

Tyrosine iodinase に関する研究

—その Cofactor の存在について—

金沢大学医学部第二病理学教室(主任 石川大刀雄教授)

須山 忠 和

(昭和35年3月29日受付)

甲状腺ホルモンの有効主成分が特異的な有機ヨウ素化合物であることは、既に前世紀の末より知られていたが、1919年、Kendall¹⁾により、甲状腺から有効物質サイロキシンが単離され、更に1926年、Harington²⁾が甲状腺の特異蛋白であるサイログロブリンを加水分解することにより、サイロキシンを単離し、その構造決定を行つた。以来ごく最近まで20年余りもの間、これが唯一の甲状腺ホルモンと考えられていたが、近年に至り、放射性ヨウ素 I¹³¹ によるトレーサー技術の導入、クロマトグラフィーによる微量分析技術の発展により、サイロキシンの数倍強力なホルモン活性を有するトリヨードサイロニンがサイログロブリンの加水分解物中に発見されて³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾、この方面の研究はにわかに活気を呈してきた。

一方、甲状腺ホルモン生合成の機構は、最初にサイロキシンが単離されるや、甲状腺生化学の主要目的の一つとなつていた。しかるに現在、その機構の基礎的な問題は依然として解明されたとはいふ難い状態にある。

すなわち、血中のヨウ素 (I⁻) は甲状腺に摂取、濃縮され、腺内でそれは甲状腺中の蛋白のチロシン基と反応して、モノヨードチロシン、ジヨードチロシン、更にサイロキシンにまで合成されるのであるが、この生合成過程におけるチロシンのヨウ素化は、従来多くの人々により、酸化酵素系の関与する I⁻→I₂ の反応と、非酵素的なチロシンのヨウ素化との二段階で行われると考えられていた¹⁰⁾¹¹⁾。

最初の段階において Westerfeld¹²⁾ はペルオキシダーゼの関与を考えたし、Dempsey¹³⁾¹⁴⁾ も甲状腺内にオキシダーゼ活性とペルオキシダーゼ活性の存在することを細胞化学的に証明し、ペルオキシダーゼ活性は濾胞細胞内に認められるとした。同様な方法で、De Robertis 等¹⁵⁾ は、チトクローム・オキシダーゼ活性

の存在を認めた。又 Harington¹⁶⁾¹⁷⁾ は酸化酵素系が I⁻→I₂ を触媒し、その後 I₂ が酸化作用を持つ物質として、チロシンをモノヨードチロシン、ジヨードチロシンにかえ、サイロキシンを合成する酸化過程に働くとした。

更に第二の段階として、ヨウ素の有機化においては、Schachner¹⁸⁾ はジヨードチロシンもサイロキシンも共にチトクローム・オキシダーゼ系が関与する好氣的酸化により形成されるとした。このように諸家の説はまちまちで一見相容れないものがあり、その是非を論じ難い状態にある。

ところが一方、生化学的な検索 (in vitro) において、Chaikoff¹⁹⁾²⁰⁾ は甲状腺組織切片を用いれば、I⁻を有機的な結合に導くことが出来るが、組織を破壊してホモジェネートにすれば、その能力を失うことをみた。1953年に至り、Weiss²¹⁾ は甲状腺ホモジェネート及びミトコンドリアによる有機ヨウ素形成に Cu²⁺ とチロシンの添加が必須であることから、銅酵素が、甲状腺組織によるチロシンのヨウ素化に関与するらしいと考えた。別に Wyngaarden²²⁾ は、I⁻ が、ペルオキシダーゼにより酸化され、Cu²⁺ により反応を促進するとしている。

ところが、Fawcett & Kirkwood²³⁾ は、Weiss の甲状腺ホモジェネートによる有機ヨウ素の形成に際し、チロシンを加えての Cu²⁺ の役割について、その解釈を疑つた。彼等は甲状腺組織中にチロシンをヨウ素化する酵素 “Tyrosine iodinase” の存在を提唱し²⁴⁾、Cu²⁺ は単に I⁻→I₂ を非酵素的に酸化する作用を有するのみで、酵素はチロシン水酸基の解離を促してヨウ素化を容易にすると考えた。更に彼等の実験条件の下で出来る有機ヨウ素化合物は遊離態のモノヨードチロシンが唯一のものであつたので、その酵素は、加えられたチロシンの monoiodination のみを触媒す

Studies on the Tyrosine Iodinase —On the finding of its Cofactor—. Tadakazu Suyama, Department of Pathology (Director : Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, University of Kanazawa.

るとした。しかも Cu^{2+} かチロシンか。どちらか一方を加えなければ、甲状腺ホモジェネートは有機ヨウ素をほとんど生成せず、蛋白分子内のチロシン残基をもヨウ素化しなかつた。

その後、Taugog 等²⁹⁾は甲状腺ホモジェネート、あるいは、ミトコンドリアでの有機ヨウ素形成には、 Cu^{2+} 及びチロシンの添加は必要でなく、ただその際とり入れられたヨウ素は、遊離態モノヨードチロシンではなく、蛋白に結合したモノヨードチロシン中に見いだされ、甲状腺蛋白を水解することによつてのみ遊離され、ペーパー・クロマトグラフィーで確認出来るとした。更に甲状腺ミトコンドリア分屑の有機ヨウ素形成反応は、Flavine mononucleotide (FMN) の添加で著しく増強せられ、それは本質的にこの反応が酵素的であるという証拠となると結論した²⁹⁾。

しかし現在まで、この酵素“Tyrosine iodinase”の単離・精製はほとんど進んでおらず、又、オキシダーゼとの分離も行われていないので、その存在すら確実に立証されたとはいひ難い。その反応機作も全く不明である。

われわれ教室同人は、かねてより甲状腺内ヨウ素代謝研究の一環として、その複雑な一連の代謝現象を組立てている個々の単位反応を解析すべく、既に数回にわたり成果を発表した²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾。

この報告では、ヨウ素有機化反応における酵素“Tyrosine iodinase”に必須の Cofactor の発見、抽出、単離等につき、著者の得た実験成績を述べ、更にその反応機作並びに酵素反応に影響を与える二三の条件につき、検討・考察をすすめたと思う。

実験材料並びに実験方法

1) 酵素材料並びに酵素抽出法

酵素材料としては、比較的大量に入手容易で、その上、酵素を高濃度に分布すると思われるウシ顎下腺を用いる。

屠殺場にて得たウシ顎下腺を氷冷しつつ持ち帰り、 -20°C の冷凍箱中に一昼夜放置して凍結する。これを一旦融解した後、用手的に脂肪、結合組織、被膜等を可及的に除去し、顎下腺実質をハサミにて細切する。抽出用緩衝液として 0.05M 酢酸ソーダ 1000ml を用い、顎下腺約 300gr を数回に分け、薄粥状になる程度に waring blender にて磨砕する (0°C に氷冷しつつ)。粥状となつたホモジェネートを重湯煎にて熱処理を行う。熱処理操作はまず水浴の温度を約 70°C にしておき、顎下腺粥をホーロー引きピーカーに $\frac{2}{3}$ 程度の量に入れ、激しく攪拌しながら水浴につけて加熱

する。顎下腺粥が 60°C に達するや直ちに水浴に水を加えて $60^{\circ}\sim 65^{\circ}\text{C}$ の間になし、時々攪拌しつつ5分間放置する。後、直ちに流水で冷却する。次いで、粗大残渣をガーゼ二枚にて圧縮濾過して除く。更に 4000rpm 、10分間遠心してその上清を、ペーパー・バルブを用いて吸引濾過を行えば、帯赤黄色の比較的透明、やや粘稠なる濾液を得る。その濾液を予め作つておいた約 $\frac{1}{2}$ 量のリン酸カルシウムゲルと混合し、10分間攪拌放置して酵素蛋白をゲルに吸着させた後、 4000rpm 、10分間遠心して、吸着カルシウムゲル上清と、吸着カルシウムゲルとに分ける。

a) 粗酵素液 (γ -Holo 酵素)；その吸着カルシウムゲルから 0.3M 硫酸を含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 $\text{pH } 7.4$ 、 150ml にて溶離・遠心して γ -Holo 酵素を得る。これは顎下腺中に存在する阻害物質が除かれており、季節的変動を示さない一定の活性を有する酵素標品として種々の酵素反応解析に使用し得る。この過程は、教室の鈴木が詳細に検討している²⁸⁾。

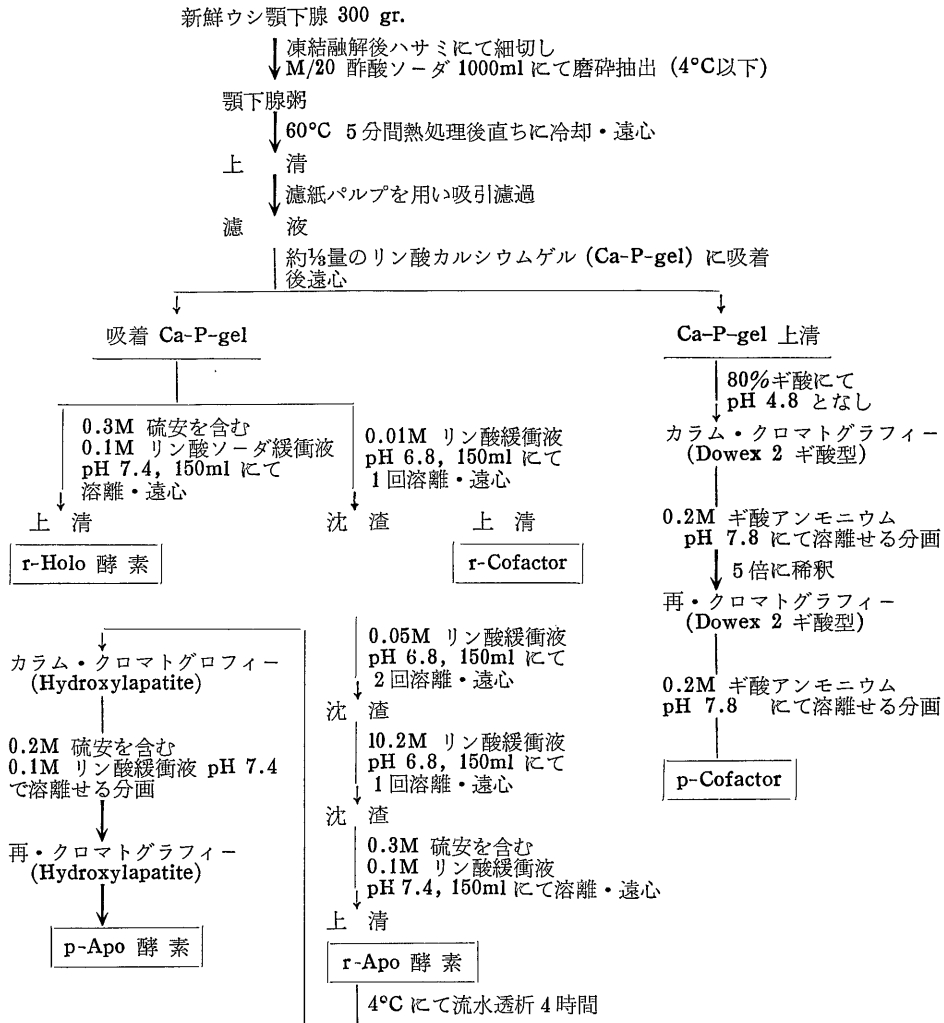
b) 粗酵素蛋白液 (γ -Apo 酵素)を得る目的で、吸着カルシウムゲルより、分散吸着法 (Batchwise 法) にて混在せる共存蛋白質を除去すべく、 $\text{pH } 6.8$ 、 0.01M リン酸緩衝液 150ml にて1回溶離・遠心、沈渣を $\text{pH } 6.8$ 、 0.05M リン酸緩衝液 150ml にて2回溶離・遠心、その沈渣を、 $\text{pH } 6.8$ 、 0.2M リン酸緩衝液 150ml にて1回溶離・遠心、更にその沈渣を、 $\text{pH } 7.4$ 、 0.3M 硫酸を含む 0.1M リン酸緩衝液 150ml にて溶離・遠心しその上清を γ -Apo 酵素とする。

c) 精製単一蛋白酵素液 (ρ -Apo 酵素)は γ -Apo 酵素液を 4°C にて流水透析4時間後、Hydroxylapatite³¹⁾ にてカラム・クロマトグラフィーを行い、 $\text{pH } 7.4$ 、 0.2M 硫酸を含む 0.1M リン酸緩衝液で溶離せる活性分画を、更に Hydroxylapatite で再クロマトグラフィーを行つた溶離液の $275\text{m}\mu$ 紫外部吸収の高い部分をとる。この過程については、教室の渡辺が詳細に実験・検討を行つている³²⁾。

d) Cofactor を単離すべく、吸着カルシウムゲル上清を Dowex 1 ($\times 2$)、Dowex 2 ($\times 8$) 等の陰イオン交換樹脂でカラム・クロマトグラフィーを行い、Cofactor を多量に含む液を得る。これを更に、再クロマトグラフィーすることにより精製し、 ρ -Cofactor とする。これについては第3章で詳細に検討する。

なお、上述の抽出・精製過程の概略を別表にて示す。

酵素抽出過程において吸着に用いられるリン酸カルシウムゲルは、文献的に種々の方法が提案されているが^{33) 34)35) 36) 37) 38)}、ここでは、乳酸脱水素酵素の吸着



に用いられた方法³⁸⁾を少しく変えて調製する。すなわち、15%リン酸二ナトリウム液 100ml ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を使用)、及び、10%塩化カルシウム液 100ml をはげしく攪拌しながら加え、濃アンモニア水にて pH を 8.6~8.8 に調整する。生じたリン酸カルシウムゲルを約 40 ㎖ の蒸留水でアンモニア臭のなくなるまで数回、傾斜法にて洗った後、約 30 ㎖ の蒸留水に懸濁し、4°C に貯える。ゲルは 1 日以内に使用する。

2) カラム・クロマトグラフィー

ここで用いられるカラム操作としては、Cofactor の確認に用いられる吸着クロマトグラフィーと、精製・単離に用いられるイオン交換クロマトグラフィーとである。

i) 吸着クロマトグラフィー

カラムとして 4×15cm, 及び、1.5×14cm の一端

を細くしたガラス管を使用する。吸着剤としては、Hyflosupercell を加えたリン酸カルシウムゲル、及び Hydroxylapatite を使用する。

Calcium phosphate gel-Hyflosupercell 混合吸着剤調製法 :

Hyflosupercell 30g, 塩化カルシウム 3g を蒸留水に懸濁して 200ml とした液に、4.5%リン酸二ナトリウム液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 100ml を、はげしく攪拌しながら加え、濃アンモニア水にて pH 8.0 に調整する。後、50 ㎖ の蒸留水で数回、傾斜法にて洗って吸着剤を調製する。

Hydroxylapatite- $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3 \cdot \text{OH}$ -調製法 :

Tiselius の方法³⁹⁾により作る。すなわち、0.5M 塩化カルシウム 20 ㎖ と、0.5M リン酸二ナトリウム 20 ㎖ とを、それぞれ別の分液漏斗に入れ、両方の漏斗より

1分間約120滴の割合で同時に滴下させ、受器中で攪拌する-Bruschite : $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。暫時放置後、上清を傾斜して流し、沈澱を4ℓの蒸溜水で4回、傾斜法にて洗う。後、蒸溜水を全量4ℓになるまで加えてから40% (重量) 水酸化ナトリウム液 100ml (新しく作ったもの) を加え、混合液を攪拌しながら1時間煮沸する。高度に分散懸濁した物質が沈下した時に、やや混濁せる上清を再び傾斜法にて流す。ここで更に4ℓの蒸溜水で4回洗った後、pH 6.8, 0.01M リン酸ナトリウム緩衝液を加え、まさに沸騰する直前まで攪拌しながら加熱する。この段階で沸騰させてはならぬ。上清を傾斜して流してから更に pH 6.8, 0.01M リン酸ナトリウム緩衝液にて5分間煮沸し、上清を流し次に、pH 6.8, 0.01M リン酸ナトリウム緩衝液で15分間煮沸し、最後に pH 6.8, 0.001M リン酸ナトリウム緩衝液にて15分間煮沸を2回くり返して洗う。このようにして出来上った吸着剤 Hydroxylapatite は pH 6.8, 0.001M リン酸ナトリウム緩衝液中に貯える。

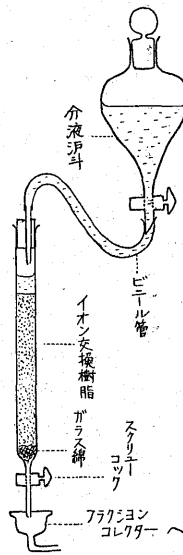
ii) イオン交換クロマトグラフィー

陰イオン交換樹脂 :

強塩基性の Dowex 1 (×2) (mesh 200~400) 又は Dowex 2 (×8) (Mesh 150~300) をギ酸型にして用いる。まず、100g の樹脂を 5ℓ の水に分散させて暫時放置後、大部分の樹脂を沈下させ、混濁せる上濁液 (微粒樹脂を含む) を傾斜してすてた後、Dowex 1 においては 200 mesh, Dowex 2 においては 150 mesh の、ふるいを通して粗粒子を除去し、大体上記の mesh にそろえる。市販の樹脂は Cl 型で、これをギ酸型にかえるには Potter 等³⁹⁾の方法により次のようにして行う。すなわち吸引濾斗の濾紙上に約 50g の樹脂をおき、3M ギ酸ナトリウム約 2ℓ を約 1時間かけて徐々に流す。その後、蒸溜水 2ℓ 以上で洗い、蒸溜水に懸濁させて冷所に貯える。なお、樹脂の再生には 2N 塩酸及び 2N 水酸化ナトリウムにて交互に数回洗った後、最後に 2N 塩酸で洗い Cl 型にして保存する。

陰イオン交換カラムには、第1図のように内径 1.4 cm, 長さ約 40cm のガラス管の一端を細くしてそこにスクリー・コックを付したものを使用する。下端はガラス綿を約 1cm の層にゆるくつめ、樹脂をつめる前に水を満して自然流下する液が辛うじて滴状に切れない程度にする。このガラス管を完全に垂直に固定し、ギ酸型にして蒸溜水中に貯えてある樹脂を、分散懸濁させて水と共にガラス管に流し込む。この時、気泡が入らぬよう充分注意する。水を流下せしめて適当

第 1 図



な長さ (25cm 前後) の樹脂柱となし、上清は流し切らずに約 1cm の液層が残るところでスクリー・コックを閉じる。必要な予備操作 (水洗・緩衝化等) の後、分液濾斗中にリン酸カルシウムゲル上清 (80%ギ酸にて pH 4.8 にした試料) を入れて、その高さを加減することにより流下液を約 100ml/hr の速度になるように試料を樹脂に吸着させる。吸着された試料は、分液濾斗中の展開溶離液をビニール管を通して樹脂層へ導き、流出速度を約 40ml/hr になるよう、分液濾斗の高さを加減して溶離する。溶離流出液はオートマチック・フラクション・コレクターにて 10ml ずつの分画にとる。なお、溶離展開は 4°C の氷室内において行う。フラクション・コレクターで得られた各分画は大体一本おきに p-Apo 酵素を用いて活性を測定する。

溶離液としては、ギ酸アンモニウム緩衝液及び Tris 緩衝液を用いる。

ギ酸アンモニウム緩衝液 : 純ギ酸 (試薬特級 25M) を濃アンモニア水にて所用の pH に調整した後、希釈して、ギ酸につき 1M の stock solution とする。用に臨み適当な濃度に希釈して用いる。なお、純ギ酸と濃アンモニア水との混合は非常な発熱を伴う故、冷却して行うか又は純ギ酸を 10M 程度に希釈したものとアンモニア水とを混合して、stock solution を調製するのがよい。

Tris 緩衝液 : Gomori⁴⁰⁾により最初に推奨され、Boman 等⁴¹⁾により陰イオン交換樹脂による蛋白クロマトグラフィーに使用された tris (hydroxymethyl) aminomethane-hydrochloric acid (THAM-HCl) を用いる。まず、THAM 121g を 700ml の水に溶かし、これに濃塩酸を加えて (約 70ml) pH を 7.4 にする。最後に全量を 1ℓ にするように水を加えて、これを stock solution とする。これは使用すべき種々の濃度に希釈して用いる。希釈による pH の変化は 0.1 以内であり、この実験では無視し得る程度のものである。

陽イオン交換樹脂 :

強酸性の Dowex 50 (×8) (mesh 100~200) を使用する。まず、陰イオン交換樹脂の場合と同様に mesh をそろえて後、2N 塩酸→蒸溜水→2N 水酸化ナトリ

ウム→蒸留水を交互にくり返して洗うこと数回、これにより樹脂の合成過程で混入又は生成した可溶性有機物、鉄、カルシウム等の不純物を除去する。最後に2N塩酸でH型となし、充分水洗した後使用に供する。

3) 酵素活性測定方法

小試験管に、Apo 酵素液 0.15ml, Cofactor 液 0.15ml, 終末濃度 $2 \times 10^{-3}M$ Tyrosine 液 0.02ml, 終末濃度 $5 \times 10^{-6}M$ ヨウ化カリウム液 0.05ml, I^{131} のトレーサー量 (普通 5mC を 10ml のリン酸緩衝液にかして、その 0.01ml を反応に使用する), 及び必要に応じて、終末濃度 $1.5 \times 10^{-3}M$ の Cu^{2+} ($Cu SO_4 \cdot 5H_2O$ を使用) 0.02ml を添加し、これらに、pH 7.6 0.2M リン酸緩衝液を加えて全量 0.5ml とし、38°C の水浴中で反応させる。Holo 酵素液を使用する時は、Apo 酵素及び Cofactor のかわりに、0.2ml を入れる。嫌気的条件下が要求される時は、側室のある Thunberg 管を使用し、空気を排除して後、側室中のチロシン液を主室中の反応液に加えて反応開始とする。

所要反応時間 (60~90分) 後、20%チオ硫酸ナトリウム 0.1ml を加えて反応を停止させ、ペーパー・クロマトグラフィーにかける。ペーパーには、あらかじめ、pH 7.6, 0.1M リン酸緩衝液を充分噴霧して緩衝化した後乾燥させた東洋濾紙 No. 50 ($2 \times 40cm$) を用いる。下端より 8cm の所に原線を引き、そこに反応液の適当量 (約 3 μ l) を毛细管にて幅 0.5cm 以下の線状に塗布する。10%チオ硫酸ナトリウムを反応液と原線上に重ねるとクロマトグラフィーの結果がよい。溶媒は n-ブタノール・酢酸・水 (4:1:2) の組成のものを用い、上昇法にて約10時間展開後、クロマトグラム上の各分画の放射能を well type のシンチレーション・カウンターにて計測し、Background を差引いて、濾紙上全放射能に対するモノヨードチロシン分画の百分率を求めてその際の酵素活性度とする。

放射性同位元素 I^{131} は日本放射性同位元素協会が英国 Amerhsam の Radiochemical Center より輸入したものを使用する。時に酵素活性を低下せしめるような還元性物質を認めることがあるので、Taurog 等の方法²⁵⁾により純化して使用する場合もある。

4) 反応時間曲線及び反応速度

小試験管に p-Apo 酵素 1.5ml, p-Cofactor 1.5ml, ヨウ化カリウム (終末濃度 $5 \times 10^{-6}M$) 0.5ml, I^{131} 0.2ml (トレーサー量として用い、液量は緩衝液で補正する), Cu^{2+} 液 (終末濃度 $1.5 \times 10^{-3}M$; $Cu SO_4$ を用う) 0.2ml を加え、pH 7.6, 0.2M リン酸緩衝液にて全量を 4.8ml とす。 Cu^{2+} を添加しない場合は同量の蒸留水を加える。38°C の水浴中に入れ、チ

ロシン (終末濃度 $2 \times 10^{-3}M$) 0.2ml 添加と同時に反応開始とし、一定時間毎 (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60分) に水浴中の反応液より毛细管ピペットにてその一定量 (約 0.2ml) をとり出し、直ちに、別に用意した小試験管中の20%チオ硫酸ナトリウム液 0.05ml と混合して反応を停止させる。これをペーパー・クロマトグラフィーにかけて酵素活性を測定する。反応時間を横軸に、各時間における酵素活性 (%) を縦軸にとつて plot とすれば、反応時間曲線を求め得る。

この反応時間曲線において、反応初期 (大体20分以内) は直線と見なし得る故に、その間の勾配を反応 (初) 速度として求める。

5) 酵素蛋白量

酵素蛋白液をセロファン管にて透析を行う。外液は蒸留水を用いて内液の30倍以上となし、マグネック・スターラーにて攪拌しながら始めの3回は2時間おきに、後では6~8時間おきに外液をかえ、24時間以上透析した後、乾燥重量を測定する。乾燥法としては赤外線ランプによる熱乾燥を主として用いるが、時として pervaporation⁴²⁾ 又は冷凍乾燥法を単独又は併用する場合もある。pervaporation は氷室内で行い、冷凍乾燥には共和式冷凍乾燥機 RL500 型を使用する。

なお、蛋白量としては、275m μ の紫外外部吸収値を利用する場合もある。

6) 実験材料並びに実験方法に対する検討・考察

i) 胃腸管より吸収されたヨウ素 (I^-) は、甲状腺を除いては、顎下腺に血漿中の濃度の約40倍、乳腺・胃液中に約30倍が証明されるという⁴³⁾。更に Fawcett & Kirkwood によれば、ラットの各組織の5%ホモジェネートにおける Tyrosine iodinase 活性は、そのヨウ化率において、顎下腺が最高を示して60%、耳下腺で46%、甲状腺で29%、舌下腺で4%、腎、胃でそれぞれ1%を示し、腸、脳、肝、脾、心筋、骨格筋において活性を見ないとしている (3時間反応値)。それ故、ここではウシ顎下腺を酵素材料として用いたが、それは又、抽出操作に対して比較的安定であるように思われる。

ii) 顎下腺を waring blender にかける前に冷凍箱中で凍結し、一昼夜の後それを融解する操作を加えたことは幾分でも凍結融解法による細胞膜破壊を意図したもので、無細胞抽出標品を得るための初段階の操作としては当を得たものであると思う。又 60°C 5分の熱処理は、それにより酵素蛋白以外の混在せる共存蛋白質を変性させ除去し得ると同時に、Cofactor を分離するかも知れぬ或る種の酵素を不活性化して、以後の Cofactor 抽出操作を容易にする可能性を含んでい

る。このヨウ素有機化反応は、Weiss 及び Taurog 等によれば、甲状腺では、細胞顆粒（ミトコンドリア及びミクロゾーム）に含まれる部分にその活性の大部分が見いだされるとしている。ここでの報告は、顎下腺を酵素材料として用いてはいるが、たとえミトコンドリア及びミクロゾームに局在する酵素であるとしても、上記の凍結融解と、Warling blender, 熱処理の組合せによる抽出方法、更にそれ以下の操作により充分可溶性酵素としての特性をそなえて単離・精製し得るものと思われる。

iii) Cofactor の単離・精製をいかなる方法で行うかは、ある程度、試行索的に決定する以外に道がないとはいえ、文献的にはイオン交換樹脂を使用して Coenzyme, Prosthetic group の精製に良好な結果を得ている例は次のように数多く見られ。

陰イオン交換樹脂として

Dowex 1 を用いた例では、DPN (CoI)⁴⁴⁾, TPN (CII)⁴⁵⁾, FAD⁴⁶⁾, Coenzyme A⁴⁷⁾

Dowex 2 を用いた例では、DPN⁴⁸⁾

陽イオン交換樹脂として

Dowex 50 を用いた例では、Coenzyme A⁴⁹⁾

Amberlite IRC 50 では、Cytochrom C⁵⁰⁾

Decalso F では、Cytochrom C⁵¹⁾

故に、著者も Dowex 1, Dowex 2 をこの Cofactor の単離・精製に適用せしめるようにカラム操作を行うこととした。

iv) 酵素活性測定方法に対する検討は教室の鈴木²⁸⁾が詳細に行っている。ただペーパー・クロマトグラフィーで原線上にチオ硫酸ナトリウム液を、試料に重ねておくことは、展開中に生ずるかも知れぬ人工生成物を消去するのに効果的な意義がある。チオ硫酸ナトリウムはその還元性の故に、ヨウ素イオン (I⁻) を、はるかに反応性の強い分子状ヨウ素 (I₂) に酸化するのを防ぐ。しかも既に生成されているモノヨードチロシンに与える影響は無視し得る。なお、この溶媒では、蛋白は原線上にとどまる。

v) 次に反応速度を求める方法として、一般に、反応時間を t , 基質濃度を $[S]$, 反応生成物の濃度を $[P]$ とすると、反応速度 v は

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

としてあらわされる。反応時間曲線が直線的であれば、

$$v = \frac{\Delta [P]}{\Delta t}$$

となり Δt 時間内の平均速度として求められる。この実験においては、反応生成物 P はモノヨードチロシンであり、その生成量は反応時間曲線が直線的である

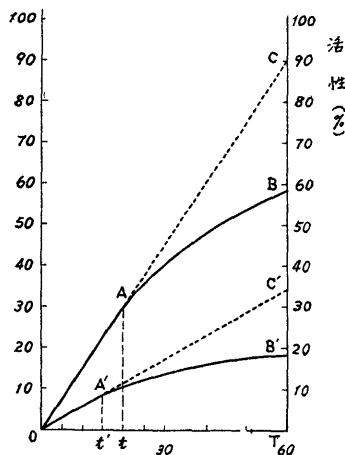
間は活性度 (酵素活性測定法の項で定義されたもの) に比例すると見てよい。故に上式の $[P]$ を活性度におきかえても反応 (初) 速度の相対値には変化がない。すなわち、

$$v = \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad A: \text{活性度}$$

となる。

具体的にこれを求める場合は、ここでは、次に示すように作図の方法によつた (第 2 図)。

第 2 図 反応速度の求め方



反応時間曲線として OAB なる曲線を得たとする。しからば OA は直線と見なし得るから、反応初速度 v は次の式より求められる。

$$v = \frac{tA}{ot} = \frac{TC}{OT}$$

OT を一定とすれば反応速度の相対値 V は

$$V = TC = 90$$

同様に OAB' なる反応時間曲線においても反応速度の相対値は

$$V' = TC' = 35$$

となる。

実験結果

この章においては、まず酵素活性に影響を及ぼすであろう各種要因につき解析をすすめ、それが直接あるいは間接的にこの酵素の Cofactor 発見に至る契機となることを記載すると共に、更に、Cofactor の単離・精製に至る実験経過を述べ、最後に単離せる Cofactor につき、その性格的特徴を解析しつつ、銅イオンが及ぼす作用についても触れることを試みている。

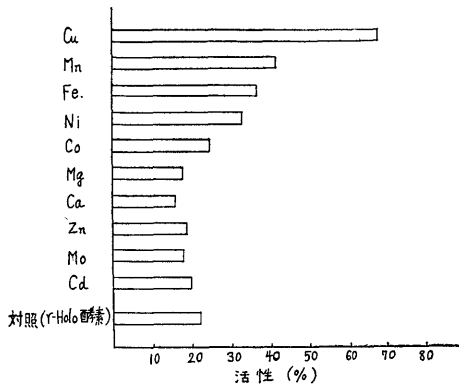
1) 酸素活性に影響を及ぼす各種要因

阻害剤については既に報告されているので²⁷⁾²⁸⁾³⁰⁾,

ここでは Cofactor 発見の契機となつた要因について成績を述べる。

まず、種々の金属イオンの Tyrosine iodinase (γ -Holo 酵素) に対する影響をしらべて次の結果を得た(第3図)。何ら金属を加えない γ -Holo 酵素は22%しか活性を示さないが、銅、マンガン、鉄等を添加すれ

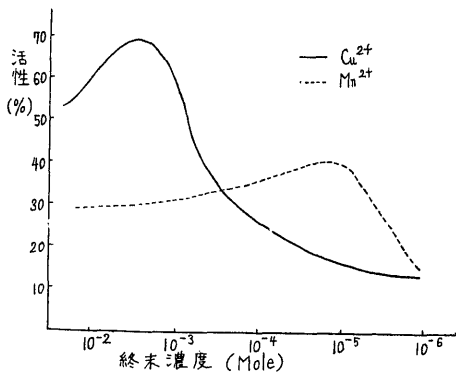
第3図 各種金属イオンの γ -Holo 酵素に及ぼす影響



ば著明な活性上昇を示し、マグネシウム、カルシウム、亜鉛、モリブデン等では見るべき変化はなかつた。それぞれの金属としては、硫酸銅、塩化マンガ、硫酸鉄、硫酸ニッケル、硫酸コバルト、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、酢酸亜鉛、塩化カドミウムを使用し、終末濃度 $2 \times 10^{-3}M$ になるように反応液の中に加えた。

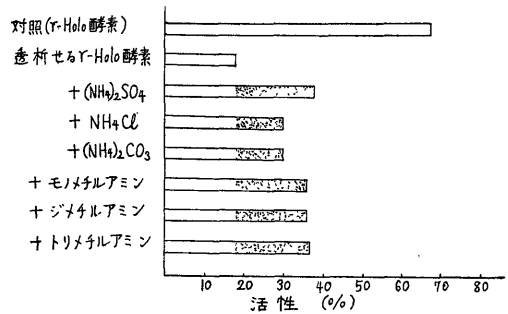
又、銅及びマンガン・イオンの濃度と γ -Holo 酵素活性との関係は第4図のようで、 Cu^{2+} は $5 \times 10^{-3}M$ において最高の活性上昇を示し、 Mn^{2+} は $10^{-5}M$ において最高の活性上昇を示すとはいえ $10^{-2}M$ に至るまでほぼ同一と見なされるような緩かな曲線を示した。

第4図 Cu^{2+} 及び Mn^{2+} の濃度と γ -Holo 酵素活性との関係



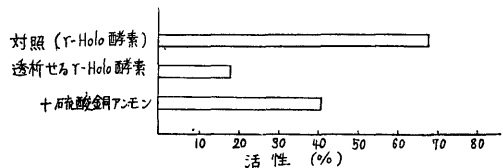
次に、アンモニウム塩の影響をしらべて、終末濃度 $0.1M$ の硫酸が、水に対し透析せる γ -Holo 酵素の活性を約20%引き上げるのを見た(第5図)。モノメチルアミン、ジメチルアミン及びトリメチルアミンでも同様な結果が得られたが、しかし何れの場合も対照の γ -Holo 酵素の活性にまでは回復しなかつた。 γ -Holo 酵素液は抽出操作上当然 $0.3M$ 硫酸を含んでいる故に、これを水に対し24時間以上攪拌透析することにより硫酸その他の透析性物質を除いて使用した。なお Cu^{2+} は終末濃度 $2 \times 10^{-3}M$ になるように反応液の中に加えた。

第5図 硫酸及びアミン効果 (添加せるアミン類は終末濃度 $0.1M$)



このことからアンモニウム塩が pH 7.6 で、添加せる Cu^{2+} と銅アミン錯イオン [$Cu(NH_3)_4^{++}$] を形成して、それが酵素活性を賦活せしめるのではなからうかと推定されたので、更に銅アミン錯塩である硫酸銅アンモンを、透析せる γ -Holo 酵素に添加してみた結果、活性の回復は見られたが充分なものではなかつた(第6図)。これらの事実、何か他に透析性の賦活物質が存在する可能性を示唆する。

第6図 銅・アミン錯イオンの γ -Holo 酵素活性に及ぼす影響

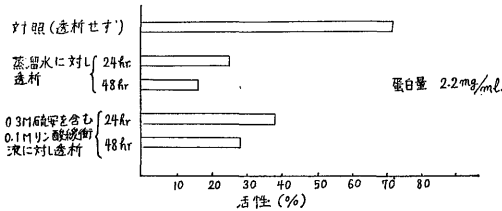


硫酸銅アンモンは、終末濃度 $2 \times 10^{-3}M$ (Cu^{2+} につき) になるように添加。対照及び透析せる γ -Holo 酵素には $2 \times 10^{-3}M$ 終末濃度の Cu^{2+} を添加してある。

そこで更に、 γ -Holo 酵素を、pH 7.6、 $0.3M$ 硫酸を含む $0.1M$ リン酸緩衝液に対し透析した結果は第7図のようで、水に対して透析した場合よりも緩徐であつたとはいえ、明らかに対照に比し活性の低下が見

られ、透析性の Cofactor の存在を暗示したようであった。透析にはセロファン管を使用して 4°C の氷室内において行つた。浸透圧による内液の希釈を最小限にいくとめるため、セロファン管は酵素液を入れた後、よく圧縮して両端をしぼり、外液は内液の30倍以上とし24時間及び48時間、攪拌透析を行つた。対照としては、 γ -Holo 酵素を透析時間と同じだけ、同じ条件で氷室内に放置したものを使用した。

第7図 γ -Holo 酵素の透析による活性低下



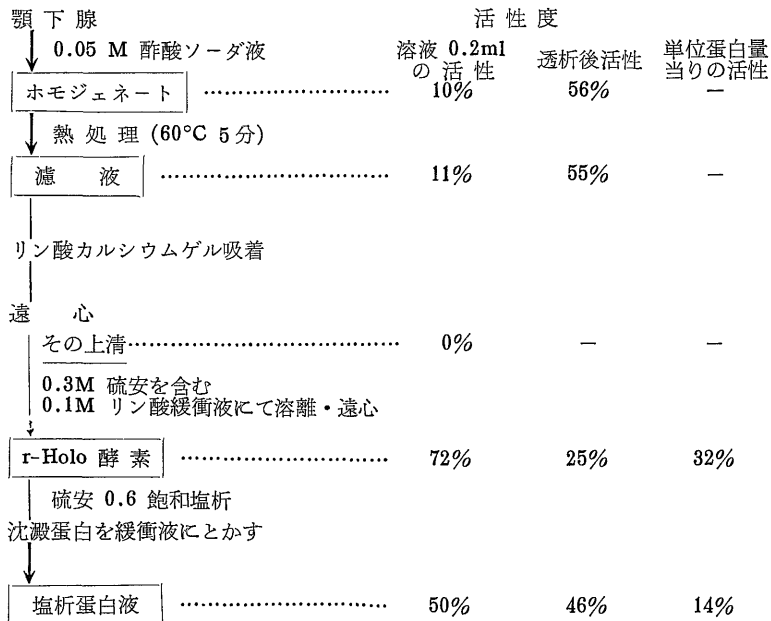
0.6 飽和硫酸にて塩析した γ -Holo 酵素蛋白は、塩析を行う前のものに対し単位蛋白量あたりの活性は低下したが (第8図)、これは酵素蛋白部分 (Apo 酵素) と分離し得る Cofactor が塩析上清に残存することを示唆している。塩析には、硫酸を乳鉢で磨砕したものをを用い、マグネチック・スターラーで攪拌しながら少量ずつ加えて、塩析による蛋白変性を防いだ。

更に、等電点沈澱法、連続濾紙電気泳動法⁵²⁾、Zone electrophoresis⁵³⁾、吸着クロマトグラフィー、イオン交換樹脂クロマトグラフィー等を用いて、 γ -Holo 酵素の精製をすすめて行くと、単位蛋白量当りの酵素活性は常に低下した。

又、Cofactor 酵素の段階的希釈に対して、その反応速度を図表に描けば第9図のようで、希釈により急激に反応速度は低下した。抽出の濃い場合には若干の作用が見られても、希釈すると急速に活性が低下する現象は、その抽出酵素系に Cofactor が存在するのではないかとの疑いをいだかせる。

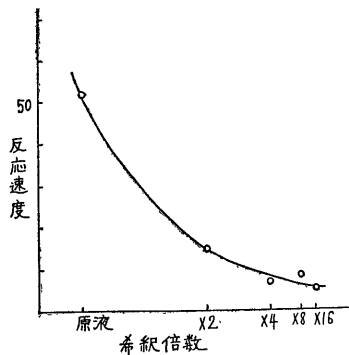
以上、透析、塩析、希釈の影響等より、Cofactor の存在を予想し、透析により活性低下せる γ -Holo 酵素に、ATP、チトクローム C、DPN、Coenzyme A、Coccarboxylase 等を添加し実験を行つたが、活性上昇は見られず、Coenzyme A は阻害的に働いた。又、パン酵母より抽出した Lebedew 液⁵⁴⁾ を添加してみたがむしろ阻害的に働く傾向に見えた。そこでこの酵素に特異的な native Cofactor の存在を解析するために、透析外液を約 1/8 量に減圧濃縮 (40°C 以下) したものを、透析により活性低下せる γ -Holo 酵素に加えた結果は第10図のようで明らかに活性の上昇を見た。この透析外液の吸収スペクトルはあたかも、260m μ に

第8図 硫酸塩析による活性低下並びにホモジェネート透析による活性上昇



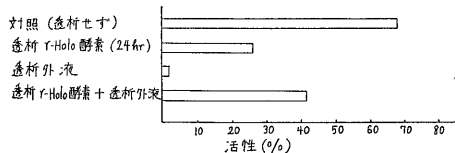
- ・透析は蒸留水に対し24~48時間静置透析とす。
- ・活性度は90分反応値
- ・ホモジェネート透析による活性上昇に関しては第4章を参照

第9図 γ -Holo 酵素希釈の反応速度に及ぼす影響



γ -Holo 酵素原液は蛋白濃度 Ca 3mg/ml.

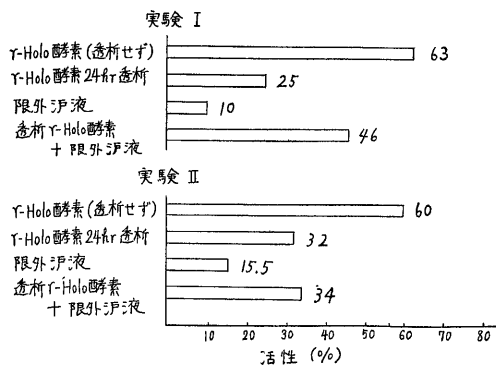
第10図 透析外液添加実験 (その1)



極大吸収をもつように見える (第15図)。

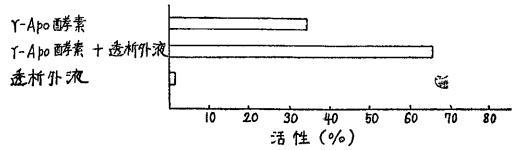
これにより透析性の融媒の活性な非蛋白部分の存在を認め得たので更にこれを確認するため、限外濾過により分離しようと試みた。すなわち、 γ -Holo 酵素をコロジオン膜を用いて、1時間、3000 rpm で遠心濾過を行った限外濾液を、透析により活性低下した γ -Holo 酵素に添加した結果は第11図に示されたようで、活性の上昇は認められたが、時として顕著なものでない場合もあった。コロジオン膜は、局方コロジオン液をそのまま鏡板上にひろげた適当な大きさの和紙の上に流し暫時乾燥するをまつて水中で凝固させた。なお、限外濾液の吸収スペクトルは紫外部 256m μ に極大吸収をもつように見える (第15図)。

第11図 限外濾液添加実験 (その1)



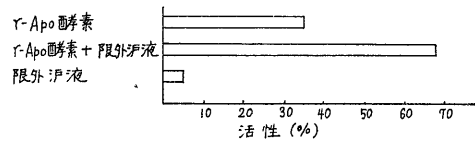
そこで Cofactor を可及的に除去した 酵素蛋白部分として、Batchwise 法にて得た γ -Apo 酵素を用い、上述の透析外液をこれに添加した場合もやはり活性の上昇を示した (第12図)。

第12図 透析外液添加実験 (その2)



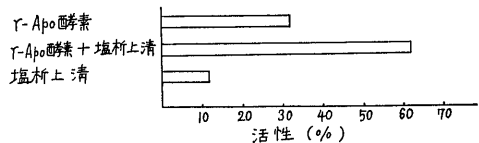
更に限外濾液を γ -Apo 酵素に添加せる実験でも活性の上昇が認められた (第13図)。

第13図 限外濾液添加実験 (その2)

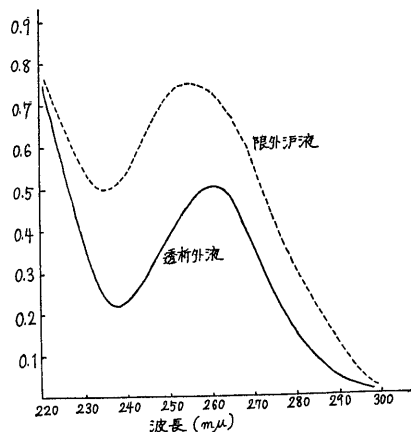


又、 γ -Holo 酵素を硫酸 0.6 飽和にて塩析したものは単位蛋白量当りの活性低下を見ることは上記したが、その塩析上清を Batchwise 法による γ -Apo 酵素に加えれば活性の上昇を見た (第14図)。

第14図 塩析上清添加実験



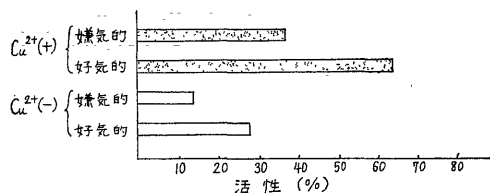
第15図 透析外液及び限外濾液の吸収スペクトル



Cofactor を必要とする酵素でまず考えられるのは酸化還元に関与する酵素系である。ここで嫌気的条件

での反応を γ -Holo 酵素にて検索した結果は第16図のようで、好氣的条件に比しある程度の抑制効果は見られた。又、メチレン青を用いて同様な実験を行ったが結果は同じで、その上、メチレン青の褪色は見られなかった。なお、表面活性基 SH の定量を Barron⁵⁵⁾ の方法で行ったが、尿素変性なしでは γ -Holo 酵素に表在性 SH 基は認められなかった。

第16図 嫌氣的条件での酵素活性



酵素標品 γ -Holo 酵素
反応には Thunberg 管を使用

2) Cofactor の確認

i) 吸着クロマトグラフィーによる確認過程

透析、塩析、限外濾過等の実験結果は明らかに Tyrosine iodinase が、触媒的活性な native Cofactor を含んでいることを示すに充分であつたが、更に積極的に、Calcium phosphate gel-Hyflo-supercel-column による吸着クロマトグラフィーで Cofactor を γ -Holo 酵素より単離・確認するために、 γ -Holo 酵素液 50ml を蒸留水で20倍に希釈（イオン強度を低くするため）してカラムに吸着せしめ、吸着せる試料を、

I-step : 0.1M リン酸緩衝液 pH 7.6

II-step : 0.1M 硫酸を含む 0.1M リン酸緩衝液 pH 7.6

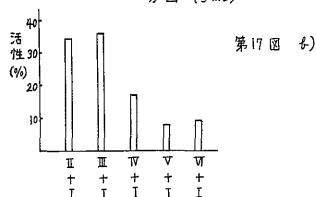
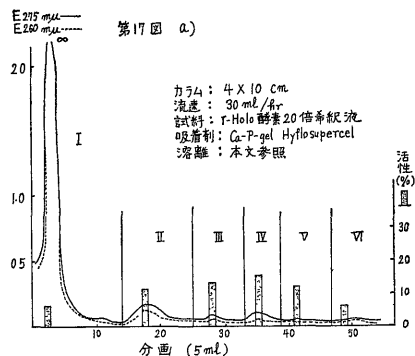
III-step : 0.2M 硫酸を含む 0.1M リン酸緩衝液 pH 7.6

IV-step : 0.3M 硫酸を含む 0.1M リン酸緩衝液 pH 7.6

V-step : 0.4M 硫酸を含む 0.1M リン酸緩衝液 pH 7.6

で順次 setpwise elution を行い、5ml ずつの分画にオートマチック・フラクション・コレクターで溶出液をとつた。溶出液は各分画毎に1本ずつ Beckman 分光光度計 DU 型で、275m μ 及び 260m μ の吸収を測定し、吸収の高い部分を互いに組合せて酵素活性を測定することにより、蛋白部分と Cofactor とに分離し得たか否かを検した。結果は第17図のようで、吸収の高い個々の分画単独では見るべき活性を示さないが（第17図-a）、これを組合せれば第17図-b）のように、(I+II), (I+III) の組合せで幾分かの活性上昇を示

し、Cofactor と Apo 酵素がわかれて存在することを示した。

第17図 γ -Holo 酵素より Cofactor の分離（その1）

Ca-phosphate-gel Hyflo-supercel column によるクロマトグラフィー

そこで、Hydroxylapatite column を使用して Cofactor を分離しようと試みた。すなわち、あらかじめ前記の方法で調製しておいた Hydroxylapatite の懸濁液を 1.5 X 10cm のカラムに流し込み吸着剤が沈下するをまつて、カラムの最上層をガラス棒で少し攪拌し、懸濁物質が再び沈むまで放置する。これに、 γ -Holo 酵素 40ml を蒸留水で20倍に希釈した液を試料として吸着させ、

I-step : 0.05M リン酸緩衝液 pH 7.6

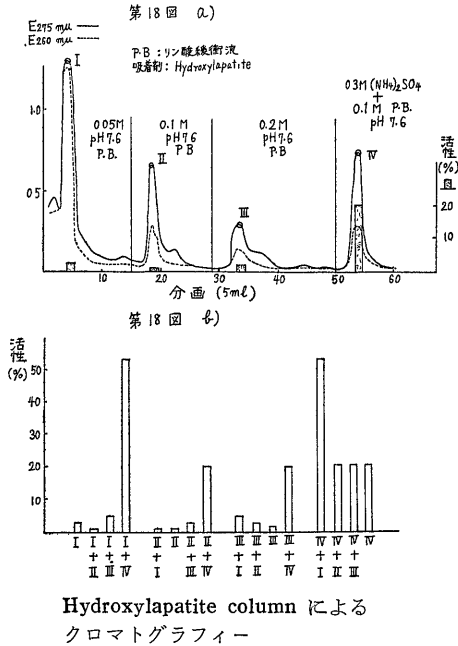
II-step : 0.1M リン酸緩衝液 pH 7.6

III-step : 0.2M リン酸緩衝液 pH 7.6

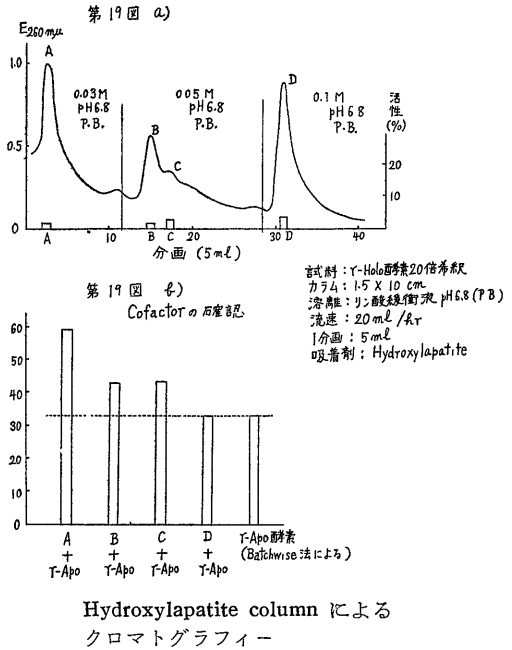
IV-step : 0.3M 硫酸を含む 0.1M リン酸緩衝液 pH 7.6

で順次 stepwise elution を行う。溶離の流速を 20ml/hr になるように適当な圧を加えなければならぬ。溶出液は前回同様に 5ml ずつの分画にとり、275m μ 及び 260m μ の紫外部吸収を測定した（第18図-a）。吸収の高い部分を互いに組合せて酵素活性を測定することにより、Cofactor と蛋白部分との存在を確認しようとの試みは第18図-bに見られるようで、I-step の4本目に Cofactor を含む分画、IV-step の4本目に蛋白部分（Apo 酵素）の分画の存在を示しているようである。

第18図 γ -Holo 酵素より Cofactor の分離 (その2)



第19図 γ -Holo 酵素より Cofactor の分離 (その3)

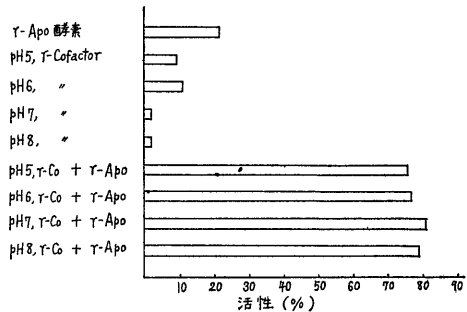


Cofactor 部分が 0.05M リン酸緩衝液の低いイオン強度で溶離されてくることがわかったので、次に同じ吸着剤 (Hydroxylapatite) を用い、pH を 6.8 とし、更に低いイオン強度で溶離することとした。結果は第19図-a に示す。すなわち、pH 6.8 リン酸緩衝液の 0.03M, 0.05M, 0.1M の三段階で stepwise elution を行い、A, B, C, D, 4つの 260m μ 吸収極大を得た。これらの分画を Batchwise 法にて得た γ -Apo 酵素に添加した時の酵素活性は第19図-b のようで、A, B, C, D, 各分画は単独ではほとんど認むべき活性を示さないが、 γ -Apo 酵素を加えることにより A-分画において最大の活性上昇を見た。結局、Cofactor は、Hydroxylapatite を用いれば最もイオン強度の低い I-step で溶離されてくることがわかった。しかしこれは、Cofactor 活性としては未だ充分なものとはいえない。

ii) Batchwise 法による確認過程

Cofactor が Hydroxylapatite により、最も低いイオン強度で溶離されることがわかったので、ここ吸着リン酸カルシウムゲル (別表参照) を 0.01M リン酸緩衝液で洗うことにより、Cofactor を分離・確認することを試みた。リン酸緩衝液の pH を 5 から 8 までかえて実験した結果は第20図のようである。pH 7.0 から 8.0 の間で洗出した部分が最も Cofactor 活性が高かったとはいえ、概して pH の影響は受けていない

第20図 Batchwise 法による Cofactor の分離・確認・添加実験

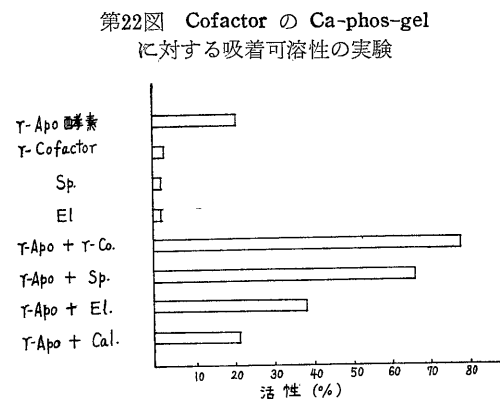
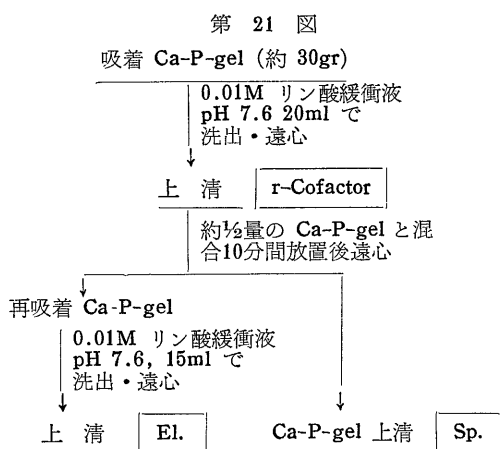


酵素蛋白部分としては γ -Apo 酵素を用う。

ようである。そこで pH 7.6, 0.01M リン酸緩衝液で洗出したものは未だ蛋白がかなり含まれているが、粗 Cofactor 液 (γ -Cofactor) として種々の実験に供し得る。なお、このものの吸収スペクトルは 260m μ に極大吸収をもつように見える。

そこで更に、Cofactor のリン酸カルシウムゲルに対する吸着性が可逆的であるか否かをしらべるために次のような実験を行った。pH 7.6, 0.01M リン酸緩衝液にて吸着カルシウムゲル (別表及び第21図参照) より洗出した、Cofactor (γ -Co.) を、再び充分量の新たなカルシウムゲルと混和攪拌し暫時放置後、遠心によりその上清 (Sp.) と再吸着カルシウムゲルとに分

ける。再吸着カルシウムゲルより更に pH 7.6, 0.01 M リン酸緩衝液にて洗出した液 (EL.) をとり, (γ -Co.), (Sp.), (EL.) をそれぞれ, Batchwise 法にて得た γ -Apo 酵素に添加して活性を測定した。別に対照として何物も吸着していないカルシウムゲルの少量を pH 7.6, 0.01M リン酸緩衝液に懸濁させた液 (Cal.) を γ -Apo 酵素に添加したものの活性を比較にとつた (第22図)。この実験成績より, Cofactor はリン酸カルシウムゲルに吸着するのではなく単に分散してカルシウムゲル内部の液相中に保有されているだけであることがわかった (この報告中においては, まぎらわしくない限り, この現象をも一応, 吸着という言葉で表現してある)。又, Cofactor が, カルシウムゲルより生ずる人工的なもの⁵⁰⁾でないことも確かめられた。



Sp. EL. Cal. 等の略号は第21図並びに本文参照

以上, 吸着クロマトグラフィーにより, Cofactor の存在を確認し, それが低いイオン強度で溶離されることを見いだしたが, 更に Batchwise 法による成績及び Cofactor のリン酸カルシウムゲルに対する吸着可

逆性の実験より Cofactor の大部分がリン酸カルシウムゲル上清中に残存していることがわかった。

3) Cofactor の単離・精製

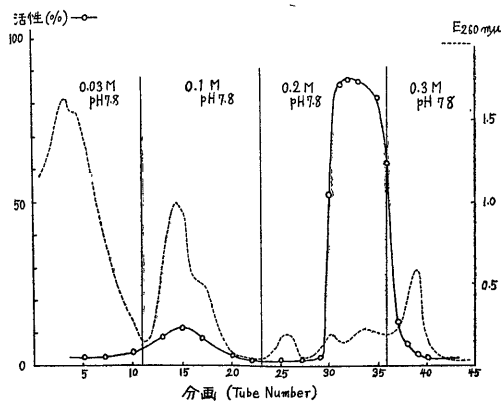
1) 陰イオン交換樹脂クロマトグラフィーによる単離

そこで Cofactor が多く含まれている顎下腺抽出液の熱処理濾液 (60°C, 5分) 又はリン酸カルシウムゲル上清を, Batchwise 法による γ -Apo 酵素に添加してみたが, 活性上昇を示す場合と, 示さない場合とがあつた。先に顎下腺中にこの酵素の阻害物質を見つけていたので²⁷⁾, これをリン酸カルシウムゲル上清から除去して, Cofactor を単離する目的で, まず Dowex 2 ($\times 8$) を用いてクロマトグラフィーを試みた。

リン酸カルシウムゲル上清 (やや混濁) の約 400ml に, 80% ギ酸 2~3 滴を加えて pH 4.8 となし, 吸引濾過し (やや透明となる), それを試料として, 緩衝化する Dowex 2 カラムに毎時 100ml の速度で流すと Cofactor はほとんど可逆的に吸着されるであろう。溶離液にて展開しフラクションをとつて, p-Apo 酵素に添加, 活性試験を行つた結果は第23, 24, 25, 26図のクロマトグラムにおいて示した。

第23図は, 溶離液として pH 7.8 ギ酸アンモニウム液を 0.03M から 0.5M まで加えて stepwise elution を行つた結果で, 分画数31本目から 35本目にか

第23図 Dowex 2 による Cofactor の単離 (pH 7.8)



緩衝化 : 0.02M, pH7.8 ギ酸アンモニウム液 500ml

試料 : 磷酸カルシウムゲル上清 500ml

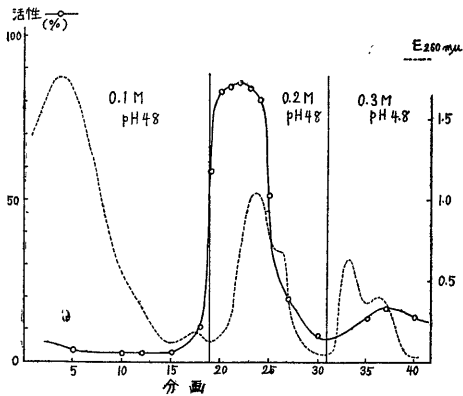
カラム : 1.4 \times 26cm

樹脂 : Dowex 2 ($\times 8$) 150~300mesh, ギ酸型
溶離液 : pH 7.8, ギ酸アンモニウム液, stepwise elution system

流速 : 50ml/hr

1分画 : 10ml

第24図 Dowex 2 による Cofactor
の単離 (pH 4.8)



緩衝化 : 0.05M, pH 4.8 ギ酸アンモニウム液 500ml

試料 : リン酸カルシウムゲル上清

カラム : 1.4×24cm

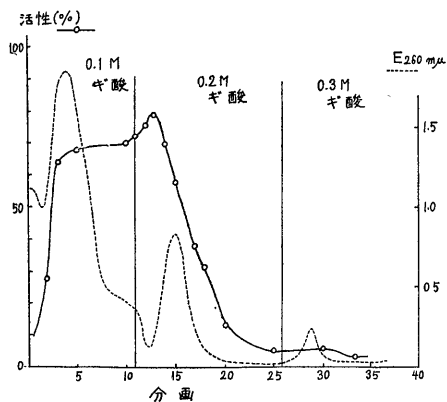
樹脂 : Dowex 2 (×8) 150~300mesh, ギ酸型

溶離液 : pH 4.8 ギ酸アンモニウム stepwise elution system

流速 : 50ml/hr

1分画 : 10ml

第25図 Dowex 2 による Cofactor
の単離 (ギ酸)



予備操作 : カラムに純ギ酸 200ml, 0.05M ギ酸 300ml その後 500ml の蒸留水で洗つてからリン酸カルシウムゲル上清を吸着させる。

カラム : 1.4×25cm

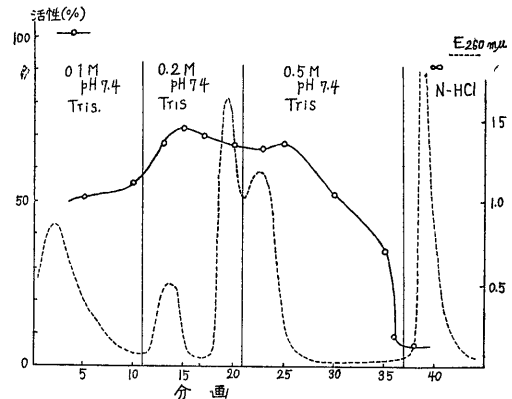
樹脂 : Dowex 2 (×8) 150~300mesh, ギ酸型

溶離液 : ギ酸 stepwise elution system

流速 : 50ml/hr

1分画 : 10ml

第26図 Dowex 2 による Cofactor
の単離 (Tris)



緩衝化 : 0.2M, pH 7.4, Tris 緩衝液 30ml 次いで 0.04M, pH 7.4 Tris 緩衝液 300ml

試料 : リン酸カルシウムゲル上清 500ml

カラム : 1.4×26cm

樹脂 : Dowex 2 (×8) 150~300mesh, Cl-型

溶離液 : pH 7.4 Tris 緩衝液

流速 : 50ml/hr

1分画 : 10ml

けて、0.2M で溶離された部分に、Cofactor 活性が高かったことを示している。260mμ 紫外部吸収は溶出液を5倍に希釈して測定したが、吸収極大と活性極大とは一致していないようである。溶出液の流速は1時間 50ml の割合である。なお、予備操作として、試料を吸着させる前に樹脂カラムを1000ml の蒸留水、次いで 500ml の 0.02M, pH 7.8 ギ酸アンモニウム液を流して緩衝化を行った。

第24図は、溶離液として pH 4.8 ギ酸アンモニウム液を使用した場合で、緩衝化は 0.05M, pH 4.8 ギ酸アンモニウム液 500ml で行う。

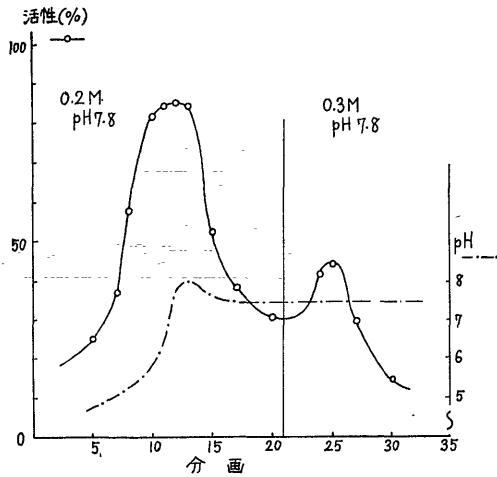
第25図は、溶離液としてギ酸を使用した場合で、予備操作として試料を吸着させる前に樹脂カラムに純ギ酸 200ml, 0.05M ギ酸 300ml を通し、その後 500ml の蒸留水で洗う。

第26図は、溶離液として pH 7.4 Tris 緩衝液を用いた場合で、緩衝化として 0.2M, pH 7.4 Tris 緩衝液 30ml, 次いで 0.04M, pH 7.4 Tris 緩衝液 300ml を流した Dowex 2 カラム (Cl 型) に試料を吸着せしめる。

次に陰イオン交換樹脂として Dowex 1 (×2) (mesh 200~400) を使用した結果は第27図のようで、溶離流出液の各分画の pH と活性度との関係を示す。

以上、陰イオン交換樹脂 Dowex 1 及び Dowex 2

第27図 Dowex 1 による Cofactor の単離



緩衝化： 0.2M pH 7.8 ギ酸アンモニウム
50ml を流した後 0.05M pH 7.8
ギ酸アンモニウム 200ml を流す。

カラム： 1.4×24cm

樹脂： Dowex 1 (×2) 200~400mesh, ギ酸型

溶離液： pH 7.8 ギ酸アンモニウム液

流速： 60ml/hr

1分画： 10ml

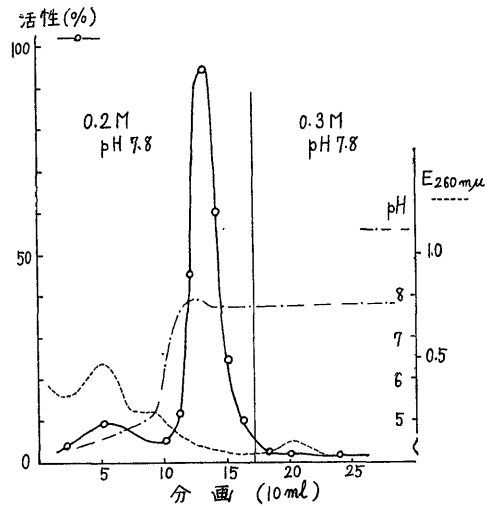
を用い、リン酸カルシウムゲル上清を試料として、ここに Cofactor を単離した。ギ酸アンモニウム緩衝液、ギ酸及び Tris 緩衝液でそれぞれ溶離した場合、更に pH 条件をかえて溶離した場合の中、pH 7.8 ギ酸アンモニウム緩衝液、Dowex 2 の使用が最も適しているようである。なお、ここで述べた実験結果は幾度か試みたものの中最も代表的な場合を示した。

ii) 再クロマトグラフィーによる精製

ここで更に、単離せる Cofactor を、Dowex 2 又は Dowex 1 で再クロマトグラフィーすることにより精製を行った。まず Dowex 2 にて溶離された活性度 80%以上の Cofactor 分画を 2 回分集めて約 70ml となし、それを蒸留水にて 5 倍に希釈後、予め緩衝化せる別の Dowex 2 (×8) (mesh 150~300) ギ酸型カラムに、毎時 100ml の速度で流せば、Cofactor はほとんど樹脂に吸着される。これを 0.2M ギ酸アンモニウム液で溶離した結果は第28図のようで 260 μ v の吸収は認められず、溶出液の pH が急激に上昇する前後において Cofactor の活性部分が溶離されてくるようである。

Dowex 1 による再クロマトグラフィーは第29図に示す。試料は、Dowex 1 ギ酸型のクロマトグラフィーにて溶離せる活性80%以上の分画を約 80ml 集めて蒸留水で 5 倍に希釈したものを用いる。クロマトグラ

第28図 Dowex 2 による再クロマトグラフィー



緩衝化： 0.05M, pH 7.8 ギ酸アンモニウム
300ml

試料： Dowex 2 により単離せる添加活性
度80%以上の Cofactor 分画

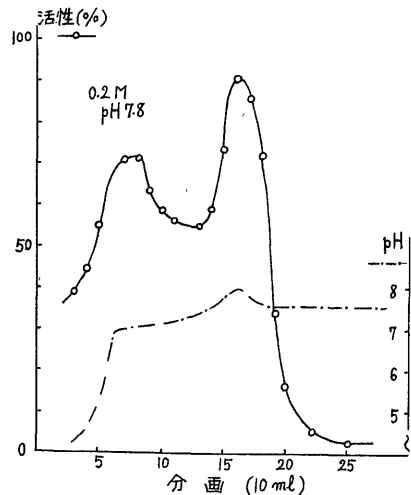
カラム： 1.4×25cm

樹脂： Dowex 2 (×8) 150~300mesh ギ酸型

溶離液： 0.2M, pH 7.8 ギ酸アンモニウム

流速： 50ml/hr

第29図 Dowex 1 による再クロマトグラフィー



緩衝化： 0.05M ギ酸アンモニウム pH 7.8
500ml

試料： Dowex 1 にて単離せる Cofactor 分画

カラム： 1.4×24cm

樹脂： Dowex 1 (×2) 200~400mesh, ギ酸型

溶離液： 0.2M pH 7.8 ギ酸アンモニウム

流速： 60ml/hr

ムは二相性のピークを示しているようである。

かくして、陰イオン交換樹脂を用いての再クロマトグラフィーによる Cofactor の精製は、Dowex 1 よりむしろ Dowex 2 にて好結果を得て、ほぼ完成することが出来た。ここではこれを p-Cofactor と称する。

これは -20°C の冷アセトンを加えると白濁し、12時間放置することにより結晶化した。

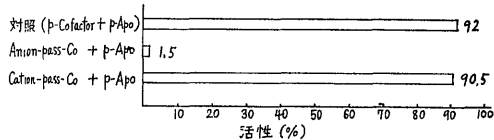
4) Cofactor の性格の特徴並びに銅イオンが及ぼす影響

i) 性格の特徴

吸収スペクトルにおいて紫外部 $260\text{m}\mu$ に見られた吸収極大は、上述のように Cofactor を精製するに従い、その活性上昇に反し低下して行き、精製された高い活性を有するものでは紫外部吸収は全く認められなくなつた。

4°C 以下の氷室内で、陰イオン交換樹脂 (Dowex 1, Dowex 2) を通過させた p-Cofactor 液及び、陽イオン交換樹脂 (Dowex 50) を急速に通過させた液に、それぞれ p-Apo 酵素を添加してその活性を測定した結果は第30図のようで、陰イオン交換樹脂通過液は活性がほとんどなくなり、陽イオン交換樹脂通過液は活性低下がほとんど見られなかつた。

第30図 イオン交換樹脂に対する p-Cofactor の態度



Anion-pass-Co : 陰イオン交換樹脂を通過させた p-Cofactor
 Cation-pass-Co : 陽イオン交換樹脂を通過させた p-Cofactor
 p-Apo : p-Apo 酵素

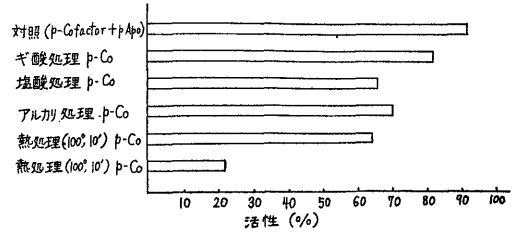
又、p-Cofactor のペーパー・クロマトグラム (展開溶媒に n-ブタノール・酢酸・水混合液を用う) 上での ニンヒドリン反応⁵⁷⁾、ドラーゲンドルフ反応⁵⁸⁾及びジアゾ反応⁵⁹⁾ はすべて陰性であつた。

酸・アルカリに対しては、わずかの活性低下を示したにすぎなかつた (第31図)。

熱には 100°C 30分で大部分失活するようであつた (第31図)。

p-Cofactor を希釈すれば、添加実験における活性は急激に低下する (第32図) が、このことに関しては後に詳しく実験・検討する。

第31図 酸・アルカリ及び熱に対する p-Cofactor の態度



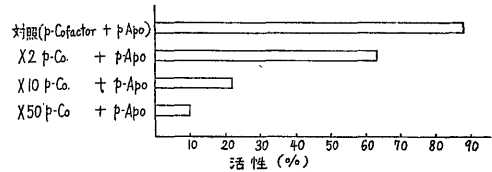
ギ酸処理 p-Co : p-Cofactor 5ml に純ギ酸 0.4ml を加え、約10時間放置後、水酸化ナトリウムにて pH 7.6 に修正したものを 0.15ml 反応に使用

塩酸処理 p-Co : p-Cofactor 5ml に濃塩酸 0.4ml を加え、約 8 時間放置後、水酸化ナトリウムにて pH 7.6 に修正反応にはその 0.15ml を使用

アルカリ処理 p-Co : p-Cofactor 5ml に 10N-水酸化ナトリウム 0.2ml を加え、約 8 時間放置後、塩酸にて pH 7.6 に修正、反応にはその 0.15ml を使用

Cu^{2+} は終末濃度 $2 \times 10^{-3}\text{M}$ になるよう反応液中に添加反応時間60分

第32図 p-Cofactor 希釈の活性に及ぼす影響



X2-p-Co : p-Cofactor を蒸留水で 2 倍に希釈したものを反応に 0.15ml 使用

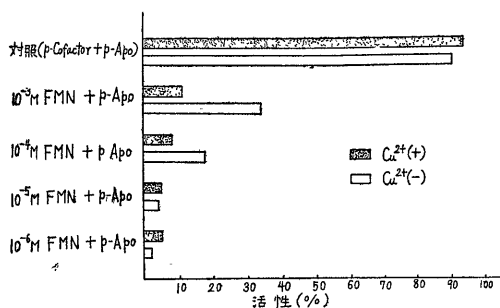
X10-p-Co : X2-p-Co に準ずる。
 X50-p-Co

なお、この p-Cofactor を FMN と比較するため、p-Apo 酵素に FMN の各種濃度を添加してみたが、結果は第33図のようで、終末濃度 10^{-3}M の高濃度において、 Cu^{2+} を添加しない時のみ p-Cofactor 添加時の $\frac{1}{3}$ 程度の活性を示すにすぎなかつた。p-Cofactor 液は反応に 0.15ml を使用したが、その中には p-Cofactor が乾燥重量として 0.06mg より多くは含まれていないと見なされる。

ii) 銅イオンが及ぼす影響

Cu^{2+} が γ -Holo 酵素に及ぼす影響については既にこの章の始めにふれたが、精製せる Holo 酵素 (p-Cofactor + p-Apo 酵素) との比較において、 Cu^{2+} の及ぼす影響を検討して次の結果を得た (第34図)。す

第33図 FMN と p-Cofactor の比較

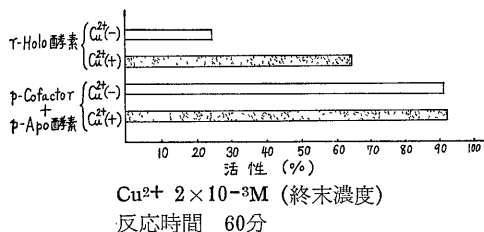


FMN の Mol 濃度はすべて終末濃度を示す

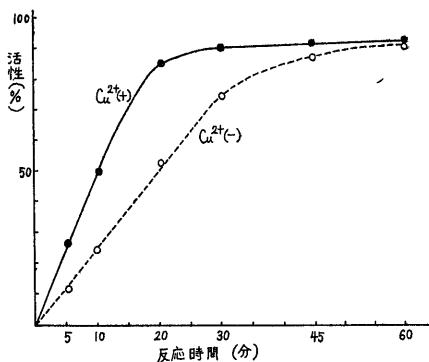
なわち、 γ -Holo 酵素では Cu^{2+} 添加により著明の活性上昇を示すが、精製した酵素の場合は Cu^{2+} を添加しない時も、した時も共に、60分反応値においてほぼ同一の活性を示した。これは、 Cu^{2+} が p-Cofactor と p-Apo 酵素を含む系において、必須の因子ではないことを示唆するものであろう。

ここで更に p-Cofactor を用いて Cu^{2+} を添加した場合と、しない場合につき、dynamic に観察すべく反応時間曲線を求めて、明らかに Cu^{2+} がこの酵

第34図 Cu^{2+} 添加が紺酵素及び精製酵素に及ぼす影響



第35図 反応時間曲線

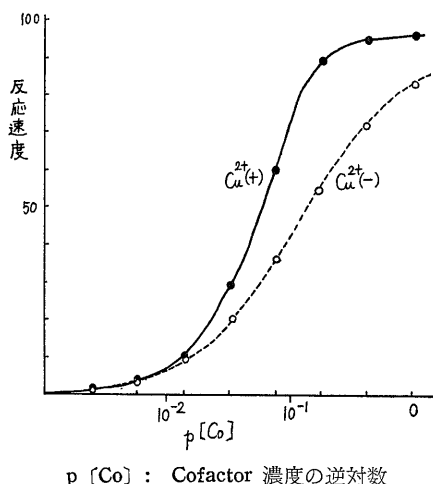


Cofactor : p-Cofactor
 酵素蛋白部分 : p-Apo 酵素
 チロシン : 終末濃度 $2 \times 10^{-3} \text{M}$
 Cu^{2+} (+) : 終末濃度 $1.5 \times 10^{-3} \text{M}$
 反応開始はチロシン添加時とする

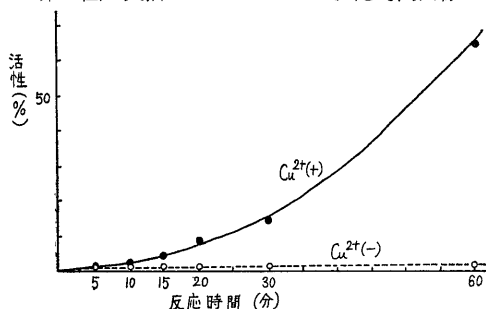
素反応に必須因子でないことを示した。ただ Cu^{2+} は反応速度に影響を与えるようであった (第35図)。

次に Cu^{2+} を添加した場合と、しない場合につき、Cofactor 濃度と反応速度との関係を求めて次の結果を得た (第36図)。すなわち、 Cu^{2+} を添加しない場合は一次シグモイド型、 Cu^{2+} を添加した場合は二次シグモイド型の理論曲線に一致した。この場合 Cofactor 濃度は、Dowex 2 で再クロマトグラフィーを行って得た p-Cofactor 液を 1 として希釈した濃度を示し、Cofactor の各濃度につき反応時間曲線を描き、それより反応速度を求めた。反応速度-Cofactor 濃度曲線の図表に Cofactor は横軸に濃度の逆対数 $p[\text{Co}] = -\log [\text{Co}]$ を、縦軸には反応速度の相対値 (V : 第2章 6) iii) を参照) をとって plot した。

第36図 反応速度-Cofactor 濃度曲線



第37図 失活 Cofactor による反応時間曲線



又、室温に数日放置して活性低下をみた p-Cofactor を用いて、 Cu^{2+} を添加した場合と、しない場合との反応時間曲線を描いて第37図を得た。すなわち、 Cu^{2+} を添加しない場合は全く活性を示さず、 Cu^{2+} を添加した時にのみ誘導期を示して活性の上昇が見られた。

これらの現象は第4章にて詳細に考察されるであろう。

考 察

現在知られている酵素の Cofactor としては、酵素蛋白部分と相当強固に結合して、むしろその一部と見なし得るものから、金属の如き物質に至るまで、Prosthetic group, Coenzyme, あるいは Activator と、それぞれの名称が与えられているが、いずれも低分子量の透析可能な物質であり、その存在の発見、確認及び性格決定は、酵素蛋白を解析する上にきわめて重要である。さて一般に、抽出酵素系を用いてそれを、透析、塩析、限外濾過等の手段に訴え、あるいは酵素希釈の活性に及ぼす影響とか、吸着剤による吸着分離をしらべて、その酵素系に存する Cofactor を発見、同定することは、今までよく行われて来た方法である。

この報告で、著者は、顎下腺 Tyrosine iodinase が、触媒的活性な非蛋白部分である Cofactor を必須因子として有していることを、上述の方法によつて確認した実験結果を述べたが、更に Cofactor の単離、精製、結晶化並びにその性格の特徴を解析した経過につき考察、検討を加えたいと思う。

透析は一般に抽出酵素系から Cofactor を分離する最も典型的な方法である。Tyrosine iodinase においても、その γ -Holo 酵素を水に対し透析することにより活性低下を示した現象について、その原因としては 1) pH の変化による酵素蛋白の変性化、2) 酵素の透析膜への吸着、3) Cofactor の透析膜透過等が考えられるが、透析外液をリン酸緩衝液にて pH 7.6 (酵素の至適 pH) とした場合にもやはり活性の低下を示す事実、又、透析膜としてのセロファンは酸性 (陽性) 膜であり酵素蛋白 (中性又は弱アルカリ性で陰性に荷電) を幾分吸着することはあつても一般にその量はわずかであり、内液が膜の接触面に比し比較的大なるこの実験ではほとんど問題にならないという事実等が認められている以上、結局 γ -Holo 酵素がその透析性の Cofactor を失つて活性を低下せしめられたと見るべき妥当性が生じてくる。それは、透析外液を透析内液又は γ -Apo 酵素に添加して活性上昇を示す実験により確かめられた。

一般に酵素液を硫酸などの塩析により沈澱させれば、Cofactor は塩析上清に移行し、蛋白部分と分け得る。例えば、Warburg & Christian はこの方法により黄色酵素から、FAD, FMN 等の Cofactor を分離している⁶⁰⁾。ここで述べた実験でも、 γ -Holo 酵素の

塩析により、単位蛋白量の酵素活性が低下した現象は Cofactor の存在を示唆したものであろう。それは、透析により活性低下した酵素液に塩析上清を添加した実験において、活性上昇を示したことから確かめられた。

限外濾過により Cofactor を分離しようとする試みは必ずしも満足な結果ではなかつたが、これは濾過膜としてのコロジオン濾紙を常に一定の透過性を有するものとして作り得なかつた技術的欠陥にもよる。しかし、Cofactor の存在を否定する結果は見いだされない。

又、抽出単一酵素系において、過剰の基質がある場合に達する極限速度は酵素の濃度に比例するはずである。ところが、 γ -Holo 酵素の希釈が、反応速度に及ぼす影響をしらべたところ、酵素濃度の希釈に伴い、反応速度は急速に減少してゆくことがわかつた。抽出酵素系の濃度と活性が比例しないからといつて、Cofactor が必ず存在するとは断定出来ないが、その存在を暗示するものとして認めてもよいであらう。ただ、そのような粗抽出酵素系は、種々の共存蛋白及び非蛋白物質を含んでいるので、共存物質並びに Cofactor を積極的に酵素蛋白部分から分離し、外から Cofactor を加えて酵素系の作用を見る添加実験の結果を明らかにすることは、Cofactor を確認する上に非常に重要なこととなる。

吸着クロマトグラフィーにより γ -Holo 酵素から蛋白部分と Cofactor を分離する最初の試みとして Calcium phosphate gel-Hyfflosupercell column を使用したが、後になつて Hyfflosupercell が蛋白を吸着して結果をまぎらわしくすることがわかつたので⁶¹⁾、Tiselius により記載された Hydroxylapatite のみで分離し、添加実験を行つて Cofactor の確認に意義ある結果を得た (始めに Hyfflosupercell を用いたのは、溶離流出速度を幾分でも早くするためである)。一般に蛋白は Hydroxylapatite に低いイオン強度で吸着され、同一 pH のより高いイオン強度で溶離される⁶¹⁾。それ故に試料としての γ -Holo 酵素は、イオン強度を低くするため、20倍に希釈してカラムに吸着させる。Stepwise elution においては低分子物質より順次溶離されてくることが多いので、Batchwise 法による低いイオン強度での Cofactor 分離とにらみ合せて、それは低分子物質であることが示唆される。

又、顎下腺ホモジネート及び熱処理濾液の酵素活性が低いのに、これを透析すれば活性の上昇を見るのは、先に石川等²⁷⁾により見出された顎下腺の透析性阻害物質が除かれたためと見るべきであり、リン酸カ

ルシウムゲルに対する Cofactor の態度が真の吸着ではなく、それが、吸着カルシウムゲル遠心上清に多量に含まれているという事実と相まって、リン酸カルシウムゲル上清よりこの阻害物質を、透析以外の方法で除くことが Cofactor 精製の初段階となるであろう。

そこで陰イオン交換樹脂 Dowex 2 (×8), 又は Dowex 1 (×2) のギ酸型を用い、pH 7.8, ギ酸アンモニウムを溶離液としてカラム・クロマトグラフィーを行い、Tyrosine iodinase の Cofactor を単離した。それは紫外吸収を有せず、ジアゾ、ニンヒドリン等の呈色反応も陰性であるので、添加実験による活性測定にて分画の Cofactor を同定した。活性極大のピークは溶離液の pH が低下するにつれて左方 (低濃度) へ移動し、かつ、幅広くなる故、pH 7.8 が最も適しているようである。Cofactor 部分は溶離流出分画の pH が急激に上昇する前後において大部分溶離される (第28図参照)。Dowex 2 において活性極大がほぼ一つのピークとして溶離されてくるに反し、Dowex 1 においては、ピークが二相性を示しているらしく見える。しかし冷アセトンによる結晶化は最大活性部分においてのみ可能である。Tris 緩衝液による溶離はピークの幅が広く、活性が低くなつて満足すべき結果には見えない。

なお、連続濾紙電気泳動法、Zone electrophoresis 等による Cofactor の分離は今まで失敗に終つた。

Cofactor を含む透析外液及び限外濾液の吸収スペクトルは紫外部の 260m μ 附近に極大吸収があるように思われるし、Batchwise 法による Cofactor も 260m μ に極大吸収があるように見える。しかし Cofactor 活性が必ずしも 260m μ の極大吸収値に比例しないし、又、Cofactor を精製するに従い、260m μ の吸収が低下し、Dowex 2 による再クロマトグラフィーではほとんど認められない。故に 260m μ の吸収は、この Cofactor の持つ特異的なものではなく、抽出に際し共存する物質の吸収と見なすべきであろう。

陰イオン交換樹脂により捕捉され、陽イオン交換樹脂により捕捉されないことは Cofactor が Anion 性物質 (negative charged substance) であることを示す。もし、Cu²⁺、Mn²⁺ 及び NH₄⁺ 等が Cofactor の本性と直接関係があるとすれば、それらは陽イオン交換樹脂に捕捉される故に通過した液は活性の低下が見られるはずである。しかし陽イオン交換樹脂を通過させても活性低下が見られないところから、イオン化し得る銅、マンガン等の金属は Cofactor には含まれていないように思われる。溶離液 (pH 7.8, ギ酸アン

モニウム液) 中の Cofactor は冷アセトン結晶化するが、陽イオン交換樹脂を通してアンモニウム・イオンを除去したものは結晶化しないところから、Cofactor の結晶はアンモニウム塩の形になっているのではないかと想像される。

Tong²⁶⁾ 等は甲状腺細胞顆粒 (ミトコンドリア及びミクロゾーム) を用いての実験で、フラビン系の Cofactor がヨウ素の有機化を増大させることを示しているが、p-Apo 酵素に、FMN を添加した実験では、終末濃度 10⁻³M で、Cu²⁺ が共存しない時のみ、対照の 1/2 程度の活性を示したに過ぎない。

以上、ここに抽出・単離された Cofactor はフラビン系物質とは異なると思われる新しい物質である。

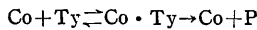
なお、嫌気的条件下で酵素反応が抑制されるけれども、それだけで、この酵素系が酸化還元系に関与し、Cofactor がその電子伝達系の一翼をになつてしていると解釈するのは早計であろう。

生体内に今まで知られている多くの微量金属元素の大部分は遷移元素であり、殊に、鉄、銅、マンガン、コバルト、ニッケル等は、生細胞の生命維持、生合成に密接な関係のある酵素反応に、種々の影響を与えている。これらの金属が Tyrosine iodinase (γ -Holo 酵素) に及ぼす効果をしらべて、銅、マンガン、鉄、(殊に銅) がこの酵素活性に著しい影響を与えることを見た。Cu²⁺ は Weiss のホモジェネート系では必須の要素であつたし、Fawcett & Kirkwood によるホモジェネート系でも重要な役割を演じている。けれども、生理的条件下の甲状腺の機能で銅の役割は明確には決定されていない。ただ甲状腺組織中に、銅⁶¹⁾、マンガン^{62) 63)} が比較的多く含まれているという事実は、この酵素反応の生体内における意義に何らかの手がかりを与えるかも知れない。さて、一般に、金属元素は酵素反応に関与する方法において、現在、1) 金属イオンが存在しなくても、いくらかの活性は存するが、その存在又は添加により著しく活性を増大させる Activator としての金属と、2) 金属イオンが存在しない場合は全く活性が見られず、金属イオンが酵素反応に必須であつて、酵素蛋白と何らかの結合をしている Cofactor としてあつかわれるものとに大別される。

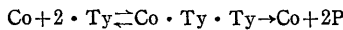
このヨウ素有機化反応においても、Cu²⁺ 要求が必須のものであるか否かについては諸家により議論されてきたところではあるが、著者は in vitro における p-Cofactor と p-Apo 酵素を用いての実験で、Cu²⁺ の添加は酵素反応速度を増大せしめるが、必須因子ではないことを明らかにした。しからば Cu²⁺ は如何なる

役割をこの酵素系に演じているのであろうか。これについては、既に一部意見を述べてあるが³⁰⁾、反応速度—Cofactor 濃度曲線において、 Cu^{2+} を添加しない場合は一次シグモイド型、 Cu^{2+} を添加した場合は二次シグモイド型を示したことから、

(I) Cu^{2+} (—) の場合



(II) Cu^{2+} (+) の場合



Co: Cofactor, Ty: Tyrosine,

P: 生成物 (モノヨードチロシン)

なる反応が行われたと考えてよい。

(I) の場合は Co が Ty と一個の反応基で酵素基質複合体を形成した後、一個の P を生成する反応である。

(II) の反応式からは、

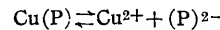
a) Co が本来有している反応基と、 Cu^{2+} の作用による新たな反応基とにより二個の Ty が反応して酵素基質複合体を形成する可能性、及び、

b) 二個の Ty と添加せる Cu^{2+} とが作るチロシン銅錯塩 (Ty-Cu-Ty) が、Co の本来有している反応基と反応して酵素基質複合体を形成する可能性、

との二つが考えられる。しかし第37図からわかるように、Cofactor の活性低下した時に Cu^{2+} (—) では活性がなく、 Cu^{2+} (+) で徐々に活性化され誘導期を示して反応する現象より、b) を否定し、a) の可能性を支持することとなる。なぜなら、誘導期は、Cofactor の活性低下により本来の活性基を失ってチロシンと複合体を作り得なくなった酵素系が、 Cu^{2+} の添加により活性化されて新たな反応基を形成しつつある現象と解釈できるからである。すなわち Cu^{2+} の役割は、本来有していた基質結合反応基以外の新たな反応基を酵素系に与えるのであろう。

Cu^{2+} と卵アルブミン⁶⁴⁾ 又は Cu^{2+} とリン酸カルシウムゲル⁵⁶⁾ との混合物はオキシダーゼと同様な作用を示す酵素模型として示されている。このことは、リン酸カルシウムゲル上清より Cofactor を単離しているこの報告において、非特異的なオキシダーゼ作用を疑わしむる可能性を含む。しかし、Cofactor のリン酸カルシウムゲルに対する吸着可逆性の実験事実、並びに Cofactor 液を陽イオン交換樹脂に通してもその活性低下が見られない事実等より、Cofactor 中にイオン化し得る銅が含まれていないことを示して、それが人工的産物であるかも知れぬとの疑いを解消せしめた。なぜなら Cu^{2+} とリン酸カルシウムゲルとの酵素模型は、その結合においてイオン結合以外の様式は

考えにくく、従つて次のように解離するからである。



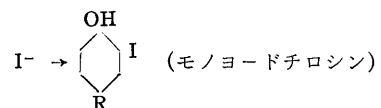
P はリン酸カルシウムゲル又は非特異的な蛋白を示す。

なお、この酵素反応における速度論的解析及び阻害剤の作用型式については、既に発表したが³⁰⁾、チロシンを基質としての反応速度—基質濃度曲線は理論式より導いた一次シグモイド型曲線に一致し、Michaelis 定数は $6.6 \times 10^{-4} \text{ M/I}$ であつた。又アニリン (p-トルイジンを用う) の阻害型式は Astwood が予測した如く⁶⁵⁾⁶⁶⁾、チロシンに対する拮抗的阻害であることを証明した。

さて、この報告では、顎下腺 Tyrosine iodinase について、主としてその Cofactor に関する実験結果を述べたが、甲状腺においても Tyrosine iodinase 活性が認められることは既に、Fawcett & Kirkwood も報告しているし、又、渡辺³²⁾によつても確かめられ、その単離の方向にすすんでいる。われわれは甲状腺内ヨウ素代謝を酵素反応の段階において把握しようとするところに、甲状腺生化学の一つの方向を認めるのであるが、Tyrosine iodinase の存在が確定的なものとなつた現在、それは、サイロキシン合成に関してその初段階を支配するものとならう。

総 括

サイロキシンの生合成過程において、無機ヨウ素を有機的結合に導く反応



を触媒する酵素“Tyrosine iodinase”に対する必須の Cofactor を、ウシ顎下腺中に見出したので、この報告でその過程および抽出・単離・精製の実験成績を示し、更にその性質の一端にも触れた。

1) 酵素活性測定は、ペーパー・クロマトグラム上の I^{131} の放射能を計測する方法で定量した。

2) Cofactor の存在は、透析、塩析、限外濾過、酵素希釈の影響等により予想され、吸着クロマトグラフィ—と Batchwise 法によりそれが確認された。

3) 抽出はウシ顎下腺ホモジェネートの熱抽出濾液を用い、そのリン酸カルシウムゲル吸着上清を、陰イオン交換樹脂カラム—Dowex 2 (×8) (150~300 mehs) ギ酸型—に捕捉せしめ、ギ酸アンモニウム

液の *stepwise elution* でクロマトグラフィーを行つて得た活性部分を、更に再クロマトグラフィーすることにより、高度の活性を有する *Cofactor* 液を調製し得た。

4) それは可視部、紫外部共に各波長における吸光を示さず、酸・アルカリに対してはやや不安定であり、又、100°C 10分では20%、100°C 30分では80%の活性低下を見た。ニンヒドリン反応、ドラージェンドルフ反応、ジアゾ反応等はすべて陰性であり、Tong等の想像するフラビン系酵素のそれとは異なる *native Cofactor* であり、冷アセトン (-20°C) で白濁し12時間後、針状白色の結晶として得られた。

5) 陽イオン交換樹脂 (Dowex 50) を通しても活性低下を見ないところから、それは *Anion* 性物質 (*negative charged substance*) であり、その上、イオン化し得る銅、マンガン等の金属を含まないものと思われる。

6) この *Cofactor* は *Apo* 酵素と共に、ヨウ素有機化反応を触媒するが、そのとき出来る有機ヨウ素はモノオードチロシンが唯一のものであり、嫌気的条件下によりこの反応が抑制されることも示した。

7) Cu^{2+} の添加はこの酵素活性に必須のものではないが、反応速度を増大せしめ得ることを示した。

最後に実験結果について、その成績を考察、検討し、*Cofactor* の発見・単離が、この酵素反応解析に大きな意義をもつことを明らかにした。

稿を終るに当り、御指導を頂いた恩師石川大刀雄教授並びに渡辺良三先生に深く感謝致します。

なお、種々御鞭撻を頂いた第一内科学教室、谷野富有夫教授、三辺義人助教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Kendall, E. C. : J. Biol. Chem., 39, 125 (1919).
- 2) Harington, C. R. : Biochem. J., 20, 293 (1926).
- 3) Harington, C. R. : ibid., 20, 300 (1926).
- 4) Roche, J., Lissitzky, S. & Michel, R. : Compt. Rend. Acad. Sci., 234, 997 (1952).
- 5) Roche, J., Lissitzky, S. & Michel, R. : Ann. pharm. franc., 10, 166 (1952).
- 6) Roche, J., Lissitzky, S. & Michel, R. : Biochim. Biophys. Acta, 2, 220 (1953).
- 7) Gross, J. & Pitt-Rivers, R. : Lancet, 262, 439 (1952).
- 8) Gross, J. & Pitt-Rivers, R. : Biochem. J., 53, 645 (1953).
- 9) Gross, J. & Pitt-Rivers, R. : Recent Progr. Hormone Research, 10, 113 (1954).
- 10) Roche, J. & Michel, R. : Ann. Rev. Biochem., 23, 481 (1954).
- 11) Gross, J. & Pitt-Rivers, R. : Vitamines & Hormones, 11, 159 (1953).
- 12) Westergfeld, W. W. & Lowe, C. : J. Biol. Chem., 145, 463 (1942).
- 13) Dempsey, E. W. : Endocrinology., 34, 27 (1944).
- 14) Dempsey, E. W. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 50, 336 (1949).
- 15) De Robertis, E. & Grasso, R. : Endocrinology., 38, 137 (1946).
- 16) Harington, C. : Biochem. J., 39, 157 (1945).
- 17) Harington, C. : Endocrinology., 39, 401 (1951).
- 18) Schachner, H., Franklin, A. L. & Chaikoff, I. L. : J. Biol. Chem., 151, 191 (1943).
- 19) Morton, M. E. & Chaikoff, I. L. : J. Biol. Chem., 147, 1 (1943).
- 13, 227 (1958).
- 20) Taurog, A., Chaikoff, I. L. & Franklin, A. L. : J. Biol. Chem., 161, 537 (1945).
- 21) Weiss, B. : J. Biol. Chem., 201, 31 (1953).
- 22) Wyngaarden, J. B. & Stanbury, J. B. : J. Biol. Chem., 212, 151 (1955).
- 23) Fawcett, D. M. & Kirkwood, S. : J. Biol. Chem., 205, 795 (1953).
- 24) Fawcett, D. M. & Kirkwood, S. : J. Biol. Chem., 209, 249 (1954).
- 25) Taurog, A., Potter, G. D., & Chaikoff, I. L. : J. Biol. Chem., 213, 119 (1955).
- 26) Tong, W., Taurog, A., & Chaikoff, I. L. : J. Biol. Chem., 227, 773 (1957).
- 27) 石川大刀雄 : 日病会誌, 45, 251 (1956).
- 28) 鈴木昭二 : 十全会誌, 印刷中.
- 29) 松本 治 : 十全会誌, 印刷中.
- 30) 石川大刀雄・渡辺良三・須山忠和・高沢嘉人 : 酸素化学シンポジウム, 13, 227 (1958).
- 31) Tiselius, A., S. Hjertén & O. Lenin : Arch. Biochem. Biophys., 65, 132 (1956).
- 32) Watanabe, R. : J. Biochem., in press.
- 33) Keilin, D. & Hartree, E. F. : Biochem. J., 49, 88 (1951).
- 34) Singer, T. P., & Kearneg, E. B. : Arch. Biochem., 29, 190 (1950).
- 35) Swingle, S. M. & Tiselius, A. : Biochem. J., 48, 171 (1951).
- 36) MacIntive, W. H. : Ind. Eng. Chem., 37, 164 (1945).
- 37) Sarkar, N. K. & Sumner, J. B. : Enzymologia., 14, 280 (1951).
- 38) Meister, A. : Biochemical Preparation., 2, 18 (1952).
- 39) Hubert, B., Schmitz,

- H., Brumm, A. F. & Potter, V. R. : J. Biol. Chem., 209, 23 (1954). 40) Gomori, G. : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 62, 33 (1946).
- 41) Boman, H. G. & Westlund, L. E. : Arch. Biochem. Biophys., 64, 217 (1956). 42) Farber, L. : Science, 82, 158 (1935). 43) Child, D. S. : J. Clin. Invest., 29, 726 (1950).
- 44) Kornberg, A. & Pricer, W. E. : Biochem. Preparation., 3, 20 (1953). 45) 奥貫一夫・野崎光洋 : 酸素研究法 (赤堀四郎編), I, 682頁, 東京, 朝倉書店, 1955. 46) Yagi, K., Okuda, J. & Matsuoka, Y. : Nature., 175, 555 (1955). 47) Stadtman, E. R. & Kornberg, A. : J. Biol. Chem., 203, 47 (1953). 48) Neilands, J. B. & Akeson, A. : J. Biol. Chem., 188, 307 (1951).
- 49) Beinert, H., VonKorff, R. W., Green, D. E., Buyske, D. A., Handschumacher, R. E., Higgins, H. & Strong, F. M. : J. Am. Chem. Soc., 74, 854 (1952). 50) Paléus, S. & Neilands, J. B. : Acta Chem. Scand., 4, 1024 (1950). 51) Margolis, E. : Biochem. J., 56, 529, 535 (1954). 52) Grassmann, W. & Hannig, K. : Z. physiol. Chem., 292, 32 (1953). 53) 松尾 裕・服部 信 : 日新医学, 43, 275 (1956). 54) 奥貫一夫 : 酵素研究法 (赤堀四郎編), I, 19頁, 東京, 朝倉書店, 1955. 55) Barron, E. S. G. : Advances in Enzymol., 11, 223 (1951). 56) Lampitt, L. : Biochem. J., 38, XV (1944).
- 57) 佐竹一夫・林 誠 : 蛋白質化学 (赤堀四郎, 水島三一郎編), I, 141頁, 東京, 共立出版, 1954. 58) (I) 刈米達夫・橋本庸平 : 薬学雑誌, 71, 436 (1951). (II) 古谷 潔 : 薬学研究, 23, 299 (1951). 59) Bruce, N. Ames & Mitchell, H. K. : J. Am. Chem. Soc., 74, 252 (1952). 60) Warburg, O. & Christian, W. : Naturwissen., 20, 688, 980 (1932).
- 61) Shapiro, M. Ya. : Biokimiya, 13, 323 (1948). Chemical Abstracts (1952) から引用. 62) Born, H. J. Tinoféelf-Reisowsky, H. A. & Wolf, P. M. : Naturwiss., 31, 246 (1943). 63) Deysach, L. J. & Ray, T. W. : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 71, 162 (1949). 64) McCarthy, J. : J. Biol. Chem., 128, 455 (1939). 65) Astwood, E. B. : Ann. Int. Med., 30, 1087 (1949). 66) Astwood, E. B. : J. Clin. Endocrinol., 4, 229 (1944).

Abstract

Recently, the synthesis of organic iodine compounds from thyroid and submaxillary homogenates was reported by Fawcett and Kirkwood, and these workers indicated the presence, in thyroid and submaxillary tissue, of an enzyme "Tyrosine iodinase" which formed organically bound iodine compounds.

We described in the previous paper from our laboratory, that tyrosine iodinase from submaxillary gland catalysed the monoiodination of added tyrosine.

In the experiments reported here, I described the presence of cofactor which was an essential component of tyrosine iodinase. Isolation and purification of cofactor were carried out by means of the anion exchange resin (Dowex 2) chromatographic technique, and characteristic features of cofactor were investigated.

1) Estimation of enzyme activity was carried out according to modified Taurog's procedure.

The existence of cofactor was expected by dialysis, salting-out and ultrafiltration of the enzyme solution, and then was confirmed with absorbed chromatographic technique (Hydroxylapatite) and Batchwise operation.

2) Isolation and purification of cofactor:

The crude cofactor extract obtained from heat-treated submaxillary homogenate was mixed with a calcium phosphate gel. Centrifuged supernatant of the mixture was applied on an anion exchange column (Dowex 2 \times 8, Formate-form) and then chromatographed in stepwise elution with increasing concentrations of NH_4 -formate buffer pH 7.8. The active cofactor fraction were rechromatographed using Dowex 2 column. And thus, highly purified active cofactor preparation was isolated.

3) The characteristic features of cofactor:

Purified cofactor solution was colorless, somewhat unstable against acid or alkali; heating at 100°C for 30 minutes, 80 per cent of its activity was destroyed. Cofactor was negative in ninhydrin-, Drangendorf- and diazo-reaction. Since the cofactor had no absorption at 260 $m\mu$, it was the specific native one which differed from the flavine cofactor. Even when the cofactor solution was passed through a cation exchange resin (Dowex 50), its activity did not decrease. Hence, it was concluded that the cofactor was a negative charged substance (anionic substances) and did not contain metal ions such as Cu^{2+} or Mn^{2+} .

Moreover, it got gradually inactivated even when it was kept at 40°C and in a week or two it was completely lost.

4) Crystalization:

The yield of cofactor obtained in the pure state was only a very small amount, so the crystalization of cofactor was not successful.

5) Effect of Cu^{2+} -addition:

Organic iodine compound formed by purified enzyme system (apo-protein and cofactor) was only monoiodotyrosine; hence, it was confirmed that this enzyme catalysed a reaction of monoiodination of added tyrosine.

It was demonstrated that addition of Cu^{2+} was not essential for this catalytic reaction but it increased the reaction velocity. This reaction was inhibited by anaerobic conditions through the Thunberg tube.

6) The conditions of the extraction and the various conditions concerning with identification of the cofactor were discussed in this paper.
