D-Arabinosone の酵素化学的研究 (第 5 報¹⁾) D-Arabinosone の Phosphatidylethanolamine 自動酸化促進作用

上原喜八郎, 堀口光保
大阪大学薬学部²⁾

Enzymatic Studies of D-Arabinosone. V.¹⁾ Stimulation of Peroxidation of Phosphatidylethanolamine by D-Arabinosone

KIHACHIRO UEHARA and MITSUHO HORIGUCHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University²⁾

(Received April 2, 1971)

Addition of D-arabinosone to rat or swine liver homogenate accelerated the rate of oxygen consumption. The substance in the liver responsible for this reaction was confirmed as phosphatidylethanolamine. Incubation of phosphatidylethanolamine in the presence of D-arabinosone resulted in the formation of lipid peroxides, and it was apparent that D-arabinosone stimulated the peroxidation of the phospholipid. The autoxidation of D-arabinosone was not affected by the phospholipid. D-Xylosone and D-glucosone also stimulated the peroxidation. In the course of this investigation, it was also found that some substance preventing the autoxidation of D-arabinosone might exist in liver.

著者らは D-arabinosone に関する酵素化学的な研究を進め、さきにパン酵母中に還元型 nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate を水素供与体として D-arabinosone を D-リブローズに還元する酵素, および D-リボースと D-キシロースに還元する酵素との 2 種類の酵素が存在することを明らかにした.³⁾ 神谷らは L-アスコルビン酸適応菌によって D-arabinosone が代謝されると報告している.⁴⁾ これらのことから, D-arabinosone は 5 炭糖の代謝中間体の 1 つではないかと推定される。

著者らは前報¹⁾ において D-arabinosone が緩やかな条件下で自動酸化され、この自動酸化はわずかではあるが Cu^{2+} により、またリン酸塩によって促進されることを明らかにした。そこで D-arabinosone の代謝経路の 1 つとして、酵素的な還元反応のほか酵素的な酸化反応もあるのではないかと推定し、肝臓を用いて検討を進めた。この過程で D-arabinosone が phosphatidylethanolamine (以下 PE と略す) の自動酸化を促進することを認めたのでここに報告する。

実 験 の 部

D-Arabinosone, D-Xylosone, D-Glucosone Reichstein らの方法⁵⁾ を改良し,⁶⁾ それぞれ相当する糖のフェニルオサゾンをベンツアルデヒドで分解して調製した。

肝臓ホモジネート 一昼夜絶食したラットを断頭し、ただちに肝臓を摘出して肝臓 1g あたり 9ml の 0.154M KCl を加え、ガラスホモジナイザーを用いて調製した。14500×g で 10 分間遠心分離した上清を可溶性分画とし、沈殿を 0.154M KCl に懸濁してもとのホモジネート量にしたものを不溶性分画とした。

PE 新鮮なブタの肝臓 400g を肉挽きで磨砕し、2 liter の 99% エタノールで 2 回室温で 30 分間攪拌抽出する。抽出液を 40° で減圧濃縮し、濃縮残渣を用時蒸留したエーテル 150 ml に懸濁して蒸留水 150 ml ずつで 2 回洗浄する。エーテル層を Na_2SO_4 で乾燥後、減圧下で溶媒を除く。残渣を少量のエーテルに溶かし、アセト

1) 第 4 報: 上原喜八郎, 堀口光保, 薬誌, 91, 1058 (1971).

2) Location: 6-5 Toneyama, Toyonaka, Osaka.

3) K. Uehara, M. Takeda, J. Biochem. (Tokyo), 56, 42 (1964).

4) 神谷真太郎, 中林敏郎, ビタミン, 18, 411 (1959).

5) T. Reichstein, A. Grüssner, R. Oppenauer, Helv. Chim. Acta, 17, 510 (1934).

6) 上原喜八郎, 菅野浩一, 溝口 正, 武田誠郎, 堀口光保, 生化学, 34, 290 (1962).

ン 30 ml を加えて沈殿を遠心分離して集める。沈殿を再び少量のエーテルに溶かし無水エタノール 15 ml を加えて白色粉末状の物質約 5 g を得た。このものの一部を Hanahan らの方法⁷⁾ にしたがって調製したケイ酸カラムにかけ、クロロホルムで洗浄後、クロロホルム：エタノール (4:1, v/v) で溶出されるリン酸エステルの分画を集める。再ケイ酸カラムクロマトグラフィーを行ない、薄層クロマトグラム⁸⁾ 上、ニンヒドリン試薬⁹⁾ およびモリブデン酸アンモニウム試薬¹⁰⁾ に陽性の単一のスポットを示す物質を得た。このものは次の検討から PE であることを確認した。1) 上述の薄層クロマトグラム上の挙動。2) 赤外線吸収スペクトルは PE の赤外線吸収スペクトル¹¹⁾ によく一致。3) Chang らの方法¹²⁾ に従い、NaOH で緩やかな加水分解を行ない、生じた水溶性のリン酸化合物を希エタノールより結晶化し、次の所見からこのリン酸化合物が α -glycerylphosphorylethanolamine であることを確認。i) mp 85—86° (未補正) で文献値¹³⁾ (mp 86—87°) によく一致。ii) Anal. Calcd. $C_5H_{14}O_6NP \cdot H_2O$: C, 25.75; H, 6.92; N, 6.00; P, 13.29. Found: C, 25.44; H, 7.01; N, 5.86; P, 13.45. iii) 1N HCl 中、100° で 15 分間処理すると、 α -グリセロリン酸とエタノールアミンを生ずる。PE はガラスホモジナイザーを用いて、15 mg/ml の蒸留水懸濁液を用時調製して実験に用いた。

その他の試薬 市販品を用いた。

実験方法

酸素消費量の測定 ワールブルグ検圧計を用い、37.5°、気相は空気の下で測定した。¹⁴⁾

リピド過酸化物の測定 次に示す 3 つの方法で測定した。1) Wagner らの方法¹⁴⁾ にしたがってロダン鉄法で測定した。2) Chatterjee らの方法¹⁵⁾ にしたがってチオバルビツール酸法で測定した。なお発色は 80° で 20 分間¹⁶⁾ 行なった。3) 232 m μ における吸光度の増加¹⁷⁾ は、反応液 0.4 ml に 1N HCl 0.1 ml を加えて反応を止め、95% エタノール 3.5 ml を加えて測定した。この酸性溶液中においてもリピドの過酸化物は 232m μ 付近に吸収極大を示した。

D-Arabinosone の測定 5 炭糖の測定法であるオルシノール法¹⁸⁾ およびケトースの測定法であるシステイン-カルバゾール法¹⁹⁾ で測定した。オルシノール法では発色後 670 m μ における吸光度を測定した。システイン-カルバゾール法では、室温で 16 時間反応したのち 580 m μ における吸光度を測定した。

なお吸光度の測定には島津分光光度計 QV-50 型を使用した。

結 果

D-Arabinosone は pH 6.5, 37.5° の緩やかな条件下で自動酸化される。¹⁾ この条件下で D-arabinosone にラットの肝臓ホモジネートを添加すると著しく酸素消費の速度が増大した (Fig. 1)。この現象はあらかじめ、100° で 5 分間熱処理したホモジネートを用いた場合にも同様に認められた。したがって、この現象は D-arabinosone の酸化が酵素的に促進されることによるのではなく、D-arabinosone と肝臓中の熱に安定な物質との反応によるものと判断される。

この反応に関与する物質は、Fig. 1 に示したように、ホモジネートの不溶性分画に存在し、肝臓よりエタノールで抽出された (Fig. 2)。肝臓をエタノールで抽出した残渣は D-arabinosone と肝臓のエタノール抽出物との反応を促進したが、D-arabinosone の自動酸化に対しては抑制作用を示した (Fig. 2)。

同様の現象はラットの肝臓の代わりにブタの肝臓を用いた場合にも認められた。そこで以下ブタの肝臓を用いてエタノールで抽出される物質について検討を進め、D-arabinosone 共存下、酸素消費の速度を増大する反応に関与する主な物質は PE であることを確認した (実験の部参照)。

さて、D-arabinosone と PE の共存下、どのような反応によって酸素消費の速度が増大するのかを知る目的で、次の検討を行なった。D-Arabinosone と PE の共存下では D-arabinosone が完全に自動酸化される場合に消

7) D.J. Hanahan, J.C. Dittmer, E. Warashina, *J. Biol. Chem.*, **228**, 685 (1957).

8) E.J. Masaro, L.B. Rowell, R.M. McDonald, *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 493 (1964).

9) I. Smith, *Nature*, **171**, 43 (1953).

10) C.S. Hanes, F.A. Isherwood, *Nature*, **164**, 1107 (1949).

11) A.H. Duthie, S. Patton, *J. Lipid Res.*, **6**, 320 (1965).

12) T.L. Chang, C.C. Sweeley, *Biochemistry*, **2**, 592 (1963).

13) E. Bear, H.C. Stancer, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4510 (1953).

14) C.D. Wagner, H.L. Clever, E.D. Peters, *Ind. Eng. Chem.*, **19**, 980 (1947).

15) I.B. Chatterjee, R.W. McKee, *Arch. Biochem. Biophys.*, **110**, 254 (1965).

16) S.R. Fortney, W.S. Lynn, Jr., *Arch. Biochem. Biophys.*, **104**, 241 (1964).

17) E.D. Wills, *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, 238 (1965).

18) W. Mejbaum, *Z. Physiol. Chem.*, **258**, 117 (1939).

19) Z. Dische, E. Borenfreund, *J. Biol. Chem.*, **192**, 583 (1951).

Fig. 1. Interaction of D-Arabinosone and Rat Liver Homogenates

The assay mixture contained 0.5 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5), 0.2 ml of 0.1 M D-arabinosone, 1.0 ml of rat liver homogenates or soluble- or insoluble-fraction of the homogenates, and water to make 2.7 ml.

—●—, D-arabinosone; —○—, D-arabinosone and homogenates; ---x---, D-arabinosone and insoluble-fraction; ---△---, D-arabinosone and soluble-fraction. The endogenous oxygen consumption of homogenates was subtracted.

Fig. 2. Interaction of D-Arabinosone and Rat Liver Ethanol Extracts of Residues

In 50 ml of ethanol, 5 g of rat liver was minced, and after stirring for 30 min at 25°, filtered on a Büchner funnel. The residues were dried *in vacuo* and suspended in 50 ml of 0.154 M KCl. The extracts were evaporated *in vacuo* until ethanol was removed, and suspended in 50 ml of 0.154 M KCl. The assay mixture contained 1.0 ml of the suspension of the extracts and/or the residues. Other details were as described in Fig. 1. —●—, D-arabinosone; ---△---, D-arabinosone and the extracts; ---○---, D-arabinosone and the residues; ---x---, D-arabinosone, the extracts and the residues.

Fig. 3. Peroxidation of PE in the Presence of D-Arabinosone

The reaction mixture contained 4.0 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5), 12.0 mg of PE, and 0.8 ml of 0.1 M D-arabinosone in a total volume of 12.0 ml. The reaction was carried out at 37.5° under stirring. Aliquots were removed at intervals, and lipid peroxidation was measured by the thiocyanate method [$\text{Fe}(\text{SCN})_2$], the thiobarbituric acid method [TBA], and OD at 232 mμ [E_{232}]. For the measurement of oxygen consumption [O_2], 3.0 ml of the reaction mixture was used. ---○---, D-arabinosone; ---x---, PE; —●—, D-arabinosone and PE.

費する酸素の全量¹⁾よりも多量の酸素が消費されたので、PEの酸化も進行していると推定し、リビドの過酸化物の生成を検討した。その結果、Fig. 3に示したように、PEのみの系では酸素消費はほとんど認められず、リビドの過酸化物の生成も認められなかった。しかしD-arabinosone共存下ではロダン鉄法¹⁴⁾、チオバルビツール酸法^{15,16)}および232 mμにおける吸光度法¹⁷⁾のいずれの方法で検討した場合にも酸素消費の増加に伴い、リビドの過酸化物の生成が認められた。この際、D-arabinosoneが自動酸化によって減少する速度はPEによって全く影響されなかった (Fig. 4)。これらの結果から、D-arabinosoneとPEの共存下、酸素消費の速度が増大するのはD-arabinosoneの自動酸化がPEによって促進されるのではなく、D-arabinosoneがPEの自動酸化を促進するためであることがわかった。

Fig. 5に示したように、D-xylosoneやD-glucosoneなどのosoneもPEの自動酸化を促進した。L-アスコルビン酸がPEの自動酸化を促進することはすでに知

Fig. 4. Disappearance of D-Arabinosone by Autoxidation in the Presence and Absence of PE

The reaction conditions were as described in Fig. 3. Aliquots were removed at intervals, and D-arabinosone was estimated by the orcinol method (—○—), and the cysteine-carbazole method (—x—). ○, D-arabinosone; x, D-arabinosone and PE; ●, PE.

Fig. 5. Effect of Various Osones and the Related Compounds on the Peroxidation of PE

The assay mixture contained 3.0 mg of PE and 0.2 ml of 0.1 M of osones or the related compounds. Other details were as described in Fig. 1. —●—, with L-ascorbic acid; —○—, with D-arabinosone; —▲—, with D-xylosone; —x—, with D-glucosone; —△—, with glyoxal. Oxygen consumption due to the autoxidation of the osones and the related compounds was subtracted.

られている²⁰⁾が、このものはいずれの osone よりも強力に PE の自動酸化を促進した。Glyoxal も弱いながら PE の自動酸化を促進した。

考 察 と 総 括

D-Arabinosone にラットまたはブタの肝臓ホモジネートを添加すると、酸素消費の速度が著しく増大した。この現象がどのような反応によるのかを明らかにする目的でこの反応に関与する物質の検討を進めたところ、肝臓中には D-arabinosone と反応する 2 つの物質が存在することを見いだした。すなわち、一方は D-arabinosone と反応して酸素消費の速度を増大する作用を示し、他方は D-arabinosone の自動酸化を抑制する作用を示した。このことは、D-arabinosone が、緒言で述べたように糖の代謝中間体としても興味深い化合物であるが、さらに生体成分との反応の面からも興味深い化合物であることを示唆している。

D-Arabinosone 共存下、酸素消費の速度を増大する反応に関与する肝臓中の主な物質は PE であった。D-Arabinosone と PE の共存下、酸素消費の速度が増大するのは PE が D-arabinosone の自動酸化を促進するためではなく、D-arabinosone が PE の自動酸化を促進するためであることがわかった。D-Xylosone や D-glucosone などの osone も PE の自動酸化を促進した。しかし PE の自動酸化は自動酸化能のない D-リボースや D-アラビノースによっては促進されず、また D-arabinosone をあらかじめ自動酸化しておいたものによっても促進されなかった。したがって PE の自動酸化は osone が自動酸化される際に生ずる遊離ラジカルによって誘発されるのであらうと思われる。

なお、D-arabinosone の自動酸化を抑制する物質については目下検討中である。

謝辞 元素分析を担当されました大阪大学薬学部元素分析室の皆様へ感謝します。

20) K.A.C. Elliott, B. Libet, *J. Biol. Chem.*, **152**, 617 (1944); A. Ottolenghi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **79**, 355 (1959).