± 8	294 ± 14	86 ± 10
筋	196 ± 10	156 ± 13	230 ± 3	98 ± 5

各値とも 3 匹の平均値

* 新鮮組織 1g 当たり 1 時間に生成するグルタミン酸量 (μ moles)

* FMN; Flavin mononucleotide FAD; Flavin adenine dinucleotide

** その理由としてペーパークロマトグラフィー分析法を採用したため定量の限界によるのであらうと述べている。

*** GPT; Glutamic-pyruvic transaminase GOT; Glutamic-oxalacetic transaminase

鼠について測定しているので⁽⁹⁾、同氏の実験と対照する意味で著者らもこの方法と同様の方法により測定し第 4 表に示す結果を得た。本表によれば GPT 活性*** は肝、腎では両群の間に殆んど相違がないか若しくは欠乏群の方が少々高い傾向にあり、心、筋では低下している。一方 GOT 活性*** は肝において欠乏群は著しく高く、腎、心、筋は少々高いか同程度である。Awapara によれば蛋白欠乏食の場合には腎の各々の活性は殆んど変らないが、肝では GPT 活性が著しく低下し GOT 活性は変らないと言っている。このように成長の抑制と言う同一の現象を与えるにもかか

わらず本酵素が条件によって可成り異った様相を示すことは、多くの研究者によって認められているように本酵素活性が蛋白質合成と一致した関係にないことを示すものである^{(16)*}。即ち Gavosto ら⁽¹⁷⁾も述べているように肝の GPT は蛋白質が体内エネルギー源として役立つために大いに寄与している。従って蛋白欠乏食の場合先ず GPT 活性が低下することは了解できる。これに反しリボフラビン欠乏の場合は、飼料の点において熱量並びに蛋白質は量的にも質的にも十分に与えられており、GPT 活性が正常群と殆んど変わらないのも当然かもしれない。また GOT は蛋白質がエネルギー源となるための寄与は少なく（この事は反応の平衡恒数⁽¹⁸⁾からも合理的と考えられる）、むしろ窒素排泄の代謝（例えば尿素排泄におけるオルニチン迴路におけるアスパラギン酸の関与など）に重要な役割を果している。リボフラビン欠乏の場合、飼料蛋白質がどの程度に体蛋白質の構成に用いられるかは今後の研究に待たねばならないが、今仮りに体蛋白質の構成には殆んど用いられず大部分が直ちに尿素として排泄されると考えるならば**、GOT 活性は正常群に比しより高いことが必要と思われる。そして又このような考えによれば他のアミノ酸を基質とするトランスアミナーゼも正常群より活性が高いと都合が良い。本表に示す実験結果は、このような仮定を設けるとよく説明できるが、なお多くの事実を証明しなければその真否は解らない。さて茲に興味あることは、各群について2つの活性の比（GPT/GOT）を求めると第5表の如くである。即ち蛋白欠乏食あるいはリボフラビン欠乏食を与える実験の正常群についての活性比が近似していることは当然と思われるが、欠乏群については両実験における GPT 及び GOT 活性の変りかたが違っているにもかかわらず、活性比は近似の値を示している。このように原因を異にするも同一の生理現象の場合類似の関係になることは面白いことであり、何らかの理由があるのかもしれない。

第5表 白鼠肝トランスアミナーゼの活性比

活性**	蛋白欠乏食*		リボフラビン欠乏食	
	正常群	欠乏群	正常群	欠乏群
	GPT 358	292	255	278
活性比	GOT 248	257	167	257
	GPT GOT	1.44 1.11	1.53 1.08	

* J. Awapara: *J. Biol. Chem.*, 200, 537 (1953).** 新鮮組織 1g 当たり 1 時間に生成するグルタミン酸量 (μ moles).

かが明白になると思う。著者らはこのためにアミノ酸混合飼料による飼育を準備中である。

リボヌクレアーゼ活性 RNA*** が蛋白質の生合成に密接な関係を有することが既に実証されている^(18,19)。一方リボフラビン欠乏の場合先に述べた如く肝のフラビン酵素活性が鋭敏に低下するが、この中 A. A. O. は現在のところ直接核酸構成成分の代謝に関係すると言う事実は見付けられていないが、X. O. 及び G. A. O. はプリン塩基及びリボースリン酸の最終的代謝産物の酸化を触媒する酵素である。このことから窒素成分の代謝を検討すると同時に核酸の代謝過程の相違を知ることも極めて重要である。即ち欠乏により体組織全般殊に肝における核酸生合成能が低下するか或は代謝系が異なるか、何れかにより成長が停止するのではないかと考えられる。そこで今回はリボヌクレアーゼの活性を比較した。活性化されたアミノ酸と可溶性（細胞質液）RNA の結合或はマイクロゾーム蛋白質へのアミノ酸の incorporation が本酵素により阻害される事が知られているから、体蛋白質生合成の能力の欠けるリボフラビン欠乏

第6表 リボフラビン欠乏白鼠各組織のリボヌクレアーゼ活性*

組織	正常群 (3)		欠乏群 (3)	
	RNase I ¹⁾	RNase II ²⁾	RNase I	RNase II
肝	0.052 ± 0.001	0.028 ± 0.001	0.060 ± 0.005	0.028 ± 0.003
腎	0.136 ± 0.003	0.245 ± 0.008	0.195 ± 0.001	0.268 ± 0.003
筋	0.010 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.017 ± 0.002	0.022 ± 0.003

各値とも3匹の平均値

* N 1 mg 当り 1 時間に加水分解された可溶性部分の P (mg)

1) 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 5.5 2) 0.1 M トリス緩衝液, pH 7.8

白鼠の肝では、正常群との間に著しい差のあることを期待したのであるが、測定の結果は第6表に示す如く殆んど有意の差は認められなかった。しかし僅かに欠乏群の方が活性が高い傾向がある。この実験では組織を蒸留水で磨砕したものについて行った

* 現在までの研究は殆んど GOT 及び GPT 活性だけについて行われており、他のアミノ酸と間の活性がどのような関係にあるかは解っていない。

** 尿の組成については目下実験中である。

*** RNA; Ribonucleic acid

ものであり、次回には等張液を用い細胞成分(可溶性部分と顆粒体区分)に分画したものについて更に確めたい。同時に本酵素活動のみならず、可溶性区分の RNA 量⁽²⁰⁾、マイクロゾームの形状特にリボ核蛋白質の状態⁽²¹⁾も測定する必要がある。またリボフラビン欠乏によって肝の X.O. は約 1/2 の活動となり、G.A.O., A.A.O. は殆んど活動が無くなる事も注目に値することであり、正常群と欠乏群の間のヌクレオチダーゼ及びヌクレオンダーゼの活動の相違も本問題を解決する重要な鍵となろう。

要 約

リボフラビン欠乏による異常蛋白代謝を明らかにする目的で、先ず欠乏白鼠各組織のフラビン含量及び 2, 3 の酵素活動を、正常群のそれと比較し次の結果を得た。

(i) 腎、心のフラビン含量は欠乏によって 60~70% に減少するが FMN と FAD の量比は大差はない。然し肝では FAD が約 50% に減少し FMN は僅少量となる。

(ii) 欠乏により肝のキサンチンオキシダーゼは約 50% に、グリコール酸オキシダーゼ及び D-アミノ酸オキシダーゼは約 20~30% に活動が低下する。

(iii) リボフラビン欠乏時のトランスアミナーゼについては、肝においては GOT 活動が著しく高くなり、GPT 活動もやや高くなる。腎では GOT, GPT 活動は共にやや高いかまたは同程度である。肝における活動の変化は蛋白欠乏食の場合と一致しない。これは飼料中の蛋白質の有無に起因するものと推論した。

(iv) しかして正常群ならびに欠乏群の肝における GOT 及び GPT 活動の比を求めるときは、蛋白欠乏食ならびにリボフラビン欠乏食共に類似の値となる。

(v) 水抽出したホモジネートのリボヌクレアーゼ活動は、各組織共欠乏群の方がやや高いが有意の差とは認められない。この結果は細胞成分に分画した後更に確めねばならない。

本報の要旨は昭和 33 年 12 月 13 日、第 155 回日農化関西支部例会において発表した。

(1) 八木国夫著：フラビンの生化学, p. 266 (1957).	(12) M. R. McDonald: <i>Method in Enzymol.</i> , 2, 427 (1955).
(2) H. B. Burch, O. H. Lowry, A. N. Padilla, A. N. Combs: <i>J. Biol. Chem.</i> , 223, 29 (1956).	(13) 説田 武, 鎌田秀雄, 福井佐平: ビタミン, 11, 282 (1956).
(3) C. Hoch-Ligeti: <i>Proc. Soc. Exp. Biol. Med.</i> , 83, 403 (1953); E. B. McQuarrie, A. T. Venosa: <i>Science</i> , 101, 493 (1945); L. L. Miller: <i>J. Biol. Chem.</i> , 172, 113 (1948); R. A. Pesch, J. H. Clark: <i>Proc. Soc. Exp. Biol. Med.</i> , 91, 510 (1956).	(14) 山桐加津子: ビタミン, 14, 770 (1958).
(4) 吉田 昭, 山崎 隆, 菅田 淳: 本誌, 29, 721 (1955).	(15) H. Lis: <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 28, 191 (1958); B. D. Smith, H. H. Williams: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 31, 366 (1951); E. C. C. Lin, W. E. Knox: <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 26, 85 (1957); M. J. K. Leonard, R. H. Burris: <i>J. Biol. Chem.</i> , 170, 701 (1947).
(5) O. A. Bessey, O. H. Lowry, R. H. Leve: <i>J. Biol. Chem.</i> , 180, 755 (1949).	(16) A. Meister: <i>Adv. in Enzymol.</i> , 16, 185 (1955).
(6) 満田久輝, 河合文雄, 三好歳雄: 本誌, 32, 847 (1958).	(17) F. Gavosto, A. Pileri, A. Brusca: <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 24, 250 (1957).
(7) E. Kun: <i>J. Biol. Chem.</i> , 194, 603 (1952).	(18) J. L. Simkin, T. S. Work: <i>Nature</i> , 179, 1214 (1957).
(8) 赤堀四郎編: 酵素研究法, 2 巻, 455 (1956).	(19) 志村憲助: 化学の領域, 12, 807 (1958).
(9) J. Awapara: <i>J. Biol. Chem.</i> , 200, 537 (1953).	(20) C. M. Clark, D. J. Naismith, H. N. Munro: <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 23, 587 (1957).
(10) 赤堀四郎編: 酵素研究法, 2 巻, 714 (1956).	(21) J. W. Littlefield, E. B. Keller: <i>J. Biol. Chem.</i> , 224, 13 (1957).
(11) J. S. Roth: <i>J. Biol. Chem.</i> , 227, 591 (1957).	