モルモット尿中の非透析性 β -Glucuronidase 阻害物質 (第 2 報¹⁾) 性状

海津 関男

東京生化学研究所²⁾

Non-dialyzable β -Glucuronidase Inhibitor in Guinea-Pig Urine. II.¹⁾ Properties

TOKIO KAIZU

Tokyo Biochemical Research Institute²⁾

(Received May 16, 1975)

Properties of non-dialyzable β -glucuronidase inhibitor isolated from guinea-pig urine were examined by using the calf liver β -glucuronidase (ketodase). It was a heat stable inhibitor of β -glucuronidase. Kinetic studies indicated that the substance functions as a non-competitive inhibitor and it was a relatively specific inhibitor for β -glucuronidase. The inhibitory activity of purified inhibitor on β -glucuronidase was stronger than those of acid mucopolysaccharides, chondroitin sulfate A, B, and C, heparin, and hyaluronic acid. Electrophoretic pattern of the purified inhibitor was completely different from those of the latter substances.

著者は、前報において、モルモット尿中に D-glucaric acid 以外に強力な非透析性 β -glucuronidase 阻害物質の存在を明らかにした。そしてこの阻害物質の分離と精製し、電気泳動的に単一な物質を得た。

今回は、モルモット尿中から分離精製された非透析性 β -glucuronidase 阻害物質が、果して原尿中の阻害物質とその諸性質においても同じものであるかを検討した。

また、従来、acid mucopolysaccharide の中に β -glucuronidase 阻害作用を示すものが知られているので、これらとの相違を β -glucuronidase 阻害作用の強さで比較した。

実験の部

試薬 Chondroitin sulfate A, B, および C, heparin そして hyaluronic acid は生化学工業製のものを使用した。他の試薬は特別の記載がない限り、すべて市販の特級品を用いた。

採尿 前報と同様に行った。¹⁾

透析 前報と同様に Visking 製セルロースチューブを用いて行った。¹⁾

β -Glucuronidase 阻害率 (a) 50% 阻害濃度：前報¹⁾と同様に測定した。(b) k_i 値：前報と同様の方法で行い、 $\mu\text{g/ml}$ で表わした。

モルモット尿中の非透析性 β -Glucuronidase 阻害物質 前報に記した透析尿 (分画 1) とモルモット尿中から分離した分画 6 を阻害物質として用いた。

各種 β -glucuronidase 活性におよぼす阻害物質の効果、阻害率の測定法は前報と同様に行った。¹⁾ Helix pomatia (100000 Fishman 単位/ml), patella vulgata (300000 Fishman 単位/ml) および *Escherichia coli* (500000 単位/ml) は Sigma 製のものを用いた。*Escherichia coli* からの β -glucuronidase の測定は Wakabayashi らの方法を用いた。³⁾ すべての酵素が 300 Fishmann 単位に稀釈されて用いられた。雌ラット包皮腺の β -glucuronidase は Snaith らの方法を用いて部分的に精製した。⁴⁾

各種酵素活性に及ぼす分画 6 の効果 阻害率は阻害物質の $\mu\text{g/ml}$ にたいして % 阻害で表現した。

各種酵素活性の測定法は以下のようである。

プロナーゼ-P—0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 1.0 ml, 0.1% プロナーゼ-P (科研化学製, 力価=45000 PUK/g) 0.1 ml を加え、室温に 20 min 放置して、0.5% casein (生化学工業の proteinase 用基質) 1.0 ml を

1) 第 1 報: 海津関男, 薬誌, 95, 1226 (1975)。

2) Location: Takada, Toshima-ku, Tokyo; Present address: 1-35-23, Nozawa, Setagaya-ku, Tokyo, Meiji College of Pharmacy.

3) M. Wakabayashi, W.H. Fishman, *J. Biol. Chem.*, 236, 996 (1961).

4) S.M. Snaith, G.A. Levvy, *Biochem. Biophys. Acta*, 146, 599 (1967).

加えて混合し, 37° 30 min 保温後, 5% trichloroacetic acid 3.0 ml を加えて反応を停止させて, 2000 rpm で 20 min 遠心し, 上清を tyrosine の吸収 275 nm で測定した. Trichloroacetic acid 以外はすべて 0.2M Tris-HCl 緩衝液に溶解した.

Trypsin—0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0), trypsin (50 μ g/ml 0.01N HCl 中) 0.9 ml を加え室温 10 分放置後, 0.1M α -N-tosyl-L-arginine methyl ester 0.1 ml を混合し, 37°, 30 min 保後, 5% trichloroacetic acid 3.0 ml を加え反応を停止させ, 2000 rpm で 20 min 遠心後, 上清を Roberts の hydroxylamine 法を用いて測定した.⁵⁾

パペイン—0.2M 磷酸緩衝液 (pH 6.5) 1.0 ml, 0.1% パペイン (片山化学製: 力価=1:350) 1.0 ml, 20 min 室温放置後, 0.5% casein 1.0 ml を加え混合し, 37°, 60 min 保温後, 5% trichloroacetic acid を 3.0 ml 加えて反応停止させて, 2000 rpm で, 20 min 遠心, 上清を 275 nm で測定した.

Kallikrein—Pisano⁶⁾ らの変法が kallikrein の TAME (α -N-tosyl-L-arginine methyl ester) エステラーゼ測定に用いられた. H^3 -TAME 0.047 μ Ci (0.01 ml, 比活性約 200 mCi/mmol), kallikrein⁷⁾ (10^{-2} 単位/ml) および 0.2M Tris-HCl, pH 8.0, 0.05 ml が混合され 25°, 30 min 保温した. 遊離の H^3 -MeOH が Beckman LS-355 液体シンチレーションスペクトロメーターで測定された.

Acid Phosphatase—0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5.0), 8.3×10^{-4} M cystein 溶液 0.1 ml, acid phosphatase (ラットの肝臓より精製, ホモジネートの 300 倍) 0.2 ml を, 室温 10 min 放置, 3.6×10^{-3} M *p*-nitrophenyl phosphate 0.1 ml を加え, 37° 30 min 保温, 0.2N NaOH 2.0 ml を加えて, 405 nm で測定.

N-Acetyl- β -D-glucosaminase—Woolen らの方法にしたがった.⁸⁾ 酵素は鈴木らの方法⁹⁾ にしたがってラット肝臓より精製し, さらに Sephadex G-200 によりゲル濾過して, β -glucuronidase と分離した分画を用いた.

以上の各種酵素にたいする阻害物質による阻害作用測定は, あらかじめ酵素と阻害物質 (分画 6) を混合して, 各々, 10 min 保温混合後, 基質を加えて, 測定した.

結 果

熱安定性

モルモット尿および透析尿 (分画 1) を 50°, 70°, 100° そして 120° pH 5.2 で 30 min, 加熱したが, β -glucuronidase 阻害率にはほとんど変化は認められなかった (Fig. 1).

Fig. 1 Effect of Temperature on the Inhibitory Activity of the Dialysate (●) and of Guinea-Pig Urine (○)

Dialysate (6.0 μ g/ml) in 0.125M acetate buffer (pH 5.2). These values plotted in figure represent the averages of duplicate determinations in three separate experiments.

Fig. 2. Effect of Temperature on the Inhibitory Activity of β -Glucuronidase Inhibitor

○—: 37°, ●—: 50°, △—: 100°, ▲—: 150°; 0.6 μ g of fraction 6 in 1.0 ml of 0.5M acetate buffer, pH 5.2

5) P.S. Robert, *J. Biol. Chem.*, **232**, 285 (1958).

6) V.H. Beavon, J.V. Pierce, J.J. Pisano, *Clin. Chem. Acta*, **32**, 67 (1971).

7) ヒト尿 kallikrein は Pierce 博士から得た.

8) J.W. Woolen, R.Heyworth, P.G. Walker, *Biochem. J.*, **78** 111 (1961).

9) 鈴木伊豆美, 櫛田透雄, 志田半三郎, 生化学, **40**, 838 (1968).

つぎに、モルモット尿から分離精製した阻害物質（分画 6）を酢酸緩衝液中（pH 5.2）で 37°, 50°, 100° そして 150° で 4 hr 加熱して、150° でわずかに失活が認められたが、他の条件ではほとんど著しい失活は認められなかった（Fig. 2）。

pH の影響

精製した阻害物質（分画 6）の β -glucuronidase に対する阻害作用を、pH 3.6—7.0（0.5M AcOH-NaOH 緩衝液）で測定したところ、Fig. 3 に示すように、阻害率は pH 5.0 において最高値を示した。これは、透析尿（分画 1）のそれとも一致している。

β -Glucuronidase と非透析性 β -Glucuronidase 阻害物質との阻害関係

透析尿（分画 1）中の非透析性 β -glucuronidase 阻害物質と β -glucuronidase との阻害関係を Lineweaver-Burk¹⁰⁾ ならびに Dixon¹¹⁾ の方法によりプロットして得

Fig. 3. Effect of pH on the Inhibitory Activity of β -Glucuronidase Inhibitor

—○—: fraction 1 (4.0 μ g/ml), —●—: fraction 6 (0.3 μ g/ml) (in 0.5M acetate buffer)

Fig. 5. Dixon's Plot for Interaction of the Dialysate and Phenolphthalein mono- β -D-glucuronide (PMC) with β -Glucuronidase

$S_1 = 3 \times 10^{-4}$ M (PMG), $S_2 = 2 \times 10^{-4}$ M (PMG), $k_i = 7.1$ μ g/ml, V_i : Velocity expressed as amount of phenolphthalein liberated per ml per hr

Fig. 4. Lineweaver-Burk's Plot for Interaction of the Dialysate and Phenolphthalein mono- β -D-glucuronide with β -Glucuronidase

●: in the presence of the dialysate (7.3 μ g/ml), ○: in the absence of inhibitor, Velocity expressed as amount of phenolphthalein liberated per ml per hr at pH 5.2 (0.2M acetate buffer) $V_{max}/V_p = 1 + i/k_i$, $1/V_{max} = 0.038$, $1/V_p = 0.076$, $k_i = 7.3$ μ g/ml

Fig. 6. Dixon's Plot for Interaction of β -Glucuronidase Inhibitor (fraction 6) and Phenolphthalein β -D-glucuronide (PMG) with β -Glucuronidase

$S_1 = 3.0 \times 10^{-4}$ M (PMG), $S_2 = 1.5 \times 10^{-4}$ M (PMG); $k_i = 0.6$ μ g/ml (in 0.2M acetate buffer, pH 5.2)

10) H. Lineweaver, D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 653 (1934).

11) M. Dixon, *Biochem. J.* **55**, 170 (1953).

TABLE I. Inhibitory Effects of Fraction 6 on Proteinases and Lysosomal Enzymes

Enzyme	Added fraction 6 ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition ratio (%)
Kallikrein	7.0—20.0	0
Pronase-P	7.0—20.0	0
Trypsin	7.0—20.0	0
Papain	7.0—20.0	0
N-Acetyl- β -D-glucosaminidase	7.0—20.0	0
Acid phosphatase	7.0—20.0	0
β -Glucuronidase	0.3	50

TABLE II. Inhibitory Effects of Fraction 6 on Various β -Glucuronidases

Sources	Added fraction 6 ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition ratio (%)
<i>Helix pomata</i>	7.0—20.0	0
<i>Patella vulgata</i>	7.0—20.0	0
<i>Escherichia coli</i>	7.0—20.0	0
Preputial gland	0.6	50
Calf liver	0.3	50

られた, k_i 値 (おののおの 7.3 および 7.1 $\mu\text{g/ml}$) よく合致した。

これらのプロットより明らかなように, この阻害物質は β -glucuronidase に対し非拮抗的阻害作用を示す。

また, Fig. 6 に示すように, 分画 6 と β -glucuronidase との関係を, 分画 1 と同様に, Dixon のプロットをすると, k_i 値は前報¹⁾ですでに記したように 0.54 $\mu\text{g/ml}$ で, 透析尿 (の分画 1) のその 13 倍であった。そしてその阻害様式は透析尿と同様, β -glucuronidase に対し非拮抗的阻害作用を示した。

蛋白質分解酵素およびリソゾーム酵素活性に対する分画 6 の影響

分画 6 による β -glucuronidase 阻害が非拮抗的であり, したがって, 分画 6 のモルモット尿中からの分離精製過程で用いた蛋白分解酵素, プロナーゼ-P, トリプシンおよびパパイン, さらにヒト尿カリクレイン, そして β -glucuronidase と同じくリソゾーム酵素である acid phosphatase および N-acetyl β -D-glucosaminidase に対しても分画 6 が阻害作用を示すか否かを検討した。Table I に示すように, 分画 6 は β -glucuronidase 以外の上記酵素に対しては阻害作用を示さなかった。また哺乳類の β -glucuronidase 以外にたいしても阻害作用を示さなかった。

酸性ムコ多糖体と分画 6 との比較

Cetylpyridinium Chloride 沈殿 Schiller らの方法を用いて, 透析尿 (分画 1) および分画 3 (前報に記したように分画 1 から Tamm-Horsfall mucoprotein を除去した後, Sephadex G-50 でゲル濾過して得られた分画) から cetyl pyridinium 複合体の沈殿を得た。これを 2.5M NaCl で溶出し, 透析した分画は, β -glucuronidase 阻害作用をもっている。分画 6 も同様であった。

電気泳動 Fig. 7 (a) と (b) に示すように, 分画 1 と分画 6 の電気泳動像は, 生体内に存在する酸性ムコ多糖体である, heparin, chondroitin sulfate A, C と B および hyaluronic acid とは明らかに相違する。

Fig. 7. Electrophoresis of Fraction 6, Dialysate and Acid Mucopolysaccharides

(a): paper; (b): cellulose acetate (a): 0.1M borate buffer (pH 10); (b) 0.56M HCOOH-1.0M pyridine (pH 3.0)
stain: alcian blue; ponceu 3R; β -glucuronidase inhibition
1: dialyzate, 2: fraction 0, 3: heparin, 4: chondroitin sulfate, A C, 5: chondroitin sulfate B, 6: hyaluronic acid

TABLE III. Comparison of the Inhibitory Activity on β -Glucuronidase of Acid Mucopolysaccharides and Fraction 6

Substance	Inhibition ratio (%)	
	40 μ g/ml	0.3 μ g/ml
Chondroitin sulfate A	5	0
Chondroitin sulfate B	11	0
Chondroitin sulfate C	0	0
Heparin	15	0
Hyaluronic acid	5	0
Fraction 6	100	50

阻害作用 分画 6 と酸性ムコ多糖体の β -glucuronidase 阻害作用の程度を Table II に示した. 分画 6 の阻害率は 0.3 μ g/ml で 50%, 酸性ムコ多糖体のそれは 0.3 μ g/ml で 0% であった. 最も強力な heparin の阻害率も 40 μ g/ml の濃度でわずかに 15% であった.

考 察

モルモット尿中の非透析性 β -glucuronidase 阻害物質は, 原尿中, 透析尿中および分離精製した阻害物質, いずれも熱に安定であった. また, これらの β -glucuronidase に対する阻害作用の強さは, pH 5.0 で最高値を示した. この値は β -glucuronidase の至適 pH と一致する点で興味がある. また, 分画 1 と分画 6 と β -glucuronidase との阻害様式がいずれも非拮抗的であったことから考えて, 前報¹⁾ で記したと同様に, 原尿中の阻害物質が全く変化を受けずに分離精製されたといえる.

つぎに, 例数は少ないが, 分画 6 を精製する際に用いたプロナーゼ-P, trypsin, パパインおよび Kallikrein などの蛋白分解酵素およびリソゾーム酵素の酵素活性にたいして, 分画 6 は阻害作用を示さなかった. 他方, β -glucuronidase も哺乳動物由来の酵素に対してその活性を阻害するが, バクテリアおよび軟体動物由来の β -glucuronidase に対しては阻害作用を示さなかったこの事実は, 分画 6 は β -glucuronidase にたいしてかなり特異的な阻害物質であることを示しているものと考えられる.

モルモット尿中の β -glucuronidase 阻害物質 (分画 1—分画 6) は cetylpyridinium chloride で沈殿するところから, この阻害物質が酸性のムコ多糖体と考えられた. 他方, 従来, 酸性のムコ多糖体の中に β -glucuronidase に対し非拮抗的阻害作用を示すものが知られており,¹⁰⁾ それらの β -glucuronidase の阻害率を分画 6 と比較したところ, 分画 6 は, 最も強力な heparin の約 400 倍もの強さを示した. また, これら酸性のムコ多糖体と分画 6 とは電気泳動像で相違することから推察して, 明らかに分画 6 は, 従来知られている, β -glucuronidase 阻害物質である酸性のムコ多糖体とは異なる物質と考えられる.

以上の性状から考えて, モルモット尿中の非透析性 β -glucuronidase 阻害物質は, Conzelman¹¹⁾ がウサギ尿, Abul-Fadl¹²⁾ がヒト尿中に認めたものと類似した性状をもつ物質で酸性のムコ蛋白に関係した物質と考えられる.

また, 前報¹⁾ に示したように, このような非透析性 β -glucuronidase 阻害物質含有尿中のグルコ糖酸を Marsh¹³⁾ らが行った酵素法¹⁾ で定量することは明らかに無理があるといわねばならない.

10) B. Becker, R.D. Marshall, A. Neuberger, *Biochem. J.*, **87**, 274 (1963).

11) G.M. Conzelman, Jr., D.W. Crout, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **107**, 372 (1961).

12) M.A. Abul-Fadl, *Biochem. J.*, **65**, 16 (1957).

13) C.A. Marsh, *Biochem. J.*, **86**, 771 (1963).