

顎下腺 “チロジンヨージナーゼ” について

—その抽出、並びに阻害物質—

金沢大学医学部第二病理学教室(主任 石川大刀雄教授)

鈴木 昭 二

(昭和35年3月29日受付)

甲状腺におけるサイロキシンの生成の過程は、放射性ヨウ素が利用されて以来¹⁾²⁾ その殆んどが明らかにされている。即ち、 $I^- \rightarrow$ 甲状腺内への trapping, $I^- \rightarrow I_2 \rightarrow$ モノヨードチロシン (MIT) \rightarrow ジヨードチロシン (DIT) \rightarrow サイログロブリン \rightarrow 甲状腺ホルモンの過程と考えられている³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾。

生成過程は明らかにされたが、その個々の段階の合成の化学的な機構は、殆んどが未解決のままである。

“Iodine trap”の機構は、ある酵素作用によるものとする説と⁸⁾、ある特殊な蛋白がヨウ素を容易に結合するとする説⁹⁾¹⁰⁾、との2説があげられるが、教室同人松本¹¹⁾の抽出した蛋白がこれに関与するものと考えている。

$I^- \rightarrow I_2 \rightarrow$ MITの機構に関しては、Weiss¹²⁾が甲状腺ホモジネートに銅イオン (Cu^{2+}) 並びにチロシンを加えて始めてヨウ素アミノ酸の生成されることを見出し、Fawcett & Kirkwood^{13) 14)}が更に、この反応を追求して甲状腺並びに顎下腺ホモジネート中に存するこの作用を、チロシンのヨウ素化を触媒する酵素の作用となし、“チロジンヨージナーゼ Tyrosine iodinase”と命名した。更にこの酵素の臓器分布も明らかとなし、甲状腺より顎下腺、耳下腺により高く分布することを明らかにした。Taurog 等は¹⁵⁾、又甲状腺のホモジネート、並びにそのミトコンドリアを用いてこの反応に対する実験を進め、銅イオン、チロシンの添加がなくても、反応終末液を酵素的に加水分解することにより、MITが生成されることを見出している。

DIT \rightarrow サイログロブリン、即ち DIT \rightarrow I_4 、DITの化学的縮合反応も又酵素作用による反応だと称されているが^{16) 17)}、その機構は未だ明らかではない。

われわれ研究同人は、このホルモン生成に対する研究を進め、就中 $I^- \rightarrow I_2 \rightarrow$ MITの反応を触媒する酵素

“チロジンヨージナーゼ”の性質解明、反応機構の解析を行い、最近に至り、その酵素が Apo-Enzyme と Co-factor から成り立つことを証明し、その反応機構をも明らかとした¹⁸⁾。

著者はこの酵素に対する初段階の精製を、主として牛の顎下腺を用いて行い、又この酵素の各種の阻害物質に対する実験を担当し、生体内に存在するこの酵素の阻害物質を見出したので、その実験結果を報告する。

実験材料並びに実験方法

A. 実験材料

i) 顎下腺

使用せる顎下腺はすべて、屠殺場にて屠殺せる牛の顎下腺である。通常新鮮なる顎下腺をただちに氷室内で処理し、実験に使用した。或いは新鮮顎下腺を $-18^\circ C$ に凍結せしめ、48~72時間後取り出し流水中に放置し、ゆう解するのを待つて処理したものも使用した。なお後者の方法を経過した材料を用いても、酵素活性の低下は認められなかつた。

顎下腺以外の臓器はすべて屠殺した牛の新鮮標品を使用した。

ii) チロジンヨージナーゼ標品 (Tyrosine-iodinase) 活性度高く、且つ常にほぼ一定した活性度を有する酵素標品を下記の方法で調製した。顎下腺に附着した脂肪、被膜等を鋏を用いて出来得る限り除去した後、顎下腺実質を鋏で細かく切り刻み、この顎下腺細片 300g を数回に分け、500ml の N/20 醋酸ソーダ溶液でワーリングブレンダーにかけ、クリーム状を呈するホモジネートとする。次いで顎下腺ホモジネートをビーカー中に集め、水浴中で $65^\circ C$ 、5分間、熱処理を加え、冷却を待つてガーゼで圧縮濾過し、粗大残屑を除去する。濾過液を 4000 r.p.m. 10分間、遠心し、

On the “Tyrosine Iodinase” in the Submaxillary Glands, its Extraction and Inhibitors. Shoji Suzuki, Department of Pathology (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, University of Kanazawa.

上澄液を更にペーパーパルプを用いて吸引濾過を行い、澄明な抽出液を得る。抽出液をあらかじめ調製された磷酸カルシュームゲル分散液に混合し、10~15分間、充分攪拌し、ただちに遠心分離し、その上清を捨て、磷酸カルシュームゲルを 1/10 M pH 7.6 磷酸緩衝液に 0.3M 濃度に硫酸アンモニウムを加えた溶出液約 60ml を加え、硝子棒で充分均一化させ溶出せしめる。再び遠心分離し、その上澄液をチロジンヨージナーゼ (Tyrosine iodinase) 標品として使用した。一般に顎下腺中のチロジンヨージナーゼ活性は、その個体及び季節によつて非常に変化し、殊にその季節的変動は著明であるが、平均して30%ホモジネートでは約40%の活性度(有機ヨード変換率)を示したが、上述の方法により調製せられた酵素標品は、約70%の活性度を有し、且つ季節的変動もなくほぼ一定した活性値を示した。

磷酸カルシュームゲルの調製

10g の塩化カルシューム (CaCl₂ · 2H₂O) を 100ml の蒸留水に溶解し、15g の第二磷酸ソーダ (Na₂HPO₄ · 12H₂O) を 100ml の蒸留水に溶解し、両者を攪拌しながら瞬時に混合する。次いでアンモニヤにて混合液の pH を 8.3~8.6 に補正する。多量の蒸留水を加えて攪拌、放置、磷酸カルシュームゲルの沈降を待つて上澄を静かに充分傾捨する。

4 回蒸留水による洗滌を繰返し、使用に供する。磷酸カルシュームゲルは使用に際し、その都度新製する¹⁹⁾²⁰⁾。

iii) 阻害剤

本実験に使用した阻害剤中チステイン誘導体、並びに銅試薬の一部は千葉大学薬学部宮木教授より贈与を受けた。

iv) I¹³¹ (放射性ヨウ度)

日本放射性同位元素協会より入手した I¹³¹ をその半減期を考慮して適当に稀釈使用した。時にはその I¹³¹ 中に酵素活性を低下させる物質が含まれていたことがあつたが、それは溶解液に含まれていたチオ硫酸ソーダの含量の多少によるものと思われ、その場合には、塩酸性とし、N/50 K₂MnO₇ (過マンガン酸カリ) を僅かに着色する迄加え、その後亜鉛末を加えて還元使用した。

B. 実験方法

i) 酵素活性の測定方法

酵素活性を測定するには、通常次の組成の反応液を調製する。

| | |
|---------------------------|--------|
| 0.1M 磷酸緩衝液 | 0.06ml |
| 5 × 10 ⁻⁵ M KI | 0.05ml |

| | |
|------------------|------------------|
| I ¹³¹ | 10μc (0.5ml に規正) |
| 0.04M チロシン | 0.02ml |
| 被験液 | 0.1ml |
| 酵素液 | 0.2ml |
| 0.04M 硫酸銅 | 0.02ml |
| 全量 0.5ml | |

調製にあつては、上記の順に従い、酵素液の添加の時をもつて反応開始時とする。硫酸銅液は酵素液添加前に加えると、磷酸銅の沈澱を生ずるので酵素液添加後に加える。なお対照として被験液の代りに 0.1ml の 0.1M 磷酸緩衝液を加えて実験を行つた。

上述の反応液を小試験管に入れ、37°C の恒温槽内にて、1 時間反応せしめる。反応終了後、10%チオ硫酸ソーダ液 0.1ml を加え反応を停止せしめる。

生成ヨウ素各分割の別は次に記すペーパークロマトグラフィーにより行い、モノヨードチロジン分割中のヨウ素量と、濾紙上ヨウ素量との率をもつて酵素活性度として表わした。

ii) ペーパークロマトグラフィー

ペーパークロマトグラフィーには 東洋濾紙 No. 50 を使用した。

あらかじめ、1/10 N. pH. 7.8 磷酸緩衝液を濾紙上に充分噴霧して緩衝化し、濾紙の一端より 8 cm の所を原点とし、原点に先ず 1 N チオ硫酸ソーダ溶液約 30ml を塗布し、その乾燥を待つて既述各反応液をガラス毛細管にて 2~3 回原点に塗布する。乾燥後、室温中にて約 1 時間放置した後、ブタノール：水：氷醋酸 4:2:1 の溶媒にて上昇法一次展開を行なつた、原点より 15~20cm 迄展開させ、乾燥、濾紙を 1cm 幅の細片としてその各細片の放射能をガイガー・ミュラー計数器にて測定した¹⁹⁾²¹⁾²²⁾。

シンチレーションカウンターが装置された後は、各分割の概略位置をガイガー・ミュラー計数管により測定した後、その部を切出し、シンチレーションカウンターにより計数を行つた。酵素液を上記方法により反応、展開せしめた濾紙のラジオアウトグラフィーの像は図 1 の如くである。

1 種毎に細切して計数したグラフの 1 例を図 2 に示した。

グラフの各値は測定時のバックグラウンドを差し引いた値を示した。グラフより計算すれば、

$$\left. \begin{array}{l} \text{原点} \quad 196 \\ \text{MIT} \quad 1790 \end{array} \right\} \text{有機ヨード} = 1986$$

$$\text{全ヨード} = 2547$$

酵素活性度を有機ヨード量/全ヨード量で表わせば、

$$\frac{\text{有機ヨード量}}{\text{全ヨード量}} = \frac{1986}{2547} \times 100 = 79$$

図 1

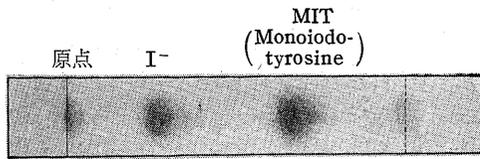
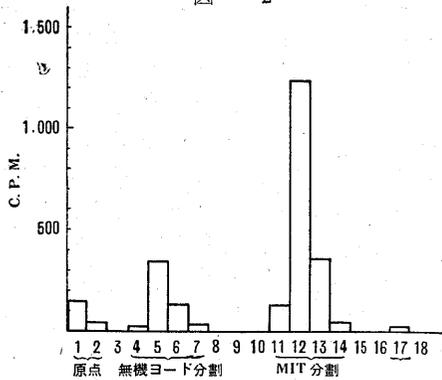


図 2



酵素活性 79%となる。

原点に計数される放射能は蛋白に結合したヨードの示すものであり²⁰⁾、酵素活性を表わす場合には、有機分割として表わさるべきものである。

iii) 陰イオン交換樹脂によるカラムクロマトグラフィー

イオン交換樹脂は Amberlite IRA-400 を使用した。

市販樹脂を乳鉢にて磨砕し、120~200メッシュの部分を選別する。N-NaOH溶液を樹脂の3倍量加え、よく攪拌し、交換を起させた後、10倍量の蒸溜水にて上清がpH 8.5以下になる迄5~6回洗滌する。この樹脂にN-HCl溶液3倍量を加え、よく攪拌して、Cl-typeに変化させ、更に4~5回水洗した後、真空瓶中に移して水流ポンプで減圧し、樹脂に附着せる気泡を除く。所要のカラム、例えば、直径12mm、長さ200mm、底部に活栓を付したガラス管の活栓上部にガラス綿を入れ、それに等量の水に懸濁させた樹脂を流し込む。ガラス管はその際、垂直に保持し、均一な樹脂の層を形成せしめる。樹脂層の高さを所要の高さに規正して、上部に連結した容器より蒸溜水を流下させて更によく洗滌する。

必要に応じ、緩衝液を通過させて樹脂を緩衝化して置く。

準備完了した樹脂に試料液を1時間100mlの割に通過させる。通過の速度はカラムの底部の活栓により調節する。

吸着の終つた樹脂は適当な溶出液を用いて1時間5

mlの割に溶出を行い、溶出液はオートマチックフラクションコレクターで1分割当たり、3mlに分別捕集する¹⁹⁾²⁴⁾。

実験結果並びに考案

1) 酵素の精製並びに活性測定方法について

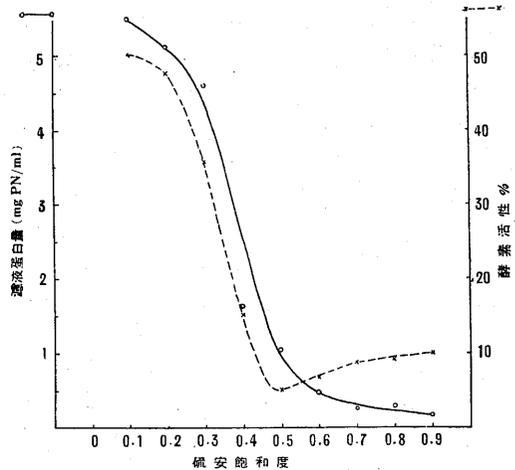
i) 酵素の精製

顎下腺のホモジネート自体の酵素活性については第三項に詳記するように、個体差、季節的な変動が甚だしく、一定の値を示すことが困難であつたので、抽出液の精製を行い、ほぼ一定の酵素活性を示す迄処理した。その基礎的な実験結果を記す。

イ) 硫酸による塩析

顎下腺ホモジネートを用いて、塩析範囲の測定を行った結果は図3のようである²⁵⁾。

図 3



ホモジネート10ml宛に、乳鉢でよくすりつぶした結晶硫酸を、0.1~0.9飽和に達する量を、ガラス棒を用いて、よく攪拌しながら加え、アンモニアを用いてpHを5.6に補正した後、小さな濾紙で自然濾過を行う。その濾液を、流水中で4時間透析し、液量を蒸溜水を加えて15mlに迄補正し、その一部をとり、酵素活性を測定する。残りの2mlを更に蒸溜水中で一夜透析して、共存塩類をよく除いた後、その乾燥重量を測定して蛋白量となした。

塩析濃度を高めると、0.5飽和を越すと、残存せる蛋白は減少するにもかかわらず、酵素活性が逆に上昇する。蛋白量あたりの活性では、塩析濃度が高まるほど高くなるという理解し難い結果が生じ、次に行うべき硫酸による分別塩析に対して疑問を抱かせたので、硫酸による精製を放棄した。

ロ) 有機溶媒による沈澱

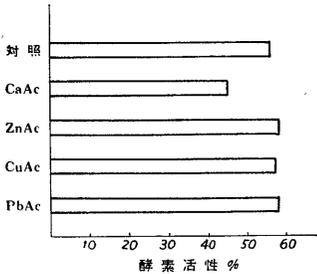
顎下腺ホモジネートをアルコール並びにアセトンを用いて、0°C以下で40%、60%の濃度に達しさせ、沈澱させた蛋白の溶解液の蛋白量あたりの酵素活性は、もとのホモジネートに比較して低下してくる。アセトン80%の濃度に達しさせても、なお同様であつた。有機溶媒による変性に起因するものか、或いは他の理由によるものかは不明であるが、有機溶媒による分別の精製法をも放棄した²⁰⁾²⁷⁾。

ハ) 金属塩処理

一般に酵素蛋白液の不純物除去方法として金属塩処理法が用いられる²⁸⁾²⁹⁾¹⁹⁾。

顎下腺ホモジネートに、カルシウム、亜鉛、銅、鉛の醋酸塩をpHの補正に注意しながら加え、その濾液の酵素活性を検べた結果は、図5の如くで、濾液は無色透明な液として得られ、酵素活性の減少は認められず、不純物除去方法としては有用な方法と認められる。

図 4



醋酸カルシウム処理によつて、若干活性の低下を見るのは、活性測定時に、水酸化カルシウムの沈澱を生じたので、それに起因するものと考えている。

二) 加熱処理

顎下腺抽出液を、各温度に一定に保つて、5~10分間、加熱して、凝固蛋白を遠心除去後、その酵素活性を測定した結果を図5に示した。

図 5

| 温 度 | 時 間 | 酵素活性 |
|-------|-----|------|
| — | — | 45 |
| 50°C | 5' | 46 |
| 60°C | 5' | 45 |
| 60°C | 10' | 44 |
| 70°C | 10' | 42 |
| 80°C | 10' | 15 |
| 90°C | 10' | 2.5 |
| 100°C | 10' | 1.5 |

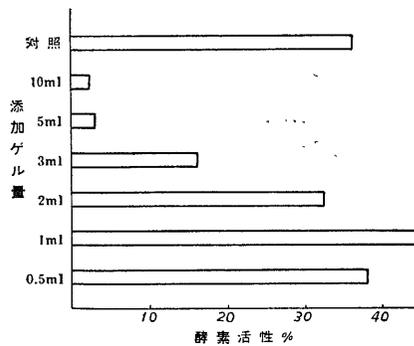
70°C、10分間の加熱処理まで酵素は安定で、それ以上の温度では失活する。安全度を見越して、60°C、10分間の加熱を行つたものは、かなりの量の凝固蛋白が除かれ、しかも酵素活性には殆んど変化を及ぼさない。加熱処理により以後の操作中酵素の安定性が増大し、なお不純物が除かれるので、次の段階の磷酸カルシウムゲルに対する酵素の吸着も容易となつた。

ホ) 磷酸カルシウムゲルによる吸着

熱処理した顎下腺ホモジネート (M/20 醋酸ソーダ液、30%ホモジネート) 10ml宛に磷酸カルシウムゲル浮遊液 (乾燥量 18mg/ml) 0.5ml~10mlをそれぞれ添加、攪拌遠心し、上清について各々その酵素活性を検した結果は図6の如くであり、磷酸カルシウムゲル使用量は、この濃度で顎下腺抽出液の半量で充分であつた。

磷酸カルシウムゲルの調製は、実験方法の項に記載した如くであるが、その吸着能は必ずしも一定せず、多少の差を有するので、以後の実験では、普通過剰と思われる量の磷酸カルシウムゲルを使用した。

図 6

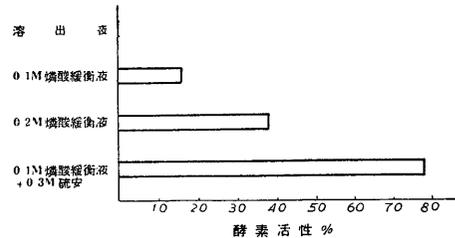


ヘ) 磷酸カルシウムゲルよりの溶出

30%ホモジネートにその半量の磷酸カルシウムゲルを用いて吸着させたが、ゲルよりの溶出試験の結果は図7に示した。

遠心沈下したゲルを3g宛試験管にとり、溶出液5mlを加え、攪拌、遠心し、上清の酵素活性を測定記載し

図 7



た。

磷酸カルシウムゲルにより吸着、溶出せしめた酵素液は、個体差、季節的変動等に起因する阻害因子が除かれ、常に一定の活性を示す標品が得られ、 -10°C の氷室内に保存すれば、最低1週間、同一活性を持続した。

ii) 酵素活性の測定方法について

イ) 反応時間について

実験方法の項に記した反応系を用いて、測定した反応時間曲線は図8の如くで、Fawcett & Kirkwood³⁰⁾の実験とはほぼ一致するが、基質ヨウ素を $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 添加することにより、より速い反応速度を示す曲線が得られた。

ロ) 反応の pH について

各 pH 値における活性測定結果は図9の如くで、Fawcett and Kirkwood³⁰⁾の結果とはほぼ一致した。

図 8

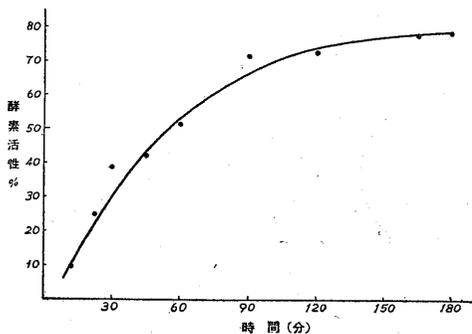
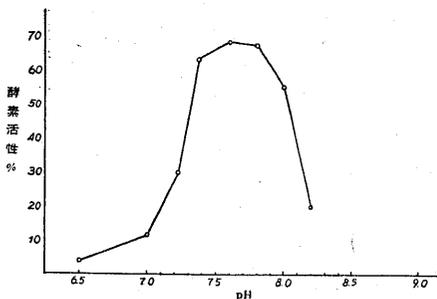


図 9



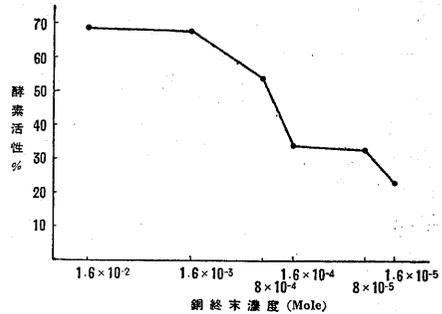
至適 pH は 7.6~7.8 である。

ハ) 銅イオン (Cu^{2+}) の添加について

銅イオンの添加は、硫酸銅 (CuSO_4) を用いて段階的に加えた時の酵素活性の変化は図10に示す如くで、銅イオン添加により、著明な活性の増大が見られる。

しかも、銅イオンの大量添加によつて、膠状析出物が大量に析出する時においてすらも、活性の低下は見

図 10



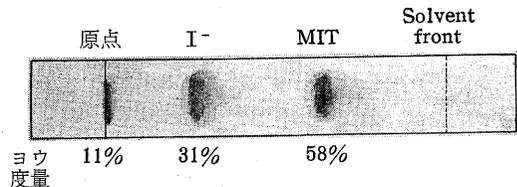
られない。ただし銅イオンを添加しない場合においても、かなりの活性が検出され得る。

Fawcett¹³⁾ が述べているように、銅イオンが $\text{I}^- \rightarrow \text{I}_2$ の酸化反応を司るものであるならば、銅イオンを添加しない場合には、活性は殆んど示されない筈であり、又本酵素が銅蛋白より構成されているかどうかの検討に対しても明確な結論を得ていない。銅イオンの活性増大に関与する機作については、最近に至り石川等¹¹⁾ が報告したように、Co-factor と蛋白との結合に銅イオンが関与することが考えられる。

ニ) チロシンの添加について

遊離のチロシンを終末濃度 $1.6 \times 10^{-3} \text{ M}$ に加えて1.5時間反応させ、濾紙クロマトグラフィーで展開させた後のラジオオートグラムは図11の如くである。

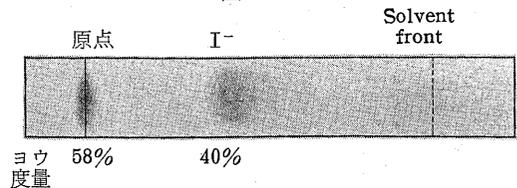
図 11



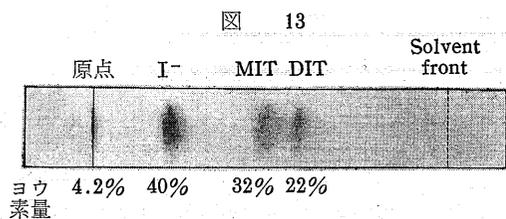
原点に少量の蛋白と結合したヨウ素が見られる以外、大部分は MIT (monoiodotyrosine) 及び I- 分割のみ現われ DIT (diiodotyrosine) の生成は全く見られない。

遊離のチロシンを添加しないで反応させた時の、ラジオオートグラフィー像は図12の如くで、反応したヨウ素は原点に大部分蛋白と結合した状態で止まる。

図 12



更にこの反応液をナガーゼ（細菌蛋白分解酵素）を用いて、8時間、加水分解した後のオートグラムは図13の如くである。



原点に止まったヨウ素と結合した蛋白は、大部分加水分解せられて、MIT 及び DIT として現われる。

遊離チロシンを $1.6 \times 10^{-3} M$ 濃度に加えた場合には、DIT の生成が全く認められず、遊離チロシンを加えないで、反応後、加水分解した場合に DIT の生成が明らかに認められた事実は、生体内におけるヨードチロシン生成の様相と照し合して興味深い事実である (23)(31)。

酵素活性測定の手段としては、以上の事実から、遊離チロシンを添加しても、しなくても、ヨウ素の有機化を起す率には大差を認めず、操作上遊離チロシン添加が有利であるので以後の実験には、チロシンを添加して行なつた。

遊離チロシン添加に関しては、Taurog et. al. (15) は牛の甲状腺のホモジネート及びミトコンドリアを用い、銅イオンと共に添加して、遊離の MIT 及び DIT の生成を認めているが、著者の実験においては上記の如く DIT の生成を認めなかつた。

又 Fawcett and Kirkwood (13) は遊離チロシンと銅イオンを共に加えた時のみ、ヨウ素の有機化が起る如く述べているが、著者の実験では上述の如く、チロシンを添加しなくても有機化が起つていることを示している。

ホ) ヨウ素（非放射性）の添加について

基質ヨウ素カリを段階的に添加した時の酵素活性を測定して図14の如き結果を得た。

終末濃度 $10^{-4} M$ 以上になると著明な反応阻害を起す。

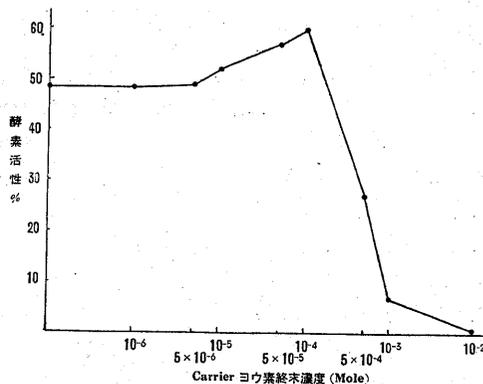
酵素活性測定の際に添加すべき Carrier のヨウ素量としては、 $5 \times 10^{-5} M$ が最適である。

iii) 有機化率の算定方法について

有機化ヨウ素と無機ヨウ素を分離する方法は、初期においては、四塩化炭素による抽出分離法が行なわれていた (12)。

この方法は、操作が繁雑であり、且つ又分離は不充分であつた。ペーパークロマトグラフィーの応用がこ

図 14



れを容易にし、しかも精度の高い結果が得られるようになった (13) (14)。

イ) ペーパークロマトグラフィーによる分離

濾紙を予め、M/10 磷酸緩衝液 pH 7.6 を用いて緩衝化し、原点に 1M チオ硫酸ソーダ液を塗布してヨウ素の酸化を防いだ後にクロマトグラフィーを行なつたものと、上述の予備処置を行なわなかつたものとの比較の 1 例を図15、図16に示す。展開溶媒として酸性溶媒を使用しているため、予備処置を行なわないと、ヨウ素の自然酸化が起り、濾紙全面に広範にヨウ素が分布するものと思われ、明確なるスポットを得ることが出来ず、酸性溶媒を用いてのヨウ素のペーパークロマトグラフィーには緩衝化、還元の前備処理は必須事項である。

なお本測定には、n-ブタノール：醋酸：水 (4:1:2) からなる混合溶媒を用いて、充分目的を達し得た。

図 15 緩衝化、還元の前備処理を施行したもの

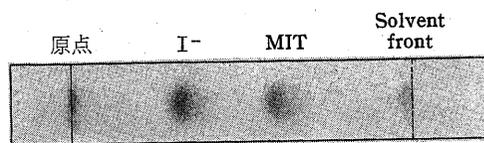
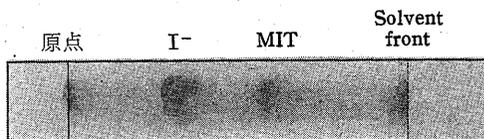


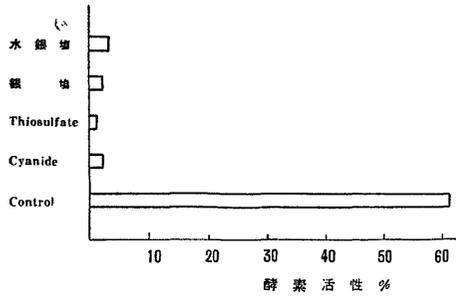
図 16 予備処理を施行しなかつたもの



ロ) 放射能測定方法

ガイガーカウンターを用い、1cm 毎に濾紙を切断し、その放射能を各々測定して算定したものと、シンチレーションカウンターを用いて各分劃を 1 回に測定

図 20



水銀塩、銀塩はヨウ素と不溶性の沈澱を生ずるので、そのため反応が阻止されるとも考えられるが、その他に、水銀並びに銀塩が酵素蛋白と結合して、それを不活性にするとも考えられる。

Thiosulfate の阻害はおそらくその還元作用により作用するものと考えられる。Cyanide は酵素液中に加え、透析によりそれを除いてもなお且つ阻害を示すことから、酵素蛋白に対する不可逆的な変性も考えられる。

3) 臓器内に存在する阻害物質について

顎下腺の粗抽出液の酵素活性は、一般に透析することにより増大される。特に冬期より夏期の方がその傾向が大である。、更に透析外液の濃縮液を一定の活性を有する酵素標品中に加え、それが阻害を示すことより、この酵素の阻害物質が顎下腺に含まれていることを見出し、それを精製し、その性質の一端を明らかにした。

i) 顎下腺粗抽出液酵素活性の季節的変動

新鮮顎下腺より下記の条件による一定の抽出液を作り、各月の活性平均値を図示すると図22の如く夏期に低く、冬期に高い値を示した。

即ち甲状腺の季節的生理活性と殆んど一致した勾配を形成した。

○粗抽出液の作り方

新鮮半顎下腺より実質のみ取り出し、10g を秤量し、鋏を用い細切した後に氷冷した pH 7.6 の M/10 磷酸緩衝液 40ml を初め 10ml、後 2 回、15ml 宛を加え、ワーリングブレンダーを用いてホモジネートとする。3000 r.p.m 10分間遠心して、磨砕残渣を除いた抽出液 (20%) を得、その活性を測定した。

ii) 透析による酵素活性の上昇

上記による顎下腺抽出液を蒸留水に対し、透析すると、常に酵素活性の上昇を認めた。即ち抽出液 10ml をセロファン膜内に入れ、蒸留水 2ℓ に対して 3°C の氷室中において24時間透析を行い、その透析内液及び

図 21

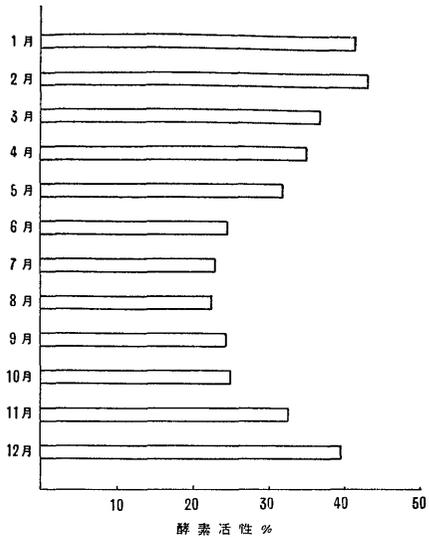
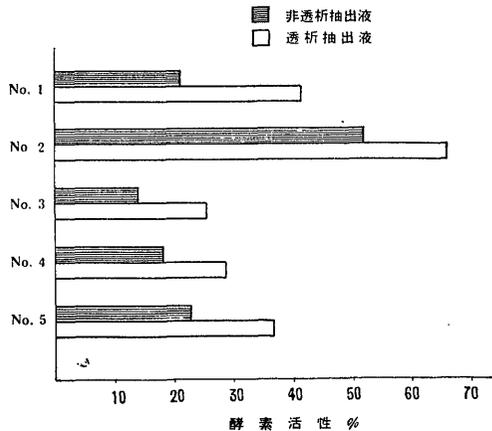


図 22



抽出液を氷室内にその儘同時間放置せるものとの酵素活性の比較は図22の如くである。

実験の値がその時により、かなり相違しているが、それは季節的変動のみではなく、臓器の鮮度、動物の個体差等にもとづくものであると考えられる。

この酵素反応は、下記実験に見られるように磷酸塩により阻害されるものではないので、透析により活性の上昇が見られることは、その抽出液内に透析性の酵素阻害物質を含んでいることを示すものである。

○磷酸塩の酵素作用に及ぼす影響

顎下腺から、蒸留水による抽出液を作り、その抽出液に各々 0.5~0.1 M、pH 7.6 磷酸緩衝液を等量加えた液の各酵素活性は、図23の如くで、磷酸塩が酵素活性に影響がないことを示している。

図 23

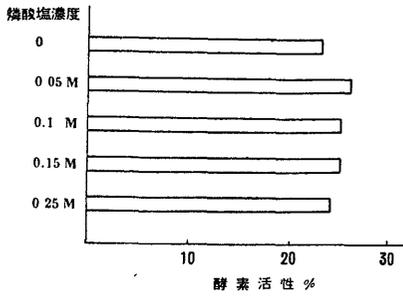
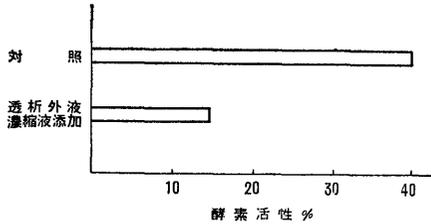


図 24



iii) 透析外液の阻害作用

顎下腺抽出液を、その20倍量の蒸留水に対し透析し、その透析外液を 1/20 量迄減圧濃縮して、酵素反応液中に添加すると、明らかに反応を阻害する。

酵素液は実験材料の項に記した酵素標品を用い、対照には添加した透析外液濃縮液と同量 (0.1ml) の蒸留水を加えた。

iv) 阻害物質の有機溶剤に対する態度

透析外液を 1/20 量に迄濃縮した液を下記の如く処置し、それぞれの阻害能を実験すると、その物質はブタ

ノール、アルコール、アセトンに溶解、エーテルに難溶であることを認めた。

下記阻害度試験の結果は図26の如し。

図 26

| 対 称 | 阻害度 % |
|-----|--------|
| | 66.17% |
| I | 36.93% |
| II | 58.66% |
| III | 5.37% |
| IV | 20.76% |
| V | 4.21% |
| VI | 51.85% |
| VII | 4.12% |

それぞれ析出した沈澱は、恐らく無機塩と思われ、アセトン添加の場合に有効物質が共沈した以外は、それぞれの溶媒に対し、可溶性であることを示している。ブタノール抽出以外には有効なる抽出方法を見出し得なかつた。

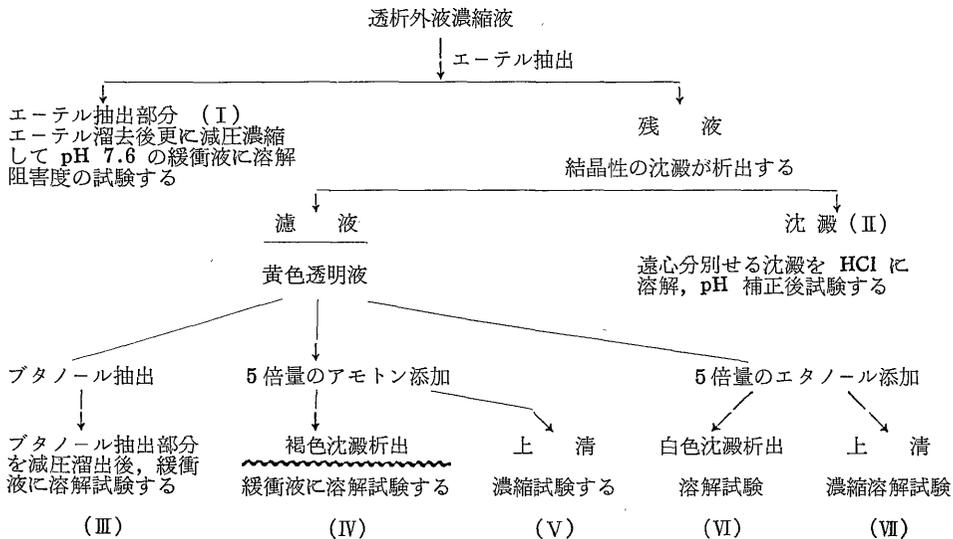
v) 阻害因子よりヨウ素イオンの除外

顎下腺がヨウ素代謝の一役を担っているものであるならば^{30) 40)} 顎下腺中にヨウ素イオンが存在する可能性がある。このヨウ素イオンが透析外液中に含有されるならば、II項に記した如く、当然酵素反応の阻害を起す。下記の実験により、阻害作用物質中よりヨウ素イオンを完全に否定した。

実験

イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400, 120~200 メッシュ、8×100mm のカラムを作り、OH-type を使

図 2 5

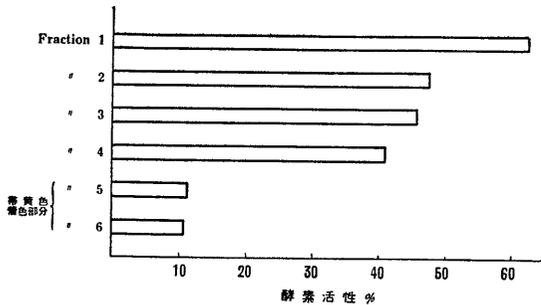


用した。

透析外液濃縮液中に I^{131} を $5\mu\text{c}$ 添加してその 30 ml をカラムに通過せしめた。液の通過と共にカラム中の帯黄色着色帯が移動し通過終末期に帯黄色着色帯が溶出した。

5 ml 宛に分取した液のいずれの分割にも I^{131} の放射能は認められず、その酵素反応阻害作用の大部分は着色部分に認められた。結果は図27に示した。

図 27



カラム中の放射能をダイレクターを付けたシンチレーションカウンターで探索すると、カラムの上端に限局して吸着されていた。もし、透析外液中にヨウ素イオンが存在しても、それはイオン交換樹脂により完全に吸着される。しかもカラムを通過した液中に阻害能が存在する。即ち、阻害作用物質がヨウ素イオン以外のものであることを証明した。

vi) 透析外液のカラムクロマトグラフィー

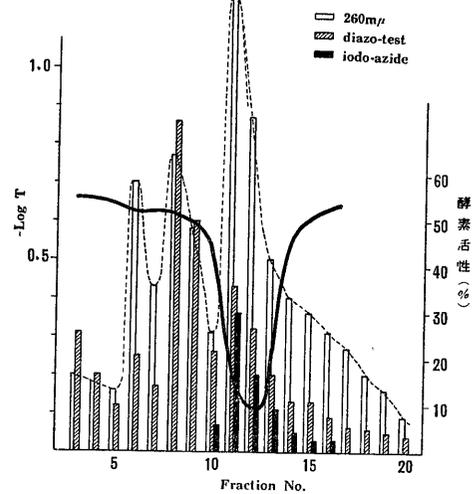
透析外液をカラムクロマトグラフィーを用いて分離を行い、分離物質の阻害度とその性質を究明した。カラムクロマトグラフィーに用いた吸着剤は上記した如く、ヨウ素イオンによる阻害否定を証明した際、黄色着色帯と共に、阻害物質を有効分離し得たことより予測して、陰イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400 を用いた。

イ) 透析外液濃縮液のカラムクロマトグラフィー

カラムクロマトグラフィーは、実験方法の項に記載した要領で実施し、Cl-type の Amberlite IRA-400 を用いた。透析外液濃縮液はそのまま吸着されるには、イオン強度が大に過ぎるので、20倍量迄蒸留水で稀釈したのちカラムを通過させ吸着させた。褐黄色の帯状をなしてカラム上端に吸着した。溶離は 0.1 N の60%アルコール塩酸液を用いて行つた。1時間 2 ml の流速でクロマトグラフィーを行い、 2.5 ml 宛分割した溶出液の諸試験は図28の如くであつた。

阻害度の測定…溶出液 1 ml を取り、アンモニヤ水で中和した後、減圧濃縮して乾固させ、緩衝液

図 28



0.3 ml に溶解させ、その 0.1 ml を用いて酵素反応液に添加し、その酵素活性度を阻害度として表わした。

$260\text{ m}\mu$ の吸収測定……溶出液 0.2 ml を取り、蒸留水 4.8 ml 中に加えて稀釈した液の $260\text{ m}\mu$ の波長の吸収を DU-型ベックマン分光光度計を用いて測定した値を記入した。

a) Diazo test 47) ……溶出液 0.2 ml を 5 ml に迄稀釈した液より 3 ml を取り、氷水中で冷却しながらジアツオ試薬 0.5 ml 、5%炭酸ソーダ液 0.5 ml を加え攪拌、45分後、19N 苛性ソーダ液 1.0 ml を加え、よく攪拌した後、 $540\text{ m}\mu$ の波長で吸光を測定した。

ジアツオ試薬は、0.9% スルフェニール酸溶液 5 ml に5%亜硝酸ソーダ液 25 ml を冷時加えて製した。

b) ヨー素アチド反応……新しく調製した5%のナトリウムアチド溶液と N/50 ヨウ素ヨウ素カリ溶液の等量混合液を、溶出液 0.5 ml 中に 0.2 ml 添加し、その発泡の度合を定性的に検した結果を図示した。

以上の結果より阻害度の顕著な部分は、 $260\text{ m}\mu$ の吸光を有し、ジアツオ陽性、ヨウ素アチド陽性、即ち-SH 基の存在する部分に限定されることが証明された。

この部分の紫外部の吸光曲線は図29の如くで $260\text{ m}\mu$ に吸光極大を有する。参考のために点線にて記入したチオヒスチジンの吸光曲線との類似性を比較した。

ロ) 透析外液直接のカラムクロマトグラフィー

透析外液を濃縮する操作において、熱不安定性な物質ならば、加水分解を受ける可能性がある。透析外液を直接前記同様の Cl-type の樹脂に吸着させ、カラムクロマトグラフィーした結果は図30の如くで、各溶

図 29

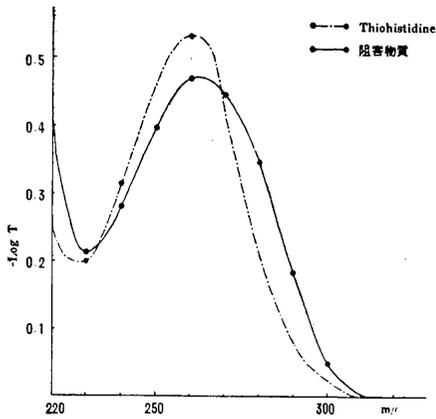
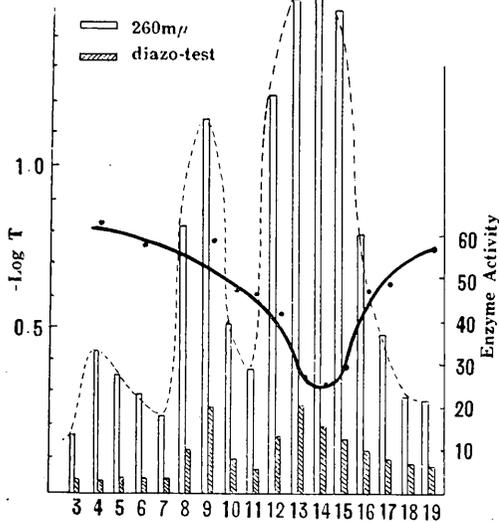


図 30



出液の試験方法は前記同様に行なつた。

ここで特記すべきは、ヨウ素アチド反応がいずれの部分においても陰性であることである。

即ち -SH 基は濃縮処理において加水分解され露呈されたものと考えられ、阻害作用物質は、分子内に容易に加水分解されて、-SH 基を露呈する結合を有しているものであると推論される。

ii) 阻害分割のペーパークロマトグラフィー

による阻害作用を有する分割の 1ml を取り、減圧濃縮した液を、濾紙の原点につけ、n-ブタノール：醋酸：水 (74:19:51) なる溶媒で原点より 15~20cm 迄に展開させ、溶媒前端を記してから微加温して濾紙を乾燥させ、各種の発色を行つた。濾紙は東洋濾紙 No.

50 を用いた。

イ) 透析外液濃縮液 (加水分解された液) より分別した分割のペーパークロマトグラフィーの結果は図31に示した如く、3成分に分離して示された。

ロ) 透析外液を直接 (加水分解されていない) 分別した分割のペーパークロマトグラフィーは図33の如くであつた。発色はそれぞれ次の方法で行つた。

図 31

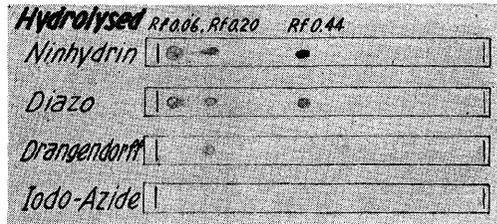
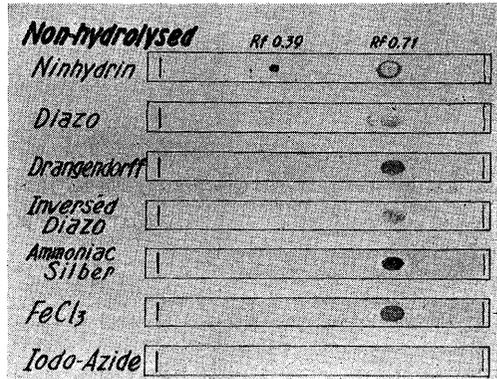


図 32



a) Ninhydrin ²⁵⁾

0.02% Ninhydrin の含水ブタノール溶液を かすかに濾紙が湿める程度に噴霧し、100°C に 2~3 分加熱して発色させた。

b) ギアツオ反応 ⁴⁶⁾

25ml の新しく調製した 5% NaNO₂ と 5ml のスルフェニール酸溶液 (0.9g のスルフェニール酸と 9ml 濃塩酸に水を加えて 100ml とする) を予め 0°C に冷して混合して作つたギアツオ試薬を濾紙全般に丁度湿つた程度に噴霧し、その上に 5% 炭酸ソーダ溶液を過剰にならないように注意しながら噴霧して発色させた。

c) Drangendorff 氏反応 ⁴⁹⁾⁵⁰⁾

硝酸蒼鉛 0.1g を硝酸 1 滴を加えた少量の水に溶解させ、10%ヨウ素カリ溶液 30ml を加え、アルコールで倍量に迄稀釈し、濾紙に噴霧すると、橙黄色の色地の上に濃い橙色のスポットを得た。

d) 逆アツオ反応^{40) 50)}

3%の亜硝酸ソーダ溶液を噴霧した後に0.1%の α -naphthol アルカリ性アルコール溶液を噴霧し、1~2分後、緑色のスポットを得た。

e) アンモニア性硝酸銀⁴⁰⁾

N/10 硝酸銀と10%アンモニア水の等量混合液を噴霧し、微加温して黒褐色の発色を見た。

f) 過クロール鉄反応

1%の $FeCl_3$ 水溶液を噴霧して、緑色発色を見た。

g) ヨウ素アチド反応

5%のナトリウムアチド溶液に N/50 ヨウ素ヨウ素カリ溶液の等量混合液 (その都度調製する) を噴霧し、数分後に脱色されるスポットを見た。

viii) 小 括

粗抽出液の酵素活性が、透析により上昇すること、並びに透析外液を濃縮した液が阻害を示すことより、顎下腺中にこの酵素の阻害物質を含むことを明らかとした。

この物質を陰イオン交換樹脂により捕集、分割し、その部分のペーパークロマトグラフィーの結果を総括すると透析外液を濃縮しないで、直接交換樹脂に吸着させ、クロマトグラフィーしたものの阻害有効物質は、Rf. 0.71 に位置し、Ninhydrin, Diazo, Drangendorff 逆-Diazo, アンモニア性硝酸銀, $FeCl_3$ 反応陽性で、Iodoazide 反応陰性の物質として認められ、260 μ に紫外部の吸着を有することからも、この物質は Purine, Pyrimidine 或いは, Imidazol 核類似の核を有することが推定される。

透析外液を濃縮すると濃縮操作中にこの物質並びに共存物質が加水分解を受けることが考えられ、濃縮液より得た交換樹脂、クロマト分割のペーパークロマトグラフィーでは、Rf. 0.06 0.2 に位置する。Ninhydrin, Diazo 反応陽性、0.2 に Drangendorff 反応陽性物質が検出され、以前とは逆に Iodoazide 反応が陽性となつたことは特記すべきである。

恐らく、濃縮しないで捕集検出された物質は分解され、ここで検出された物質は、Iodoazide 反応陽性から二価硫黄を含むことが明らかとなり、そのことは前の物質が加水分解を受けたものではなく、他の共存物質が、前と同一条件で捕集せられ、検出されたものと考えられ、その分子中に保有する二価硫黄の特性が阻害作用を現わすものと考えられる。濃縮しないで得た native な阻害物質は二価硫黄を含んでおらず、その物質が加水分解により含硫化合物に変化することは考えられず、これらの物質は起源を一つにすることは思われない。

顎下腺内に存在する阻害物質は、透析外液を濃縮しないで捕集検出した物質と推定され、同様な作用を現わす物質が甲状腺からも検出されることから、又粗抽出液の酵素移性が夏に低く、冬に高いという甲状腺生理活性との類似性から、この物質は生体内でも、ヨウ素代謝のチロシンヨウ素化の段階において、調節的に働いていることが考えられる。又この物質の異常分泌によるヨウ素代謝疾患の発症も考えられる。

総 括

甲状腺内サイロキシン 生合成過程研究の一環として、チロシンヨウ素化の反応を司る酵素“チロシンヨージナーゼ”に対する阻害物質の検索を行なつた。

使用した酵素標品は、この酵素が甲状腺よりも、顎下腺から、より容易に高活性、安定な酵素標品を作製し得るので、顎下腺から抽出した“チロシンヨージナーゼ”を用いた。その結果を総括すると

I. 先ずこの酵素の抽出法、精製方法に対する検討を進め、燐酸カルシュームゲルによる吸着溶離法により、一定の酵素活性を示し、且つ比較的安定な酵素標品を作製し得ることを見出した。又酵素活性測定の方法に対する検討を進め、実験方法の項に記載したような有用な方法を確立した。

II. この酵素に対する各種の物質の作用を検索し、所謂抗甲状腺製剤と称せられるものは全部、就中現在迄の研究によれば、ヨウ素の集積段階のみを阻害し、有機化の段階は阻害しないといわれていた Thiocyanide がこの酵素を阻害することを明らかにした。又生体内阻害物質と関連して、アミノ酸、アミンを主とする。Biological material の数種を試験して、阻害的に働く物質を見出した。そしてその阻害作用の機構についても検討を行なつた。Thiourea, Thiouracil, Thioimidazol 等含硫化合物が強力な阻害作用を示すことから、他の数種の含硫黄合成物質の阻害作用を検討し、Dithizone, Tetramethylthiuram-monosulfide が強力な阻害を示すことを見出した。ヨウ素イオンの濃度が高まるとこの酵素反応が阻害されることを明らかにし、ヨウ素の抗甲状腺作用の実験的解明の一助とした。

III. 顎下腺粗抽出液の酵素活性が季節により変動すること、粗抽出液を透析すると活性が上昇し、透析外液を加えると酵素活性が阻害されることより、顎下腺中にこの酵素を阻害する物質の存在を予知し、その物質を透析外液より陰イオン交換樹脂を用いて捕集、クロマトグラフィーによりほぼ単一物質として取り出した。その物質の性状の一端も、ペーパークロマトグラ

フィー後の呈色反応により、明らかとなした。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜った恩師石川教授並びに渡辺先生及び教室員諸兄に深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- 1) Hertz, S., Roberts, A. & Evans, R. D. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 38, 510 (1938).
- 2) Hamilton, J. G. & Saley, M. : Amer. J. Physiol., 127, 577 (1939).
- 3) Harington, C. H. : The Thyroid Gland, Oxford Univ. Press, London, 1938.
- 4) Fink, R. M. : Science, 108, 358 (1949).
- 5) Taurog, A., Chaikoff, I. L. & Tong, W. : J. Biol. Chem., 178, 997 (1949).
- 6) Chaikoff, I. L. & Tong, W. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 50, 377 (1949).
- 7) Taurog, A., Tong, W. & Chaikoff, I. L. : J. Biol. Chem., 184, 83 (1950).
- 8) Yagi, Y., Michel, R. & Rock, J. : Bull. Soc. chim. biol., 35, 289 (1953).
- 9) Vanderlaan, J. E. & Vanderlaan, W. P. : Endocrinol., 40, 403 (1947).
- 10) Wyngarrden, A. : J. Clin. Endocrinol., 12, 1259 (1952).
- 11) 松本治 : 印刷中.
- 12) Weiss, B. : J. Biol. Chem., 201, 31 (1953).
- 13) Fawcett, D. M. & Kirkwood, S. : J. Biol. Chem., 205, 795 (1953).
- 14) Fawcett, D. M. & Kirkwood, S. : J. Biol. Chem., 209, 249 (1954).
- 15) Taurog, A., Potter, G. D. & Chaikoff, I. L. : J. Biol. Chem., 213, 119 (1955).
- 16) Schachner, H., Franklin, A. L. & Chaikoff, I. L. : J. Biol. Chem., 151, 19 (1943).
- 17) Pitt-Riners, R. : Physiol. Rev. 30, 194 (1950).
- 18) 石川大刀雄・渡辺良三・須山忠和・高沢嘉人 : 酵素化学シンポジウム, 13, 227 (1958).
- 19) 萩原文二 : 酵素研究法 (赤堀四郎編), I, 101, 朝倉書店, 東京, (1955).
- 20) Meister, A. : Biochemical Preparation 2, 18 (1952).
- 21) 佐竹一夫 : クロマトグラフィ, 共立全書, 12, 共立出版, 東京, 1957.
- 22) Fawcett, P. M. & Kirkwood, S. : J. Biol. Chem., 204, 787 (1953).
- 23) Tong, W., Taurog, A. & Chaikoff, S. L. : J. Biol. Chem., 191, 665 (1951).
- 24) Hirs, C. H. W., Stein, W. H. & Moore, S. : J. Biol. Chem., 200, 493 (1953).
- 25) 安藤英郎・宇井信生 : 蛋白質化学 (赤堀・水島編), II, 65頁, 共立出版, 東京, 1954.
- 26) Gates, R. L. & Kneen, E. : Anal. Chem., 25, 1 (1948).
- 27) Askones, B. A. : Biochem. J., 48, 42 (1951).
- 28) Connors, W. M., Pihl, A., Dounce, A. L. & Stotz, E. : J. Biol. Chem., 184, 29 (1950).
- 29) Polis, B. D. & Meyerhof, D. : J. Biol. Chem., 169, 389 (1947).
- 30) Fawcett, D. M. & Kirkwood, S. : J. Biol. Chem., 209, 249 (1954).
- 31) McGavack, T. H. : The Thyroid, 87, C. V. Masby Co., St. Louis (1951).
- 32) Barker, M. H. : J. Amer. Med. Assoc., 106, 762 (1936).
- 33) Astwood, E. B. : J. Pharma. Exp. Therap., 78, 79 (1943).
- 34) Morton, M. E. & Chaikoff, I. L. : J. Biol. Chem., 147, 1 (1943).
- 35) Richter, C. P. & Clisby, K. H. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 48, 684 (1941).
- 36) Kennedy, T. H. : Nature, 150, 233 (1942).
- 37) Lauson, A. & Rimkimboll, O. P. : J. Amer. Med. Assoc., 130, 80 (1946).
- 38) Lavine, T. H. : J. Biol. Chem., 151, 281 (1943).
- 39) Lavine, T. H. : Federation Proc., 4, 96 (1945).
- 40) 新井恒人 : 日新医学, 40, 363 (1953).
- 41) 新井恒人 : 内分泌のつどい, 6, 70 (1955).
- 42) 翠川修 : 総合臨床, 5, 933 (1956).
- 43) 森田和夫 : 十全会誌, 58, 9 (1956).
- 44) 岡本耕造 : 総合臨床, 4, 1951 (1955).
- 45) 岡本耕造 : 糖尿病の実験病理学, 25頁, 日本医書出版, 東京, 1954.
- 46) Fawcett, D. M. & Kirkwood, S. : Science, 120, 547 (1954).
- 47) Melville, D. B. & Lubochez, R. : J. Biol. Chem., 200, 275 (1953).
- 48) Bruce, N. & Mitchel, H. K. : J. Amer. Chem. Soc., 74, 252 (1952).
- 49) 刈米達夫 : 薬学雑誌, 71, 436 (1951).
- 50) 宮木高明 : 薬学雑誌, 71, 249 (1951).

Abstract

We have reported studies on the "tyrosine iodinase," which catalyzes the iodization of tyrosine, working as an enzyme on the process of the biosynthesis of thyroxine in thyroid

gland.

This report on this line dealt with inhibitors of this enzyme in particular. The enzyme preparation used here was extracted and purified from bovine submaxillary glands and no fluctuation of the enzyme activity of each preparation was observed all through the four seasons.

The results obtained are summarized below;

1) The extraction and purification of the enzyme were modified by the adoption of an absorption procedure using calcium phosphate gel. The enzyme preparation with a high and relatively stable activity was obtained.

2) The determination of the enzyme activity was investigated fundamentally and established a method better than those reported previously.

3) Many substances presumed as inhibitor of enzyme were tested. So-called antithyroid substances strongly inhibited the enzyme activity. The enzyme reaction was inhibited most strongly by thiocyanide which was reported as an inhibitor working on the accumulating process of iodine into thyroid gland.

4) Among amino acids and their amine derivatives examined, ergothioneine, methionine, tryptamine and a hydrolysate of vitamin B₁ showed inhibitory effect on the enzyme activity.

5) Among several thio-compounds tested, dithizone and tetramethylthiuram-monosulfide also showed strong inhibitory effect.

6) The data that over 10^{-5} M of iodine ion concentration in a reaction mixture the formation of monoiodotyrosine was largely inhibited, suggest the efficiency of iodine administration therapy for patients with hyperthyroidism.

7) From the facts that (i) the activity of crude enzyme preparation from bovine submaxillary gland fluctuates depending upon the season at which material was collected; (ii) dialysis of the crude extract increases the enzyme activity; and moreover (iii) the condensate of the medium for dialysis inhibits the enzyme reaction when it is added to the dialyzed enzyme system, it is evident that a natural inhibitory substance of this enzyme is present in submaxillary gland. The inhibitory substance was collected from the medium after dialysis of the enzyme preparation by means of a column chromatography of an ion exchange resin and obtained as a purified single substance which was partly characterized by paper chromatography.
