

# アノイリナーゼに関する研究

佐藤 雅子

## Studies on Aneurinase

Masako SATO

### 序 論

魚のアノイリナーゼに関してすでに研究は行われている<sup>1)2)3)</sup>が、その生理作用はまだ明らかでない。そこで生理作用を明らかにするに先立ち、まずコイの腎臓、肝臓、筋肉中のアノイリナーゼについて一般諸性質を比較検討したのでここに報告します。

### 実 験 方 法

#### 1) 試料の調整

コイの組織の一定量を乳鉢で磨碎し水を加えて混和後、一定量に稀釈し、濾過して浸出液を得た。稀釈はふつう腎臓では70倍、鰓：50倍、肝臓：20倍、筋肉、卵巣、眼球では10倍浸出を行った。

#### 2) アノイリナーゼ活性の測定法

アノイリナーゼ活性の測定は $B_{12}$ 分解量<sup>1)4)</sup>から求めた。即ち上記のように調整した浸出液5ccに緩衝液4cc / 1mg%  $B_{12}$ 液1cc (10 $\gamma$ ) 添加し、一定時間、一定温度で反応させた後、10%メタリン酸5ccで反応を停止した。4M酢酸ナトリウムでpH 4.5に補正後、水で20ccとし、口過して上清の一定量を取りチオクロム法<sup>5)</sup>により残存 $B_{12}$ 量を測定した。対象には浸出液のかわりに水を加え同様の操作を行い残存 $B_{12}$ 量を求め、前者の差から $B_{12}$ 分解量を求めた。

アノイリナーゼ活性単位<sup>1)</sup>はpH 6.8, 50°Cで15分間に $B_{12}$  10 $\gamma$ を分解する量を組織湿量1gについて求めた。 $B_{12}$ 分解量は組織により異なるが、添加 $B_{12}$ を50 $\pm$ 35%分解する値から算出した。

### 実 験 結 果

#### 1) 反応時間と $B_{12}$ 分解量

コイの腎臓、肝臓、筋肉の浸出液について酵素濃度を1, 2, 4倍と変化し、50°Cで8分, 15分, 30分, 60分, 120分間反応させ、 $B_{12}$ 分解量を求めた。

その結果は表1に示すように、いずれの組織についても、反応時間の経過につれて $B_{12}$ 分解量は多くなり、15分又は30分の反応では、 $B_{12}$ 分解量は酵素濃度に大体比例することがわかった。

表 1 反応時間と B<sub>1</sub> 分解量 (r)

組 織	反応時間(分)		8	15	30	60	120
	稀釈倍数						
腎 臓	30		5.56	9.80	9.83	10.00	10.00
	60		2.88	5.60	9.70	9.70	9.86
	120		2.37	4.82	5.48	7.99	9.19
肝 臓	10		3.20	4.86	8.00	8.80	9.06
	20		2.92	3.00	3.97	5.32	6.48
	40		2.92	2.85	2.23	2.55	4.07
筋 肉	5		0.11	2.56	2.44	2.05	1.98
	10		0.10	1.85	2.26	1.57	2.10
	20		0.08	1.61	1.67	1.90	2.09

反応条件により腎臓、肝臓の浸出液では、添加 B<sub>1</sub> は 100 % 近く分解されるが、筋肉では 30 % 以上の分解は認められなかった。

## 2) 酵素液の安定性

コイの腎臓、鰓、肝臓、筋肉の浸出液を浸出後 0, 4, 8, 12, 24 時間室温 (25°C) に放置後、B<sub>1</sub> 10 r を添加し、50°C で 15 分間反応させ B<sub>1</sub> 分解量を求めた。

その結果は表 2 に示すように、肝臓、筋肉の浸出液は 8 時間以上の放置ではやや不安定であるが、腎臓、鰓の浸出液は 12 時間放置でもかなり安定していることがわかる。いずれの浸出液も浸出後 4 時間まではきわめて安定している。

表 2 酵素液の安定性

組 織	放置時間(時間)		0	4	8	12	24
	分解量 (r) 分解比 (%)						
腎 臓	分解量 (r)		8.04	7.78	7.59	5.86	2.21
	分解比 (%)		100	97	95	73	28
鰓	分解量 (r)		7.08	7.22	6.86	6.25	2.96
	分解比 (%)		100	102	97	88	42
肝 臓	分解量 (r)		5.29	5.33	2.16	2.50	0.83
	分解比 (%)		100	101	41	57	16
筋 肉	分解量 (r)		2.50	2.62	1.67	0.90	1.13
	分解比 (%)		100	105	64	36	45

## 3) 至適 pH

コイの腎臓、肝臓、筋肉の浸出液に種々の pH のペロナル緩衝液を加え、B<sub>1</sub> 10 r 添加し、50°C 15 分間反応させ、分解 B<sub>1</sub> 量を求めた。対象には浸出液のかわりに水を加え同様の操作を行った。

その結果は表 3 に示すように、至適 pH 6.8 であることがわかった。

pH 1~2 では B<sub>1</sub> はほとんど分解されないが、pH 8~9 では B<sub>1</sub> 分解量はかなり多い。

pH 8~9 では筋肉の B<sub>1</sub> 分解量は 0 であるが、これはこの pH で B<sub>1</sub> は全く分解されなかつ

表 3 至 適 pH

組織	pH	1.2	2.2	4.3	5.1	6.0	6.8	7.3	8.5	9.0
		腎臓	分解量 (r) 分解比 (%)	0 0	1.35 17	3.67 47	5.75 73	6.41 81	7.88 100	7.63 97
肝臓	分解量 (r) 分解比 (%)	0 0	0 0	5.02 85	4.95 84	4.91 84	5.88 100	3.63 62	3.81 65	3.37 57
筋肉	分解量 (r) 分解比 (%)	0 0	0 0	0.81 36	1.53 67	1.47 65	2.27 100	2.05 90	0 0	0 0
対象	分解量 (r)	0	0	0	0	0	0	0.90	1.71	2.47

たのではなく、 $B_1$  分解量を対象実験との残存量の差であらわすために筋肉の残存量が対象よりも大きく従って分解量は 0 になる。

酢酸、及びリン酸緩衝液について同様の実験を行ったが、緩衝液による相異は認められなかった。

#### 4) pH に対する安定性

各組織の浸出液に種々の pH のペロナール緩衝液を加え室温に放置しないもの、60 分間放置したものについて、 $B_1$  10 r 添加し、50°C で 15 分間作用させ、対象実験との差から  $B_1$  分解量を求めた。分解比は pH 6.8 の緩衝液を加え室温に放置しないものの  $B_1$  分解量を 100 としそれに対する割合で表した。

その結果は表 4 に示すように、いずれの組織の浸出液でも、pH 6.8 で  $B_1$  分解量は多く、従ってこの pH で酵素は最も安定していることがわかる。pH 8~9 でもかなり安定している。但し筋肉では  $B_1$  分解量が小さくその傾向をみることは出来なかった。

表 4 pH に対する安定性

組 織	放置時間 (分)	pH									
		2.2		5.3		6.8		8.5		9.0	
		分解量 (r)	分解比 (%)								
腎 臓	0	0.10	1	5.03	54	9.29	100	8.29	89	7.53	81
	60	0.23	2	4.93	53	8.41	91	8.29	89	7.53	81
肝 臓	0	0.50	2	1.54	69	2.22	100	2.57	116	1.83	82
	60	0	0	1.13	51	1.81	81	1.78	80	0.87	39
筋 肉	0	0.08	2	0.29	64	0.45	100	0	0	0	0
	60	0.09	2	0.50	110	0.66	147	0	0	0	0
対 象	0	0	—	0	—	0	—	1.71	—	2.47	—

#### 5) 至適温度

コイの腎臓、肝臓、筋肉の浸出液に  $B_1$  10 r 及び pH 6.8 緩衝液を加え、種々の温度で 15 分間反応させ  $B_1$  分解量を求めた。

その結果表 5 に示すようにこれらの組織のアノイリナーゼの至適温度は 50°C であった。

表 5 至 適 温 度

組 織	温度°C	24	40	50	65	80
		腎 臓	分解量 (r) 分解比 (%)	9.03 92	9.71 99	9.83 100
肝 臓	分解量 (r) 分解比 (%)	1.00 45	1.45 66	2.19 100	1.67 76	0.60 26
筋 肉	分解量 (r) 分解比 (%)	1.12 56	0.69 35	2.00 100	0.65 32	0 0

## 6) 温度に対する安定性

腎臓、肝臓、筋肉の浸出液を種々の温度に15分間放置後、冷却し、直ちに  $B_1$  10r 及び pH 6.8 の緩衝液を加え 50°C で15分間反応させ  $B_1$  分解量を求めた。

その結果は表6に示すように、筋肉ではやや弱い、各組織中の酵素は50°Cの熱処理までは、かなり安定していることがわかる。65°C、80°Cの熱処理で筋肉中の酵素は不活性化されるが、腎臓、肝臓ではこれらの温度の熱処理ではまだ酵素活性を保っている。

表 6 温度に対する安定性 (I)

組 織	温度°C	24	40	50	65	80
		腎 臓	分解量 (r) 分解比 (%)	7.28 100	7.07 97	7.10 98
肝 臓	分解量 (r) 分解比 (%)	1.72 100	1.72 100	2.00 116	0.60 35	0.22 13
筋 肉	分解量 (r) 分解比 (%)	0.91 100	0.91 100	0.21 3	0.30 3	0 0

そこで、更に温度を高くし各組織を100°Cで、8分及び15分間加熱したものについて、同様の実験を行った。その結果は表7に示すように、筋肉、眼球の酵素は100°C 8分の熱処理で酵素活性を完全に失ってしまうが、腎臓、鰓、肝臓では  $B_1$  分解が認められた。これらの組織中の酵素は熱に対してかなり強いものと思われる。

表 7 温度に対する安定性 (II)

組 織	加 熱	100°C, 8分		100°C, 15分	
		残存量 (r)	分解量 (r)	残存量 (r)	分解量 (r)
腎 臓	鰓	9.05	0.95	9.63	0.37
		9.15	0.85	9.50	0.50
肝 臓	鰓	9.47	0.53	9.95	0.05
筋 肉	鰓	10.00	0	10.00	0
眼 球	鰓	10.00	0	10.00	0

7) 塩基による促進効果<sup>2) 6)</sup>

コイの組織について、ピリジン無添加のもの、ピリジン最終濃度  $10^{-2}M$ ,  $10^{-3}M$ ,  $10^{-4}M$  となるように添加したものを、 $50^{\circ}C$  で 15 分間反応させ、 $B_1$  分解量を求めた。

その結果は表 8 に示すように、いずれの組織の浸出液についても、ピリジン添加はピリジン無添加よりも  $B_1$  分解量は多く、ピリジン濃度が高い程、 $B_1$  分解量も多い傾向がみられた。ピリジンの促進効果をピリジン無添加の  $B_1$  分解量を 100 としそれに対する分解比で比較してみると、ピリジン添加により酵素活性は 2~3 倍高められることがわかる。

表 8 塩基による促進効果

組 織	ピリジン濃度				
		$10^{-2}M$	$10^{-3}M$	$10^{-4}M$	0
腎 臓	分解量 (r)	6.26	5.80	5.13	2.80
	分解比 (%)	217	202	178	100
鰓	分解量 (r)	7.92	8.28	6.44	3.48
	分解比 (%)	228	237	185	100
肝 臓	分解量 (r)	2.30	1.34	1.50	1.56
	分解比 (%)	147	86	100	100
卵 巣	分解量 (r)	3.91	3.85	2.24	1.35
	分解比 (%)	290	285	166	100
筋 肉	分解量 (r)	2.96	3.50	1.81	1.70
	分解比 (%)	174	206	107	100
対 象	分解量 (r)	149	106	100	0

## 8) アノイリナーゼの分布及び強さ

フナ及びコイの組織の浸出液に  $B_1$   $10r$  を添加し、 $pH$  6.8,  $50^{\circ}C$  で 15 分間反応を行い、分解する  $B_1$  量を求めこれに稀釈倍数を乗じてアノイリナーゼの強さとした。

この結果は表 9 に示すように、アノイリナーゼはフナ及びコイの組織に広く分布していることがわかった。アノイリナーゼの強さは組織により異なり、腎臓で最も強く、鰓、肝臓、眼球などでもかなり強い。これに対して筋肉、卵巣などは比較的弱い。

魚の大きさによるアノイリナーゼの強さを比較したが、体重 10 g 前後の一年魚、500 g 前後の

表 9 アノイリナーゼの分布及び強さ [An(U/g)]

種 類	組織 体重 (g)	組 織						
		腎 臓	鰓	肝 臓	筋 肉	眼 球	卵 巣	精 巣
コ イ	10	584	318	224	36.5	116	—	—
	100	466	283	159	13.1	89	—	—
	250	284	92	118	18.5	105	13.5	—
	300	356	106	92.7	9.8	72	—	20.8
	500	350	196	83.6	39.6	64	37.6	—
フ ナ	2	280	206	58.4	7.7	21.3	—	—
	150	450	160	69.2	6.0	36.4	—	21.6
	500	479	176	50.7	8.5	54.3	26.8	—

3～4年魚の間に、大きさの相異による違いは認められなかった。

同一組織でも個体により、アノイリナーゼの強さに、かなりの相異が認められた。

フナの組織のアノイリナーゼでも同じような結果が得られたが、総じて、コイの組織のアノイリナーゼの方がフナよりも強い傾向がみられた。

実験条件は異なるが、これらの結果を藤田氏の報告と比較する<sup>1)3)</sup>と、フナの眼球にも明らかにアノイリナーゼが認められる点を除けば、大体同じような傾向であった。

## 考 察

アノイリナーゼは淡水魚の組織に広く分布しており、その強さは組織により異なる。

コイの腎臓、肝臓、筋肉について一般の諸性質を調べた結果、いずれの組織も至適 pH、至適温度、塩基の促進効果など同じような傾向を示したが、pH、温度、塩基の効果に対する挙動をみると、かなり異なる。腎臓の浸出液では、酵素濃度はきわめて低いにもかかわらず、アルカリの pH、熱処理に対してかなり安定しており、添加 B<sub>1</sub> をほとんど 100% 分解する。これに対し筋肉では、酵素濃度を高くし、あるいは反応時間を長くし、又塩基を添加しても、B<sub>1</sub> 分解量は、約 20% 前後であり、最も分解の大きい場合でも添加 B<sub>1</sub> の 40% 程度を分解するにとどまる。肝臓ではちょうど腎臓と筋肉の中間の性質を示した。酵素液が精製していない粗酵素の段階であるために明らかではないが、これら組織のアノイリナーゼの性質の相異は単に酵素活性の強弱によるものか、あるいは構造的に異なるのか、アノイリナーゼの生理作用とも関連させて検討を加えていきたい。

## 結 論

コイの腎臓、肝臓、筋肉の浸出液について B<sub>1</sub> 分解量からアノイリナーゼの性質を調べた結果、

- 1) 至適 pH 6.8 であり、pH 1～2 では B<sub>1</sub> はほとんど分解されず、pH 8～9 ではかなりの B<sub>1</sub> が分解される。
- 2) アルカリの pH に対してかなり安定している。
- 3) 至適温度 50°C である。
- 4) 50°C までの熱処理で酵素は安定であるが、それ以上の熱処理では酵素活性は減少する。腎臓では、100°C の熱処理後も約 10% の B<sub>1</sub> を分解する。
- 5) ピリジン添加により酵素反応は促進される。
- 6) 淡水魚の組織にアノイリナーゼは広く分布しており、その強さは腎臓で最も強く、鰓、肝臓、眼球でもかなり強い、筋肉、卵巣などは比較的弱い。

本実験にあたり御指導を賜った京都大学医学部藤原元典教授、井上喜久子夫人に深甚の謝意を表します。

## 文 献

- 1) 藤田, 小塚, 山崎, 上西, 長谷川: 生化学 **22**, 207 (1950)
- 2) 小塚駿一: 生化学 **23**, 154 (1951)
- 3) 藤田秋治: ビタミン **7**, 1 (1954)
- 4) 村田希久: 酵素研究法 **2**, 757 (1956)
- 5) 藤原元典: ビタミン**9**, 148 (1955)
- 6) Akiji Fujita, Yoshitsugu Nose, Shunichi Kozuka, Toshio Tashiro, Kiyoshi Ueda & Sadahito Sakamoto: J. Biol. Chem. **196**, 289 (1952)