酵素基質複合体に関する研究

交叉濾紙泳動法によるアルギナーゼと基質の反応

山口県立医科大学医化学教室 (指導 中村正二郎教授)

山口県立医科大学精神神経科学教室 (主任 中村 敬三教授)

佐々木 石根

Studies on the Enzyme-Substrate Complex.
The Reactions of Arginase with its Substrates by
the Crossing Paper Electrophoresis.
By Iwane Sasaki

Crystalline of arginase were obtained from beef liver according to the procedure of Bach, and its specific activities were measured.

The formation of enzyme-substrate complex between arginase and arginine was proved by the method of "crossing paper electrophoresis".

Even when the arginase was inactivated by the removal of Mn^{++} ion, it was also proved that the inactivated arginase combined with the substrate as in the case of active enzyme.

The competitive inhibitors of arginase, ornithine and lysine, also formed the complex with the enzyme.

序 説

1904 年に Kossel 及び Dakin¹⁾ が肝抽出液中にアルギニンから尿素を生成する酵素のあることを発見してアルギナーゼと命名した。哺乳動物の肝臓からアルギナーゼを精製結晶化する試みは約 40 年前からなされているが、Richards 及び Hellerman²⁾ その他の人々の努力にもかかわらず結晶化は永く成功しなかつた。1946 年 Bach³⁾ は牛の肝臓から少量の硫酸亜鉛によつて肝色素を除去し結晶化に成功したと報告したが、この方法の再現は容易でないと述べた。Mohamed^{4), 5)} は Bach の結晶は不活性蛋白質と母液からなる繊維状のものにすぎないと反論し、彼自身かなり高い比活性を有する酵素を精製したと発表した。更に Greenberg 等⁶⁾ は高度に精製されたアルギナーゼをえたと述べている。

しかし 1958 年ついに Bach 等^{7), 8)} は牛の肝臓からアルギナーゼの結晶化に成功し、更に馬及び羊の肝臓からも結晶を作製することに成功した。

アルギナーゼはマンガン、コバルト、鉄など種々の金属イオンによつて活性化せられ⁹⁾、透析によつて失活するが¹⁰⁾、これらの金属イオンを加えると再び活性化される¹¹⁾ことが知られている。この金属イオンの賦活作用¹²⁾

が、金属イオンと基質との反応によつておこるのではなく、金属イオンとアルギナーゼとの反応によつておこることは、金属イオンによるアルギナーゼの賦活にかなりの時間を必要とすることから明らかである。

酵素が作用するに当つてまず基質と結合して複合体を作り、ついでこれが酵素と分解産物とに分解するという想定は今日ひろく認められている。Michaelis-Menten の理論¹³⁾がこの酵素基質複合体の想定にもとづくことは周知の通りである。しかし酵素基質複合体の直接証明はこれまでカタラーゼ¹⁴⁾、過酸化酵素¹⁵⁾など二三の酵素について光学的におこなわれたにすぎず、加水分解酵素をふくむ他の多くの酵素については、酵素基質複合体の証明はおこなわれていなかったといえる。最近、中村等^{18)~25)}は交叉濾紙泳動法を考案し、酵素基質複合体生成を直接濾紙上に証明することに成功し、すでに二三の例を報告している。更に中村等^{23), 24), 25)}はトリプシン、パepsinその他の酵素について、これらの酵素が活性の如何に関係なく基質と結合することを証明している。ここには活性のアルギナーゼ及びマンガンイオンをとり除いて不活性化されたアルギナーゼについて、基質との複合体形成の証明について述べる。

実験方法

1. 交叉濾紙泳動法。

交叉濾紙泳動法の実験方法は中村等^{(18), (19), (21), (22), (24)}によつて述べられている方法にしたがつておこない、装置も中村等⁽²³⁾の装置を使用した。

緩衝液はすべて pH 6.8 とし、

(1) イオン強度 0.05 の磷酸塩

(2) EDTA (ethylene diamine tetraacetate) を 1 mM になるように加えた磷酸塩

(3) 40 mM 硫酸マンガンと 10 mM マレイン酸ソーダのみを含む溶液、の三種を使用した。

電気泳動はおよそ 18 V/cm で 1.5~2 時間、0~3°C の氷室でおこなつた。

濾紙は Whatman No.1 を用い、泳動後 110°C で乾燥して、アルギニンは坂口反応及び 0.2% のニンヒドリンで発色させた。対照に用いたグルタミン酸、アスパラギン酸もニンヒドリンで発色させ、hydroxycinnamic acid は Pauly⁽¹⁶⁾ の Diazo 反応によつて発色させた。

2. 酵素液。

(a) アルギナーゼの結晶化。

アルギナーゼは Bach⁽⁷⁾の方法により、牛の肝臓のアセトン粉末を処理して作製した。結晶は三回再結晶して 40 mM 硫酸マンガンと、10 mM マレイン酸ソーダを含む pH 6.8 の溶液 (以下 MM 溶液と略す) に溶解して保存し、必要な場合には更に MM 溶液また他の緩衝液で透析したものを使用した。第 1 図は自製のアルギナーゼの結晶であるが、Bach⁽⁷⁾の示したものとよくにている。

第 1 図 結晶アルギナーゼ

(×400)

(b) アルギナーゼ活性の測定。

アルギナーゼ活性の測定も Bach⁽⁷⁾の方法に準じてお

こなつた。すなわち MM 溶液で適当に稀釈した酵素液 0.1 ml に 0.1M, pH 9.0 のグリシン緩衝液 2.0 ml を加えて恒温槽で 30°C, 15 分間保温し、更に 0.26 M, pH 9.0 のアルギニンを 0.5 ml 加えて正確に 30°C, 10 分間反応させ、3M, pH 4.6 の酢酸緩衝液 1.0 ml を加えて反応を停止させ、生じた尿素量は Van Slyke-Cullen⁽¹⁷⁾の方法で測定した。酵素液の蛋白濃度は Bach にしたがひ分光光度計法によつて測定したが、同時に trichloroacetic acid で蛋白のみを沈澱させて Kjeldahl 法によつても測定した。

活性 1 単位 (unit) は 10 分間に 50 mM のアルギニン溶液から尿素 1 μ M を遊離する量に定め、酵素液の比活性は蛋白窒素 mg 当りの単位数であらわした。

第 1 表にはアルギナーゼの比活性の測定結果をしめした。まず結晶を単に MM 溶液に溶解した溶液の比活性は 168,000 で Bach の値 173,000 の 97% であつた (No. 1)。

第 1 表 アルギナーゼの比活性

No.	酵 素 液	比活性	①に対する比率 (%)	蛋白濃度 (%)
1	MM溶液に溶解	168,000 173,000 (Bach)		1.30
2	MM 溶液で 15 時間透析 (40 mM 硫酸マンガン)	146,000	87	0.50
3	MM 溶液で 15 時間透析 (10 mM 硫酸マンガン)	106,000	63	
4	pH 6.8 磷酸緩衝液で 5 時間透析	37,000	22	
5	④→MM 溶液で 15 時間透析	111,000	66	
6	pH 6.8 磷酸緩衝液で 10 時間透析	0	0	0.50
7	⑥→MM溶液で 15 時間透析	113,000	67	0.31
8	1mM, EDTAを含むpH6.8 磷酸緩衝液で 5 時間透析	0	0	0.55
9	⑤→MM溶液で15時間透析	79,000	47	0.32

次にこの酵素溶液を 1,000 倍量の MM 溶液、及び硫酸マンガンの量を 1/4 に減少した (すなわち 10 mM 含有) MM 溶液に対してそれぞれ 15 時間透析した場合の比活性は 146,000 及び 106,000 で、非透析溶液に対してそれぞれ 87%, 63% に減少していた (No. 2, No. 3)。

酵素結晶の MM 溶液を pH 6.8 の磷酸緩衝液に対して 5 時間透析した場合比活性は 37,000 (原溶液の 22%) 迄低下し (No. 4), 更に 5 時間透析した場合、活性は完

全に失われた (No. 6)。またこのように透析によつて失活させた各酵素液を MM 溶液で 15 時間透析すると、いずれも原液の 2/3 迄活性を回復することができた (No. 5, No. 7)。

最後に 1 mM の割に EDTA を含む磷酸緩衝液に対して 5 時間透析すると活性は完全に失われた (No. 8)。これを MM 溶液に対して透析することにより原液の約 1/2 迄活性を回復することができた (No. 9)。

以上透析はすべて 0~3°C の氷室でおこない、各酵素液の蛋白濃度は Kjeldahl 法によつて測定し、その値は第 1 表の右端に示した。

3. 基質その他。

基質としてのアルギニンは 10 mM, オルニチン, リジン, グルタミン酸, アスパラギン酸, ピクリン酸も 10 mM, hydroxycinnamic acid は 5 mM の割に pH 6.8 の磷酸緩衝液にとがして使用した。

実験結果

1. 交叉濾紙泳動法による活性アルギナーゼと基質との複合体生成の証明。

第 2 図に示したのはアルギニン溶液を電場に対して垂直な直線 AB 上にぬり、活性アルギナーゼ (酵素液を MM 溶液で透析したもの) を電場に平行な直線 X_0Y_0 上にぬつて MM 溶液を緩衝液として泳動せしめた結果である。アルギニンの線は陽極から陰極に向つて泳動するが、アルギナーゼはほとんど泳動しない。したがつてアルギニンの線とアルギナーゼの線は泳動によつて交叉する。図から明らかなように X_0Y_0 線との交点でアルギ

第 2 図 活性アルギナーゼとアルギニン及びグルタミン酸との交叉反応

AB : 10 mM アルギニン 0.02 ml / 7 cm を塗布
 CD : 10 mM グルタミン酸 0.02 ml / 7 cm を塗布
 X_0Y_0 : MM 溶液に対して透析した 0.50% 活性アルギナーゼ 0.02 ml / 12 cm を塗布
 250 V / 14 cm, 2 時間, 0~3°C
 緩衝液 : MM 溶液, 乾燥後ニヒドリンで発色

ニンの線は強くくぼんでいる。

この場合、酵素液は MM 溶液で透析しており、またその透析外液と同一緩衝液を泳動に使用しているから、濾紙上で酵素液をぬつた部分が他の部分と pH やイオン強度が著しく異なるとは考えられない。したがつてアルギニンの線にできたくぼみはこの部分で pH やイオン強度が局部的に変化しているためではない。このことは対照としてグルタミン酸とアルギナーゼを泳動交叉させてみればわかる。すなわち第 2 図に示すようにアルギニンの線 (AB) と平行な直線 CD 上にグルタミン酸をぬり、活性アルギナーゼ (X_0Y_0) と交叉泳動させた。この場合にはグルタミン酸の線は陰極から陽極に向つて泳動してアルギナーゼの線と交叉しているが、交叉によつてくぼみを作っていない。グルタミン酸の他にアスパラギン酸, ピクリン酸, hydroxycinnamic acid などを対照に用いたが、いずれの場合にも同様の結果がえられた。すなわち電場にはこれらの物質の線にくぼみを作るほどの局部的ゆがみ (pH やイオン強度の変化) や局部的粘性の変化はないといえる。したがつてアルギニンの線がアルギナーゼの線との交点でくぼみを作っているのは、アルギニンとアルギナーゼの直接反応にもとづくといえる。

またこの場合緩衝液として MM 溶液を使用しているから、泳動の途中でアルギナーゼの活性の失われることはない。また一方緩衝液の pH は 6.8 で、この pH ではアルギナーゼはアルギニンを分解しないから、アルギニンの線のくぼみは分解産物たるオルニチンによつてできているのではない。オルニチンは坂口反応で呈色しないから、坂口反応を利用すればくぼみを作っているのがアルギニンの線であるか否かを確かめることができる。ここに示した実験でもこの方法でアルギニンの線がくぼみを作っていることを明らかにしえた。ただ MM 溶液が緩衝液として使用されているためにマンガンによる黒褐色の着色が濾紙全体につよくおこり、アルギニンの線の写真による判別は極めて困難となる。したがつてこの結果は図示しなかつた。

以上の点からみて反応しているのが活性のアルギナーゼであり、またアルギニンの線がくぼみを作っている部分でアルギニンそのものが分解されることなく反応しているといえる。すなわち第 2 図の X_0Y_0 線上を通過する部分にできたアルギニンの線のくぼみは、アルギニンがアルギナーゼと反応して複合体を作り、移動速度が減少したためであると結論できる。

2. 不活性アルギナーゼと基質との複合体生成の証明。

次にマンガンイオンを除去して不活性化したアルギナ

第3図A 不活性アルギナーゼとアルギニンとの交叉反応

AB: 10 mM アルギニン 0.02 ml/14 cm を塗布
 X_1Y_1 : マンガンを含め磷酸緩衝液に対して透析した 0.50% 不活性アルギナーゼ 0.02 ml/10 cm を塗布
 $XbYb$: pH 6.8 磷酸緩衝液 0.02 ml/10 cm を塗布
 $X_1'Y_1'$: X_1Y_1 にぬつた酵素液を更に MM 溶液に対して透析した 0.31% 活性アルギナーゼ 0.02 ml/10 cm を塗布
 $XmYm$: MM 溶液 0.02 ml/10 cm を塗布
 250 V/14 cm, 1.5 時間, 0-3°C
 緩衝液: pH 6.8, $\alpha=0.05$ 磷酸塩, 乾燥後ニンヒドリンで発色

第3図B

X_2Y_2 : EDTA 含有磷酸緩衝液に対して透析した 0.55% 不活性アルギナーゼ 0.02 ml/10 cm を塗布
 $XeYe$: 1 mM, EDTA を含む pH 6.8 磷酸緩衝液 0.02 ml/10 cm を塗布
 $X_2'Y_2'$: X_2Y_2 にぬつた酵素液を更に MM 溶液に対して透析した 0.32% 活性アルギナーゼ 0.02 ml/10 cm を塗布
 その他は第3図Aに同じ

ーゼについて基質との反応をみた。すなわち第3図Aに示したように酵素液を pH 6.8 の磷酸緩衝液で透析して不活性化したものを直線 X_1Y_1 上にぬり、この溶液を再び MM 溶液に対して透析し復活したものを $X_1'Y_1'$ 上にぬつた。第3図Bでは X_2Y_2 に 1 mM の EDTA を含む緩衝液に透析して不活性化したものを、 $X_2'Y_2'$ にはこれを再び MM 溶液に対する透析で復活したものをぬつて、それぞれアルギニン (AB) と交叉泳動させた。図でわかるように不活性アルギナーゼ (X_1Y_1 , X_2Y_2) も、復活した活性アルギナーゼ ($X_1'Y_1'$, $X_2'Y_2'$) もアルギニンと同程度に強く反応している。一方対照として $XbYb$, $XeYe$, $XmYm$ にはそれぞれ酵素液の透析外液である pH 6.8 の磷酸緩衝液, 1 mM の EDTA を含む同じ緩衝液, および MM 溶液をぬつてアルギニンの線 (AB) と交叉させてある。図からわかるようにアルギニンの線は MM 溶液の線との交点でわずかにくぼんでいるが、アルギナーゼの線とのくぼみにくらべると問題にはならない。また前二者に対しては全然反応を示していない。これからみてアルギニンの線にできたくぼみが濾紙上における酵素液の部分と他の部分との pH ないしイオン強度の差によつてできたものではないことが推測できる。このことはさらにグルタミン酸, アスパラギン酸, ピクリン酸, hydroxycinnamic acid などを用いて証明できる。すなわち第3図Cの AB にはグルタミン酸をぬつて活性アルギナーゼ ($X_1'Y_1'$, $X_2'Y_2'$) および不活性アルギナーゼ (X_1Y_1 , X_2Y_2) と交叉泳動させたが、全然反応を示さなかつた。アスパラギン酸, ピクリン酸, hydroxycinnamic acid などいずれも同様であつた。

アルギナーゼを磷酸緩衝液に対して透析すれば不活性となることからみて、この緩衝液中にマンガンを含めぬこ

第3図C アルギナーゼとグルタミン酸との交叉反応

AB: 10 mM グルタミン酸 0.01 ml/14 cm を塗布
 他は第3図A, B に同じ

第3図D

緩衝液：1 mM, EDTA 液を含む pH 6.8 燐が塩他は第3図 A, B に同じ

とは明らかであり、したがって不活性アルギナーゼが泳動の途中で再び活性化することはない。しかし不活性のアルギナーゼが基質と反応することをさらに確認するために、第3図Dでは燐酸緩衝液中に EDTA を含む液を泳動に使用した。この場合も第3図Bと同様アルギニン (AB) は EDTA 含有緩衝液で透析した不活性アルギナーゼ (X_2Y_2) 及びこれを復活した活性アルギナーゼ ($X_2'Y_2'$) と強く反応している。この場合には緩衝液の中にマンガンイオンの存在することはもはや全く考えられず、反応は不活性のアルギナーゼとアルギニンとの間におこるというほかはない。しかも表1に示すようにに不活性となつたアルギナーゼは、なお MM 溶液で透析することによつて再び活性を回復する。すなわちこれらの不活性化したアルギナーゼはなお変性して酵素蛋白に構造上の変化をおこしているのではなく、可逆的に不活性化しているにすぎない。いずれにしても不活性化したアルギナーゼがアルギニンと直接反応していること、すなわちアルギナーゼが活性の如何にかかわらず基質と結合すること、また結合にマンガンイオンを必要としないことはこれによつて確認せられたといえる。

3. アルギナーゼと競争阻害物質との結合。

最後に第4図に示したように、アルギナーゼの競争阻害物質としてよく知られているオルニチン、リヂンをアルギニン (AB) と同じように電場に垂直な CD, EF 線上にぬつて活性アルギナーゼ (X_0Y_0) と反応させると、いずれもアルギニンと同様にアルギナーゼと強く反応する。この場合 MM 溶液を緩衝液として泳動したが、pH 6.8 の燐酸塩でも同一の結果がえられた。これからみてオルニチン、リヂンなどアルギナーゼの競争阻害物質もアルギナーゼとよく結合することが証明できたとい

第4図 活性アルギナーゼと競争阻害物質との交叉反応

AB : 10 mM アルギニン 0.01 ml / 4 cm を塗布
CD : 10 mM オルニチン 0.01 ml / 4 cm を塗布
EF : 10 mM リヂン 0.01 ml / 4 cm を塗布
他は第2図に同じ

える。

考 察

交叉泳動法では基質の線に酵素の線を交叉させ、基質の線が交点でくぼみを作るか否かによつて酵素と基質とが複合体を作るか否かを判定する。基質の線にくぼみができれば、これは交点で酵素が基質と直接反応していることを示すものといえる。すなわち基質はここで酵素と複合体を作るために泳動がそれだけきまげられ、基質の線にくぼみができると考えるからである。この方法を利用すれば一般にどのような酵素についても酵素基質複合体生成の証明を試みる事ができるはずである。ただ問題となるのは使用する酵素を十分に純粋にすることである。さもなければ基質と反応したものが酵素そのものであるか不純物であるかを判定することができないからである。ここに示した実験では結晶の形で純粋にとりだしたアルギナーゼを用いて、酵素と基質が直接反応することを証明した。したがってアルギナーゼの場合にも酵素と基質の複合体の生成を証明することができたといえる。

一方、マンガンイオンを除いて不活性化されたアルギナーゼについても、活性アルギナーゼの場合と同様に基質との結合がおこることを証明することができた。すなわちアルギナーゼは活性の如何にかかわらず基質と結合するといえる。このことはアルギナーゼの作用機序を考える上に重要な意義をもっている。アルギナーゼの活性にマンガンイオンの必要なことは古くから知られているが、これを説明するために Hellerman²⁹⁾ はマンガンイ

オンが酵素と基質との間に配位してキーレイトを作り複合体形成を助けるという説を提案した。しかし上に示した実験ではアルギナーゼはマンガニイオンの存在すると否とにかかわらず基質と結合することを証明できたのであるから、すくなくともアルギナーゼについては、マンガニイオンが酵素と基質の間に入つて複合体形成を助けるという想定は成立しないといえる。しかしマンガニイオンはアルギナーゼの活性に関係するのであるから、マンガニイオンは酵素と基質の結合する場所とは異つた場所でアルギナーゼの活性の発現に関係しているというほかはない。

これまで基質は酵素の活性中心 (active site) に結合する、すなわち基質の結合場所がそのまま活性中心であると考えられていたが、上述の如く基質の結合が酵素の活性の如何とは関係なくおこるということは、中村²⁴⁾のいうように酵素分子の表面で基質を結合する結合中心と、活性の発現に関係する活性中心とが空間的に異なる場所に存在するであろうと考えしめるに充分である。

要 約

1. Bach の方法にしたがつて牛の肝臓からアルギナーゼを結晶化し、比活性を測定した。
2. 交叉濾紙泳動法を利用しアルギナーゼとアルギニンとを交叉反応させて、酵素基質複合体の生成されることを直接濾紙上に証明した。
3. 不活性アルギナーゼも活性アルギナーゼと同様に基質と結合して複合体を生成することを証明した。
4. アルギナーゼの競争阻害物質であるオルニチン、リヂンもアルギニンと同様にアルギナーゼと反応することを確かめた。
5. これらの事実から、マンガニイオンが酵素と基質の間に配位して複合体形成を助けるという説を否定した。

文 献

1. A. Kossel and H. D. Dakin: *Z. Physiol. Chem.*, **41**, 321 (1904); **42**, 181 (1904)
2. M. M. Richards and L. Hellerman: *J. Biol. Chem.*, **134**, 237 (1940)
3. S. J. Bach: *Nature*, **158**, 376 (1946)
4. M. S. Mohamed: *Acta Chem. Scand.*, **3**, 56 (1949)
5. M. S. Mohamed: *Acta Chem. Scand.*, **3**, 988 (1949)
6. D. M. Greenberg, A. E. Bagot and O. A. Roholt: *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 446 (1956)
7. S. J. Bach and J. D. Killip: *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 273 (1958)
8. S. J. Bach and J. D. Killip: *Biochim. Biophys. Acta*, **47**, 336 (1961)
9. L. Hellerman and M. E. Perkins: *J. Biol. Chem.*, **112**, 175 (1935)
10. S. Edlbacher, M. Becker and A. V. Segesser: *Z. Physiol. Chem.*, **255**, 53 (1938)
11. A. B. Anderson: *Biochem. J.*, **39**, 139 (1945)
12. M. S. Mohamed and D. M. Greenberg: *Arch. Biochem.*, **8**, 349 (1949)
13. L. Michaelis and M. L. Menten: *Biochem. Z.*, **49**, 333 (1913)
14. K. G. Stern: *J. Biol. Chem.*, **114**, 473 (1936)
B. Chance: *ibid.*, **151**, 553 (1943)
15. D. Keilin and T. Mann: *Proc. Roy. Soc. B.*, **122**, 119 (1937)
H. Theorell: *Enzymologia* **10**, 250 (1941)
16. R. J. Block, E. L. Durrum and G. Zweig: *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, 253 (1955)
17. D. D. Van Slyke and Cullen: *J. Biol. Chem.*, **19**, 141, 211 (1914)
Deut. Med. Wochenschrift, **40**, 1219 (1914)
18. 中村正二郎, 上田務: *Naturwiss.*, **45**, 569 (1958)
19. 中村正二郎, 細田勉, 上田務: *Proc. Japan Academy*, **34**, 742 (1958)
20. 中村正二郎, 竹尾和典, 佐々木石根, 村田正人: *Nature*, **184**, 638 (1959)
21. 中村正二郎: *日本臨床*, **17**, 588 (1959)
22. 中村正二郎, 竹尾和典, 田中一成, 上田務: *Z. Physiol. Chem.*, **318**, 115 (1960)
23. 中村正二郎, 竹尾和典: *Z. Physiol. Chem.*, **320**, 280 (1960)
24. 中村正二郎: *酵素化学シンポジウム 第14集* (1960)
25. 竹尾和典: *生物物理化学*, **6**, 145 (1960)
26. 辻岡嗣郎: *生物物理化学*, **7**, 11 (1960)
27. 村田正人: *生物物理化学*, **7**, 65 (1960)
28. 中村正二郎, 分山敏郎: *J. Biochem.*, **49**, 733 (1961)
29. L. Hellerman: *Physiol. Rev.*, **17**, 454 (1937)