Chim. biol., 36, 1363 (1954); 八木国夫,
奥田 潤: 蛋白質 核酸 酵素, 4, 57(1959).
(17) G. E. Perlmann: *Advances in Protein*

Chem., 10, 1 (1955).
(18) R. C. Warner, E. Polis: *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 529 (1945).

〔農化 第35巻, 第1号, p. 24~27, 1961〕

鶏胚のリン蛋白質ホスファターゼに関する研究 (第2報)*

Casein を基質とした場合の酵素の性質

長谷川 喜代三 (京都大学農学部農芸化学教室)

昭和34年7月13日受理

緒 言

前報⁽¹⁾においては孵化日数13日目の鶏胚のアセトン粉末抽出液からアセトン分別, 硫酸分別によってリン蛋白質ホスファターゼ (PPPase) を精製した結果ならびに本酵素がホスホモノエステラーゼ (PMEase) の代表的基質たる β -グリセロリン酸塩を加水分解せず, また蛋白質分解作用を伴わないことを述べた。

本報においては本酵素を casein に働かせた場合について, その反応機構をとくための基本的な二, 三の性質, すなわち本酵素による casein P の加水分解の程度, 本酵素作用に対する反応温度, pH, 基質濃度の影響などを調べた。またその結果に基づいて PPPase 活性測定の方法の吟味をも行った。

実験材料と方法

1. **PPPase** 鶏胚は前報⁽¹⁾と同じくゴールデンネック種のものを用いた。鶏胚79匹, 422g (孵化日数13日目, 60匹, 373.5g; 11日目, 19匹, 48.5g) より前報⁽¹⁾と同じ方法で PPPase を分別精製し, フラクション0.4S (PPPase 活性 1.77 E. U./ml; 比活性 2.89 E. U./mg 蛋白N) 16.2 ml を得て, 本実験における酵素液として用いた。収量は 45.9% であった。このフラクションは PMEase 作用および蛋白質分解作用を示さなかった。

2. **PPPase 活性の測定法** 基質 (casein) 溶液, 緩衝液の種類, 濃度, pH および反応温度などの反応条件, ならびに測定法は特に記述しない限り前報⁽¹⁾に同じである。

実験結果

1. PPPase による casein P の加水分解

第1図 Casein P の加水分解率

酵素濃度 2ml/10ml, 基質濃度 1 μ mole casein P/ml, pH 5.9, 温度 20°, 図中の点線は加水分解率 100% (理論値) を示す。

Casein 分子中のリン酸結合に対して鶏胚の PPPase がどの程度にまで作用するかを, 時間-加水分解率曲線として示したのが第1図の実験である。この実験においては基質濃度は通常の場合の 1/10, すなわち 1 μ mole casein P/反応混液 1 ml とし, 酵素は反応混液 10 ml あたり 2 ml の酵素液を使用した。図より明らかな如く基質および酵素濃度が適当な範囲にある時は, 基質として用いた Hammarsten casein 分子中のリン酸結合は鶏胚の PPPase によって比較的短時間のうちに完全に加水分解されるのである。Casein にウシ脾臓の PPPase を働かせて得られる dephospho-casein は pH 6.0 で水に不溶であるといわれているが⁽²⁾, 本実験においても反応混液は次第に不透明となり, 反応開始後 30 分には完全に白濁し, 4 時間後には白色沈澱として dephospho-casein が分離していた。反応の前後において pH (5.90) は変化しなかった。

2. **反応温度の影響** 鶏胚の PPPase は溶液状態においては急速に失活する⁽³⁾といわれているので, 37°, 27°, 17° でそれぞれ

* Studies on Phosphoprotein Phosphatase in Chick Embryo. Part II. Properties of the Enzyme with Casein as Substrate.

By Kiyozo HASEGAWA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyoto University)

第 2 図 反応の初速度と反応の時間的経過に及ぼす温度の影響

酵素濃度 1 ml/10 ml, 基質濃度 10 μ moles casein P/ml, pH 5.9

第 3 図 活性化エネルギーの計算のための Arrhenius プロット

第 4 図 pH-酵素活性曲線

酵素濃度 1 ml/10 ml, 基質濃度 10 μ moles casein P/ml, 温度 20°

反応せしめて、反応温度が反応の初速度ならびに反応の時間的経過に及ぼす影響を調べた。その結果を第 2 図に示す。図に明らかなように反応の初速度は 37° において最も高く、27°/17°, 37°/27° の初速度の比、すなわち Q_{10} はそれぞれ 1.8 であった。しかしながら 37° においては酵素の失活が著しく、7 分頃から反応は急に遅くなって来る。これに比べると 27° および 17° では直線関係はより長く保たれ、27°, 30 分の値は、37°, 30 分の値より大である。鶏胚の PPPase のこの熱に不安定な性質はウシ脾臓の PPPase が非常に熱に安定である⁽⁴⁾のに比べて大いに異なる点である。

また第 2 図の実験例において Arrhenius の式に従って絶対温度の逆数に対して反応の初速度 v の対数をとると第 3 図に示す如く直線になる。ただし、この実験において基質濃度は Michaelis 恒数 (後記) よりも大過剰に与えられている。この直線の勾配から

$$E = -2.303 R \times \log(v_2/v_1) / (1/T_2 - 1/T_1)$$

なる式によって本酵素反応の活性化エネルギーを計算して 10,680 cal という値を得た。PPPase の活性化エネルギーに関しては今までに報告されたものはない。

3. pH の影響 pH と酵素活性の関係を第 4 図に示した。この実験においては 0.1 M 醋酸塩緩衝液およびこれに適量の 0.5 M ペロナルソーダを加えてペロナル・醋酸塩緩衝液としたものを緩衝液として用いた。図に明らかなように本酵素反応の最適 pH は 5.9 である。この pH-活性曲線をウシ脾臓の PPPase のそれ^(5,6)と比較すると、特に最適 pH の酸性側において活性の低下が著しく、またアルカリ側において活性の低下がゆるやかであるのが特徴的である。

最適 pH それ自体はウシ脾臓の場合も pH 6.0^(4,5)あるいは pH 5.0~5.5⁽⁶⁾であって、鶏胚の場合もこれと大差はない。

4. 基質濃度の影響 反応混液中の基質濃度を 0.17~12 μ moles casein P/ml の範囲で変えて、基質濃度と反応速度との関係を調べた。その結果を Lineweaver, Burk⁽⁷⁾ の方法に従って作図し (第 5 図), Michaelis 恒数を求めた。その結果鶏胚の PPPase の casein P に対する Michaelis 恒数として 5×10^{-4} M なる値を得た。ウシ脾臓の PPPase の casein P に対する Michaelis 恒数は 2 内至 3×10^{-3} M^(5,6) であるので、鶏胚の PPPase の方がウシ脾臓のそれよりも casein P に対する親和力強いということがいえるであろう。

5. 酵素活性測定条件の検討 著者は鶏胚の PPPase 活性測定のために前報⁽¹⁾に記述した如く新しい反応条件を設定したが、それは以下の理由によるものである。Harris⁽⁸⁾ によって行われたカエル卵巣の PPPase 活性測定を始めとして、従来哺乳動物臓器中の PPPase 活性の測定は温度 37° で反応せしめ、10 分内至 30 分後に遊

第5図 基質濃度と反応速度の関係
酵素濃度 1 ml/10 ml, pH 5.9, 温度 20°

第6図 酵素濃度と反応速度の比例関係
基質濃度 10 μ moles casein P/ml, pH 5.9, 温度 20°.

離した無機リン酸を定量することによって行われている^(4,6,9-11). Glomset⁽⁴⁾ によって指摘されている如くウシ脾臓の PPPase は熱に対して安定であって、70°, 5 分の加熱によって失活しない。またその活度測定条件 (37°, 30 分) の設定に当っては反応の時間的経過を観察して、この条件において反応が直線的に進行することの検討がなされている⁽⁵⁾。しかしながら鶏胚の PPPase 活度の測定に当って Foote, Kind⁽⁸⁾ はこれらと同じ反応条件 (37°, 30 分) を採用しているが、反応温度と反応の時間的経過についての検討がなされているかどうかは疑問である。しかも彼ら自身鶏胚の PPPase は溶液状態において不安定であって、室温において急速に活度を失うと述べているのである。著者が本報において検討したところでは、鶏胚の PPPase

は 37° においては不安定であって、反応は 5 分まで直線的に進行するが、それ以後次第に遅くなり、30 分後には最初の約 10% の活度しか示さない(第2図)。従って鶏胚の PPPase の場合は 37°, 30 分の反応条件は不適当であると考えられる。前報⁽¹⁾において採用した反応条件、すなわち基質濃度は 10 μ moles casein P/ml とし、pH 5.9 において反応温度 20° で反応せしめ、反応開始後 10 分までの反応の初速度を測定するという反応条件は、反応温度の影響、pH の影響、Michaelis 恒数など、本報において検討した諸条件を基にして設定されたものである。この方法で測定した酵素活度は酵素濃度に比例する(第6図)ので、この方法は鶏胚の PPPase に関しては、従来の 37°, 30 分という測定法⁽⁸⁾よりも正確であると考えられる。

考 察

Casein 分子中のリン酸の結合型式については従来二つの説がある。すなわち Perlmann⁽¹²⁾ は前立腺ホスファターゼ、腸粘膜ホスファターゼ、蛇毒ホスホジエステラーゼおよび酵母ピロホスファターゼを用いて α-casein, β-casein および未分画の casein

の脱リン酸を行い、その結果から α-casein のリン酸結合は RO·PO(OH)₂ 型が 40%, RO·PO(OH)·NHR 型が 40%, RO·PO(OH)·O·PO(OH)·OR 型が 20% であり、β-casein においては RO·PO(OH)·OR 型が 100% を占めており、また未分画の casein のリン酸結合は前立腺ホスファターゼによって 12% しか加水分解をうけないと述べている。しかしながら、casein のリン酸結合の多様性を認めたこの Perlmann の結論は Hofman⁽¹³⁾ によって否定された。Hofman はウシ脾臓の PPPase の低分子量基質に対する基質特異性を検討した上で、casein のリン酸結合について考察を加え、casein のリン酸結合の型式は一種類であって RO·PO·(OH)₂ 型以外にはあり得ないであろうと結論した。また Kalan, Telka⁽¹⁴⁾ は種々のホスホモノエステラーゼによる casein の脱リン酸の経過がホスホジエステラーゼあるいはピロホスファターゼとのプレインキューションによって左右されないことから、α-casein, β-casein および未分画の casein のリン酸結合はすべて同一で一種類しかないと結論している。

鶏胚中の PPPase は Foote, Kind⁽⁸⁾ によれば低分子量リン酸化合物にはまったく働かないとされており、また著者の得た結果でも、β-グリセロリン酸塩にはまったく働かず⁽¹⁾、しかも Hammarsten casein 中のリン酸結合全部を短時間のうちに完全に加水分解する(第1図)。従って鶏胚の本酵素は Perlmann によって示された前立腺ホスファターゼなどによる脱リン酸作用とは異なるものであって、リン蛋白質に対して特に強い基質特異性

を有しているのである。

要 約

Casein を基質にした場合の鶏胚のリン蛋白質ホスファターゼの基本的な性質を調べて次の結果を得た。

- (1) Casein 中のリン酸結合は本酵素によって短時間のうちに完全に加水分解された。
- (2) 本酵素に対する温度の影響を調べ、本酵素が非常に熱に不安定であり、37° においては活度の減少が速やかであるので本酵素活度の測定は 20° で行うのがよいと結論した。また 30 分後の遊離リンの量を測定するよりも、反応の初速度を測定すべきことを述べた。
- (3) 本酵素作用の 17~37° における Q_{10} は 1.8, 活性化エネルギーは 10,680 cal であることを見出した。
- (4) pH 活度曲線から最適 pH が 5.9 であることを見出した。
- (5) 本酵素の casein P に対する Michaelis 恒数を求め、 5×10^{-4} M なる値を得た。
- (6) 以上の結果に基いて本酵素活度測定条件に検討を加えた。

本研究に当り終始御指導御鞭撻を戴いた京都大学満田久輝教授に厚く感謝の意を表します。また本実験の遂行に助力された大村幸一君に謝意を表します。

(本報告の要は 1960 年 2 月 13 日京都大学における日本農芸化学会関西支部例会第 167 回講演会において発表した。)

(1) 長谷川喜代三 : 本誌, 35, 20 (1961).	(9) R. N. Feinstein, M. E. Volk : <i>ibid.</i> , 177, 339 (1949).
(2) T. A. Sundararajan, P. S. Sarma : <i>Biochem. J.</i> , 65, 261 (1957).	(10) B. Norberg : <i>Acta. Chem. Scand.</i> , 4, 1206 (1950).
(3) M. W. Foote, C. A. Kind : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 46, 254 (1953).	(11) K. Paigen : <i>J. Biol. Chem.</i> , 233, 388 (1958).
(4) J. A. Glomset : <i>Biophys. Biochim. Acta</i> , 32, 349 (1959).	(12) G. E. Perlmann : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 74, 3191 (1952); <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 13, 452 (1954); <i>Nature, Lond.</i> , 174, 273 (1954); <i>Advances in Protein Chem.</i> , 10, 1 (1955).
(5) T. A. Sundararajan, P. S. Sarma : <i>Biochem. J.</i> , 56, 125 (1954).	(13) T. Hofman : <i>Biochem. J.</i> , 69, 139 (1958).
(6) T. Hofman : <i>ibid.</i> , 69, 135 (1958).	(14) E. B. Kalan, M. Telka : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 79, 275 (1959).
(7) H. Lineweaver, D. Burk : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 56, 658 (1934).	
(8) D. L. Harris : <i>J. Biol. Chem.</i> , 165, 541 (1946).	

[農化 第 35 巻, 第 1 号, p. 27~32, 1961]

ヘキソサミンの生化学的研究 (第 1 報)*

Elson-Morgan 反応によるグルコサミンおよび

ガラクトサミンの吸収曲線について

櫛田秀雄, 尾藤竜哉, 志多半三郎 (科研薬化工株式会社研究所)

昭和 35 年 7 月 15 日 受 理

ヘキソサミン特有の呈色反応として Elson-Morgan 反応は古くから知られていて⁽¹⁾, その定量に用いる場合のいろいろな条件についての研究が主としてグルコサミンを中心として報告されている^(2~6)。著者らは数年前ヘキソサミンの定量を始めるにあたり, B. Schloss⁽⁴⁾ の方法にしたがうこととした。しかしグルコサミンのみについての研究であったため, ガラクトサミンをも使用して再検討を行った。その結果アセチルアセトン試薬の最適 pH には両ヘキソサミンに有意の差は無かったが, その吸収極大波長には差を認めた。すなわちグルコサミンは 512 mμ に, ガラクトサミンは 530 mμ にその $\lambda_{\max}$ をみた。またアセチルアセトンの質, 発色時の液温, アルコール使用法など注意すべきことも同時に判明した^(7~8)。したがって著者らのこの結果からだけ考えても, いろ

* Biochemical Studies on Hexosamines. Part I. The Absorption Curves of the Reactions from D-Glucosamine and D-Galactosamine by Elson-Morgan Reaction.

By Hideo KUSHIDA, Tatsuya OFUJI and Hanzaburo SHIDA (Research Laboratory, Kakenyaku Ka-Ko Co., Ltd.)