

# 琉球大学学術リポジトリ

2,4

-ジニトロフェニルヒドラジンを用いるタウリン-<sup>o</sup>ピルビン酸トランスアミナーゼの活性測定法(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 当山, 清善, 安田, 正昭, 左右田, 健次, Toyama, Seizen, Yasuda, Masaaki, Soda, Kenji メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/4333">http://hdl.handle.net/20.500.12000/4333</a>

# 2, 4 - ジニトロフェニルヒドラジンをを用いるタウリン-ピルビン酸トランスアミナーゼの活性測定法<sup>+</sup>

当山清善・安田正昭・左右田健次\*

---

Seizen TOYAMA, Masaaki YASUDA and Kenji SODA :  
An assay method of taurine-pyruvate transaminase  
activity with 2, 4 - dinitrophenylhydrazine

---

## I 緒 言

筆者ら(7~11)は、 $\omega$ -アミノ酸であるタウリン(2-アミノエタンカルボン酸)をアミノ基供与体とするトランスアミナーゼが細菌の無細胞抽出液中に存在することを見出し、タウリンからのアミノ基転移反応生成物がスルホアセトアルデヒドであることを報告した。タウリンの関与するトランスアミナーゼの活性は、アミノ基受容体から生成するアミノ酸を定量するか、または反応で生成するスルホアセトアルデヒドを定量して測定する方法がある。活性の測定には、これまでペーパークロマトグラフィー法により酵素反応系から容易に単離できる生成物のアミノ酸を定量する方法が用いられてきた。最近、筆者ら(6, 12)はタウリン-ピルビン酸トランスアミナーゼの活性が、反応で生成するスルホアセトアルデヒドを $\alpha$ -アミノベンツアルデヒドを用いて分光学的に測定できることを明らかにした。

本報においては、タウリン-ピルビン酸トランスアミナーゼの活性が反応で生成するスルホアセトアルデヒドを2, 4 - ジニトロフェニルヒドラゾンとして比色定量することにより測定できるかどうかを検討したので報告する。

## II 実 験 方 法

(1) 細菌の培養および酵素液の調製 本実験においてはタウリン-ピルビン酸トランスアミナーゼ反応を触媒する酵素の存在が確認され(11)、土壌から分離された *Pseudomonas* 属細菌 F-126 菌株を使用した。供試菌株の培養は0.3%  $\beta$ -アラニン、0.2%ペプトン、0.1%グリセリン、0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.1%  $\text{NaCl}$ 、0.01%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、および0.01%酵母エキスの培地(pH 7.0)を用いて、30°Cで振とう培養して行なった。遠心分離して得た菌体は0.85%食塩水で3回洗浄し、さらに $10^{-5}$ Mピリドキサル-5'-リン酸および0.01%2-メルカプトエタノールを含む0.02Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で洗浄した。洗浄菌体は超音波菌体破壊装置(海上電気KK,

---

+ 本論文の要旨は日本農芸化学会関西支部・西日本支部合同大会(昭和49年1月, 那覇市)で発表した。

\* 京都大学化学研究所

琉球大学農学部学術報告 22: 215~223 (1975)

TA 4201) を用い、 $0 \sim 5^{\circ}\text{C}$  で15分間破碎した後、上記緩衝液で抽出した。遠心分離後の上清液を同緩衝液に透析して得た無細胞抽出液を酵素液として用いた。

(2) 酵素反応液の組成と酵素反応 反応液の組成はタウリン  $20 \mu\text{moles}$ 、ピルビン酸ナトリウム  $20 \mu\text{moles}$ 、ピリドキサル5'-リン酸  $1 \mu\text{mole}$ 、リン酸カリウム緩衝液 ( $\text{pH } 8.0$ )  $100 \mu\text{moles}$ 、および酵素液で、総量  $1.0 \text{ ml}$  とした。反応は  $30^{\circ}\text{C}$ 、30分間行ない、25%トリクロル酢酸  $0.1 \text{ ml}$  を加えて反応を止めた。遠心分離により除蛋白した上澄液について生成したスルホアセトアルデヒドを下記のように2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾンにして定量した。コントロールは熱失活 ( $100^{\circ}\text{C}$ , 5分) した酵素液を用い同様に行なった。酵素液の蛋白量の測定は Lowry ら(5)の方法に従った。

(3) スルホアセトアルデヒドの合成 スルホアセトアルデヒド亜硫酸付加物は Kondo ら(4)の方法に従い、2-ブロムアセタール、次亜硫酸ナトリウムおよび水酸化ナトリウムから合成した。

(4) スルホアセトアルデヒドおよびピルビン酸の2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾンの調製 合成したスルホアセトアルデヒドの2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン(以下ヒドラゾンとする)の調製は $\alpha$ -ケト酸のヒドラゾンの調製法(2, 3)に従って行ない、無水アルコールで再結をくり返した。得られた結晶標品は元素分析およびNMRスペクトル分析の結果、結晶水を1分子有するスルホアセトアルデヒドナトリウム塩のヒドラゾンであることが確認された(7, 9)。酵素反応液中に存在するピルビン酸およびスルホアセトアルデヒドのヒドラゾンを調整するための反応組成は次の通りである。除蛋白後の酵素反応上清液  $0.25 \text{ ml}$  (または  $0.5 \text{ ml}$ ) に0.125% 2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン (2 N HCl に溶解)  $1.0 \text{ ml}$  および蒸留水を加え、総量  $2.0 \text{ ml}$  とした。ヒドラゾンの生成反応は  $30^{\circ}\text{C}$ 、30分間行なった。

(5) ヒドラゾンの有機溶剤による抽出 上記のように調製した酵素反応混液中のピルビン酸およびスルホアセトアルデヒドのヒドラゾンは有機溶剤で次の如く抽出処理することにより両ヒドラゾンを分離した。すなわち、上記両ヒドラゾン混液 ( $2.0 \text{ ml}$ ) に有機溶剤(トリオール, キシロールまたは酢酸エチル)  $1.0 \text{ ml}$  を加え、はげしく攪拌(1分間)して抽出処理を行なった。

(6) スルホアセトアルデヒドヒドラゾンの定量 実験結果の項で示すように、スルホアセトアルデヒドのヒドラゾンは有機溶剤処理した後の水層に残留するので次の如く本水層をアルカリ性にして定量した。すなわち、水層一定量に1 N NaOH および1 N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  のアルカリ混液 ( $1:1\frac{1}{4}$ )  $2.0 \text{ ml}$  を加えすみやかに混和し発色させた。アルカリ性における本ヒドラゾンの可視吸収極大は  $435 \text{ m}\mu$  にあるので、本波長の吸光度を測定してヒドラゾンを定量した。なお、合成したスルホアセトアルデヒドのヒドラゾン標品は1 N HCl に溶解後同様にアルカリ性で発色させた後吸収スペクトルおよび吸光度を測定した。吸収スペクトルは日立2波長自記分光光度計356, 吸光度は日立分光光度計139で測定した。

### III 結果と考察

#### 1. スルホアセトアルデヒドヒドラゾンの吸収スペクトルとその定量

Fig. 1 は2-ブロムアセタールから合成したスルホアセトアルデヒドの結晶標品をアルカリ性で発色させ、その可視吸収スペクトルを測定した結果である。図から明らかなように、本ヒドラゾンは  $435 \text{ m}\mu$  に吸収極大があり、 $505 \text{ m}\mu$  付近に吸収の肩がみられる。すでに報告したように(7, 9), 本ヒドラゾンの吸収スペクトルはタウリンが酵素的アミノ基転移反応を受けて生成するスルホアセトアルデヒドのヒドラゾンの吸収スペクトルと完全に一致することが確認されている。アルカリ性溶液における本ヒドラゾンの吸収は比較的安定である。

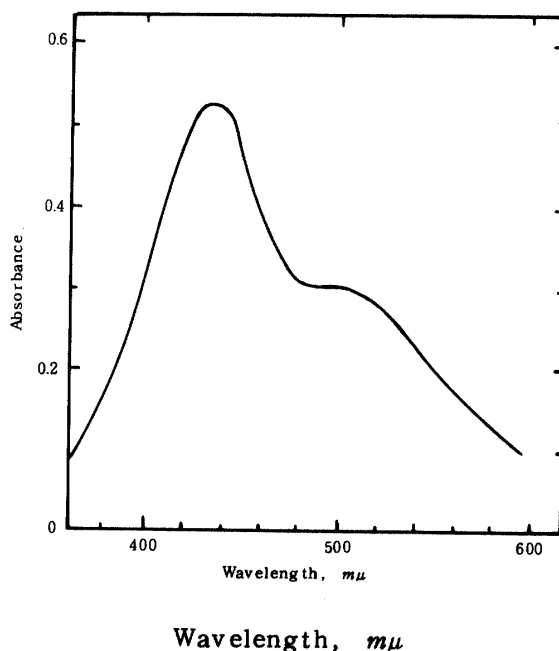


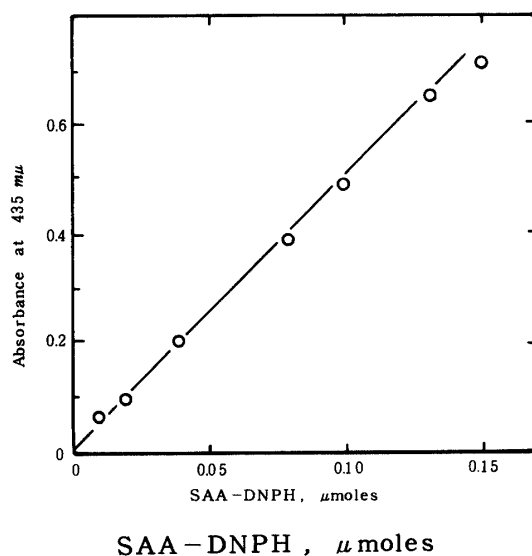
Fig. 1. Absorption spectrum of 2,4-dinitrophenylhydrazone of sulfoacetaldehyde

The sulfoacetaldehyde was dissolved in the alkali solution, and the absorption spectrum was determined with a recording spectrophotometer. alkali solution; 1N NaOH and 1N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (1:1, v/v)

Fig. 2 は各種濃度のスルホアセトアルデヒドのヒドラゾン（合成標品）をアルカリ性にして発色させ、435 mμにおける吸光度を測定した結果である。435 mμにおける吸光度の値とヒドラゾンの量が0.02~0.12 μmole の範囲で直線性が得られており、本ヒドラゾンの検量線として利用することができる。なお、本ヒドラゾン溶液は有機溶剤による処理は行なわないでアルカリ性とした。

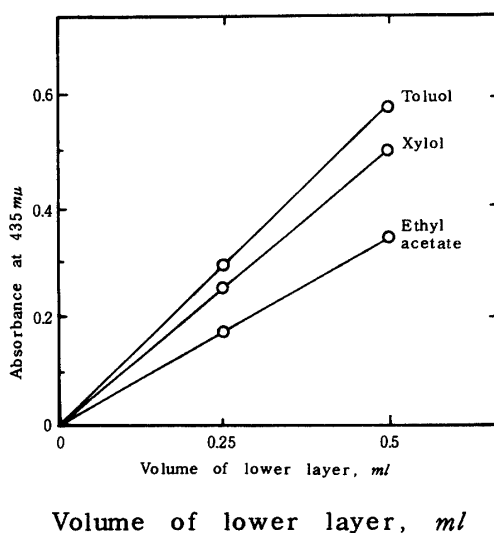
## 2. ピルビン酸ヒドラゾンとスルホアセトアルデヒドヒドラゾンの分離

タウリン-ピルビン酸アミノ基転移反応を酵素的に行なった後、反応生成物のスルホアセトアルデヒドをヒドラゾンとして定量するためにはヒドラゾン混液中に混在するピルビン酸のヒドラゾンと分離する必要がある。両ヒドラゾン混液中のピルビン酸のヒドラゾンの抽出分離は Friedemann ら(1), 福井(2), Katsuki ら(3)の方法を参照して行ない、ヒドラゾン液に有機溶剤を加えてピルビン酸のヒドラゾンを溶剤層に抽出し、スルホアセトアルデヒドのヒドラゾンは水層中に残留せしめる方法を検討した。抽出に用いた溶剤はトルオール、キシロール、および酢酸エチルである。溶剤抽出後水層の一定量を採りアルカリ性にして濃赤色に発色させ435 mμにおける吸光度を測定したのが Fig. 3 である。図から明らかなように、水層中に残留するスルホアセトアルデヒドの吸光度の値は溶剤によって異なり、トルオールを使用することにより最も高い値が得られている。酢酸エチルで抽出すると吸光度が低いのはピルビン酸のヒドラゾンとともにスルホアセトアルデヒドのヒドラゾンも酢酸エチル層に抽出されるためと考えられる。



**Fig. 2. Color development as a function of the amount of 2,4-dinitrophenylhydrazone of sulfoacetaldehyde**

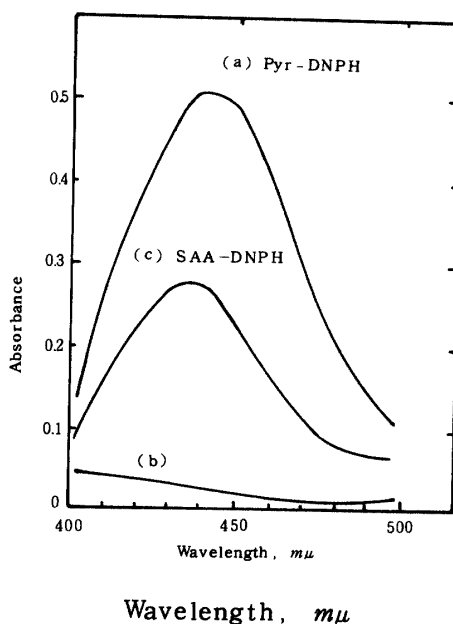
The sulfoacetaldehyde hydrazone was dissolved in the alkali solution, and the absorbance was measured at 435  $m\mu$ . SAA-DNPH; sulfoacetaldehydehydrazone



**Fig. 3. Color development of sulfoacetaldehyde hydrazone in the aqueous layer after separation of pyruvic acid hydrazone with solvents**

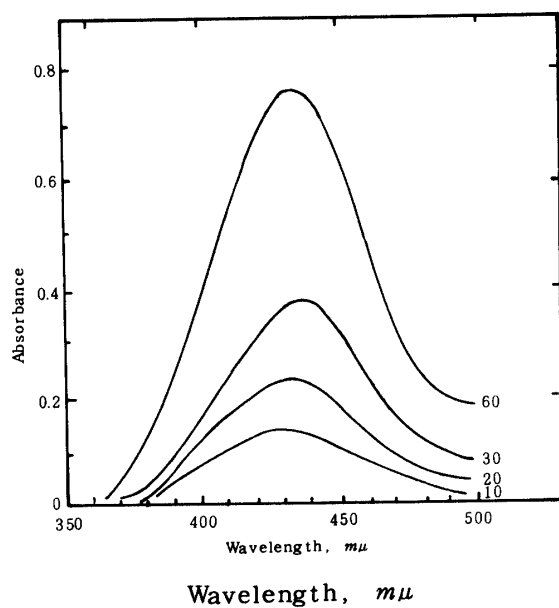
The standard enzyme reaction system contained 20  $\mu$ moles of taurine, 20  $\mu$ moles of pyruvate, 1  $\mu$ mole of pyridoxal 5'-phosphate, 40  $\mu$ moles of potassium phosphate buffer, pH 8.0, and 1.5  $mg$  of enzyme in a final volume of 1.0  $ml$ . After incubation at 30  $^{\circ}C$  for 30 min, sulfoacetaldehyde

formed was determined. The enzyme used was isolated from *Pseudomonas* sp. F-126 grown in a  $\beta$ -alanine-peptone medium. To 0.5 ml of the enzyme reaction mixture deproteinized was added 1.0 ml of 0.125% 2,4-dinitrophenylhydrazine in 1 N HCl and distilled water, in a final volume of 2.0 ml, and the mixture left to stand for 30 min at 30°C. The hydrazones formed were extracted with 1.0 ml of organic solvents, and the shaken mixture was separated into two layers. To 0.25 or 0.5 ml of the aqueous layer was added 2.0 ml of the mixture of 1 N NaOH and 1 N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1:1, v/v) solution, and the absorbance of the red brown color produced was measured at the absorption maximum, 435 m $\mu$ .



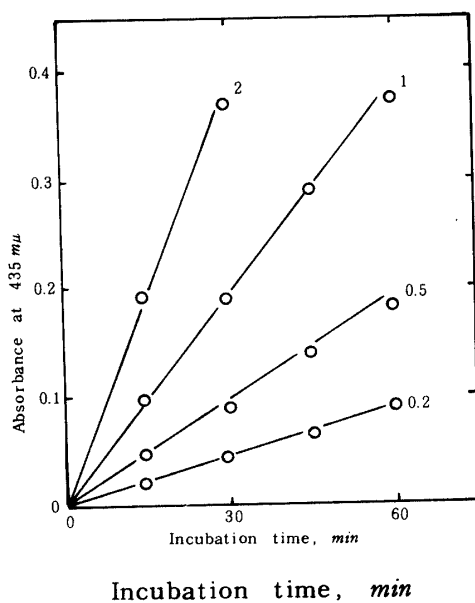
**Fig. 4. Absorption spectra of the colors derived from pyruvic acid and sulfoacetaldehyde hydrazones, and their separation with toluol**

2,4-Dinitrophenylhydrazine was added to the enzyme reaction mixture to yield hydrazones as shown in Fig. 3. (a), The enzyme inactivated was used in the enzyme reaction system. After separation of the hydrazone formed with toluol, the aqueous layer was removed. The pyruvic acid hydrazone separated into the toluol layer was extracted with the alkali solution, and the spectrum was determined. (b), To the aqueous layer of (a), the alkali solution was added. (c), The enzyme reaction mixture incubated for 30 min was used. After separation of the hydrazones formed with toluol, to the aqueous layer containing sulfoacetaldehyde hydrazone was added the alkali solution, and the spectrum was determined. SAA-DNPH; sulfoacetaldehyde hydrazone, Pyr-DNPH; pyruvic acid hydrazone



**Fig. 5. Absorption spectra of the colors derived from sulfoacetaldehyde hydrazone as a function of enzyme reaction time**

The enzyme reactions were carried out for the indicated time. Other conditions are the same as shown in Figs. 3 and 4.



**Fig. 6. Absorbance of sulfoacetaldehyde hydrazone as a function of enzyme concentration**

The numbers in the figure indicate the amount of enzyme protein employed (mg). Other conditions are the same as shown in Figs. 3 and 4.

次に、トルオール抽出処理によるヒドラゾン反応液中に存在するピルビン酸の抽出程度を調べた。熱失活した酵素を用いた酵素反応液と酵素反応を30分間行なった反応液についてヒドラゾン液を調整し吸収スペクトルを測定したのが Fig. 4 である。Fig. 4 の (a) は、熱失活酵素を用いた場合のヒドラゾン液にトルオールを加えピルビン酸のヒドラゾンをトルオール層に抽出して水層と完全に分離した。ついでトルオール層にアルカリ混液を加えてアルカリ液に転溶して発色させ、その吸収スペクトルを測定したものである。本ヒドラゾンの吸収極大は  $445 m\mu$  にある。(b) は、(a) におけるヒドラゾンをトルオール抽出した後の水層にアルカリ混液を加え測定した結果で、この水層はアルカリ性にしても発色はほとんどみられない。(c) は30分間酵素反応を行なった場合のヒドラゾン液をトルオール抽出処理した後の水層にアルカリ混液を加えて発色させその吸収スペクトルを測定したものである。トルオール処理後の本水層はアルカリ性で発色させると  $435 m\mu$  に吸収極大がみられる。以上の結果は、酵素反応で生成したスルホアセトアルデヒドのヒドラゾンはトルオール抽出処理で水層に残留し、ピルビン酸のヒドラゾンはトルオール層に抽出されることを示している。なお、トルオール層と水層に存在するヒドラゾンはペーパークロマトグラフィーを行なった結果、それぞれピルビン酸とスルホアセトアルデヒドのヒドラゾンであることが確認された。

### 3. 酵素反応で生成するスルホアセトアルデヒドヒドラゾンの定量と酵素活性

タウリン-ピルビン酸トランスアミナーゼ反応で生成するスルホアセトアルデヒドのヒドラゾンは、反応混液のヒドラゾン液をトルオール抽出処理した水層に残留し、本水層をアルカリ性で発色させ  $435 m\mu$  の吸光度を測定することによって定量できることがわかった。次にヒドラゾン法が酵素活性の測定に応用できるかどうかを検討した。Fig. 5 は、酵素反応で生成するスルホアセトアルデヒドのヒドラゾンについてトルオール抽出処理およびアルカリ発色を行ない酵素反応時間とヒドラゾンの吸収スペクトルとの関係を示したものである。本スペクトルは熱失活酵素を用いた反応混液を同様に処理したヒドラゾンに対する差スペクトルである。図から明らかなように、ヒドラゾン液をトルオール抽出した後の水層に存在するスルホアセトアルデヒドヒドラゾンの  $435 m\mu$  における吸光度の値は酵素反応時間とともに増大し、直線関係にある。本酵素で生成する  $\alpha$ -アラニン定量することによって活性を測定した結果によっても反応60分間までは、反応時間と酵素活性とが直線性にあることはすでに報告した通りである (11)。

次に、各種濃度の酵素を用いて酵素反応を行ない、反応時間毎に生成するスルホアセトアルデヒドのヒドラゾンを同様に処理し  $435 m\mu$  における吸光度を測定した。その結果は Fig. 6 に示すとおりである。吸光度の値は酵素量および反応時間とともに増大し直線性が得られている。Fig. 5 および Fig. 6 の結果は、酵素反応で生成したスルホアセトアルデヒドのヒドラゾンを設定条件下で定量することにより酵素活性が測定できることを示している。

スルホアセトアルデヒドをヒドラゾンとして定量する本方法は、筆者ら (7, 9, 11) がタウリンをアミノ基供与体とするアミノ基転移反応で生成するスルホアセトアルデヒドを酵素反応混液から単離、同定するために用いた手段を酵素活性の測定に応用したものである。ヒドラゾンの有機溶剤に対する溶解度の差を利用して混在するケト酸 (ピルビン酸と  $\alpha$ -ケトグルタル酸) のヒドラゾンを分別、単離する方法が広く行なわれている (1~3)。しかし、本実験のように溶剤抽出処理後のヒドラゾン液を直接採取して酵素活性の測定に応用した例が極めて少ないのは、混在するヒドラゾンの抽出単離が困難であるとともに、強アルカリ溶液におけるヒドラゾンの呈色度が不安定のためである。スルホアセトアルデヒドヒドラゾンのアルカリ性溶液における呈色度もアルカリ濃度によって異なり、また時間とともに退色する。従って、本ヒドラゾンの定量にあたっては一定量のヒドラゾン液 (トルオール処理後の水層) を比色計のセルに直接採取し、アルカリ液添加攪拌後3分以内に比色することが望ましい。



本ヒドラゾン法は、タウリンーピルビン酸トランスアミナーゼ活性を簡便に測定するために設定されたものであり、本酵素反応で生成する $\alpha$ -アラニンの定量値と併用することもできる。すでに筆者ら(12)が報告した $o$ -アミノベンツアルデヒドを用いた $\omega$ -アミノ酸トランスアミナーゼの活性測定法は、タウリンとともに他の $\omega$ -アミノカルボン酸を基質とした反応で生成するアルデヒド酸の定量にも適用できる。本報のヒドラゾン法の特徴は、タウリンを基質とした反応で生成するスルホアセトアルデヒドを定量することにある。

#### IV 要 約

タウリンーピルビン酸トランスアミナーゼ活性を2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾンを用いて測定する方法を検討し、次の結果を得た。

酵素反応混液のピルビン酸とスルホアセトアルデヒドを2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾンとした後トルオールで抽出すると、ピルビン酸のヒドラゾンはトルオール層に抽出され、スルホアセトアルデヒドのヒドラゾンは水層に残留する。水層中のスルホアセトアルデヒドヒドラゾンはアルカリ性で発色させると435 $m\mu$ に吸収極大を有する。酵素活性は本吸収極大の吸光度を定量することによって測定し得る。

#### 文 献

1. Friedemann, T. E., and Haugen, G. E. 1943 Pyruvic acid. II. The determination of keto acids in blood and urine, *J. Biol. Chem.* 147: 415~442
2. 福井作蔵 1957 有機酸の微量定量法, 蛋白質・核酸・酵素 2: 287~288
3. Katsuki, H., Yoshida, T., Tanegashima, C. and Tanaka, S. 1968 Improved method for the separation and characterization of keto acid 2, 4-dinitrophenylhydrazones, *Anal. Biochem.*, 24: 112~119
4. Kondo, H., Anada, H., Ohsawa, K. and Ishimoto, M. 1971 Formation of sulfoacetaldehyde from taurine in bacterial extracts, *J. Biochem.*, 69: 621~623
5. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193: 265~275
6. Soda, K., Toyama, S., Misono, H., Hirasawa, T. and Asada, K. 1973 Spectrophotometric determination of glyoxylic acid with  $o$ -aminobenzaldehyde and glycine, and its application to enzyme assay, *Agr. Biol. Chem.*, 37: 1393~1400
7. Toyama, S. and Soda, K. 1972 Occurrence of taurine:  $\alpha$ -ketoglutarate aminotransferase in bacterial extracts, *J. Bacteriol.* 109: 533~538
8. Toyama, S., Misono, H. and Soda, K. 1972 Crystalline taurine:  $\alpha$ -ketoglutarate aminotransferase from *Achromobacter superficialis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46: 1374~1379

9. 当山清善, 左右田健次 1971 細菌におけるタウリン- $\alpha$ -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ反応について, *Amino Acid and Nucleic Acid*, 24 : 50 ~ 57
10. 当山清善, 宮里興信, 当間孝子, 左右田健次 1973 細菌の細胞懸濁液によるタウリン-ピルビン酸アミノ基転移反応について, *琉大農学報* 20 : 105 ~ 113
11. Toyama, S., Miyazato, K., Yasuda, M. and Soda, K. 1973 Occurrence of taurine-pyruvate aminotransferase in bacterial extract, *Agr. Biol. Chem.*, 37 : 2939 ~ 2941
12. Toyama, S., Yasuda, M., Miyazato, K. and Soda, K., 1974 A new assay method of  $\omega$ -amino acid aminotransferase with *o*-aminobenzaldehyde, *Agr. Biol. Chem.*, 38 : 2263 ~ 2264

### Summary

This communication describes an assay method of taurine: pyruvate transaminase with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The results obtained were as follows ;

Pyruvic acid and sulfoacetaldehyde in the enzyme reaction mixture were allowed to react with 2,4-dinitrophenylhydrazine, after which the hydrazones formed were separated from each other with toluol. The pyruvic acid hydrazone was extracted to the toluol layer and the sulfoacetaldehyde hydrazone remained in the aqueous layer. The sulfoacetaldehyde hydrazone of the aqueous layer gave an intense red brown color with the mixture of NaOH and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution, exhibiting the absorption maximum at 435 *m* $\mu$ . The transaminase activity could be determined by measuring the absorbance at the absorption peak.