

- 5) D. Arigoni, W. von Daehne, W. O. Godtfredsen, A. Melera, S. Vangedal: *Experientia*, **20**, 344 (1964)
- 6) H. S. Burton, E. P. Abraham, H. M. E. Cardwell: *Biochem. J.*, **62**, 171 (1956)
- 7) J. Cram, N. L. Allinger: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5275 (1956)
- 8) N. L. Allinger: *J. Org. Chem.*, **21**, 1180 (1956)
- 9) N. L. Allinger, J. L. Coke: *J. Org. Chem.*, **26**, 4522 (1961)
- 10) S. Okuda, S. Iwasaki, K. Tsuda, Y. Sano, T. Hata, S. Udagawa, Y. Nakayama, H. Yamaguchi: *Chem. Pharm. Bull.*, **12**, 121 (1964)
- 11) S. Iwasaki, S. Okuda, K. Tsuda: at the Symposium on the Chemistry of Natural Products, Nagoya, Oct. 1964; Abstracts of Papers, p. 192
- 12) B. M. Baird, T. G. Halsall, E. R. H. Jones, G. Lowe: *Proc. Chem. Soc.*, **1961**, 257
- 13) T. G. Halsall, E. R. H. Jones, G. Lowe: *Proc. Chem. Soc.*, **1963**, 16
- 14) Y. Maki, M. Sato, K. Obata: *Chem. Pharm. Bull.*, **13**, 1377 (1965)
- 15) A. I. Laskin, P. Grabowich, C. de Lisle Meyers, J. Fried: *J. Med. Chem.*, **7**, 406 (1964)
- 16) J. Fried, G. W. Krakower, D. Rosenthal, H. Basch: *J. Med. Chem.*, **8**, 279 (1965)
- 17) J. Fishman: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 6143 (1960)
- 18) W. Klyne, W. M. Stoke: *J. Chem. Soc.*, **1954**, 1979

杉浦 衛, 伊藤万蔵: Nucleodeaminase について

Mamoru Sugiura, Manzo Ito: On Nucleodeaminase

1. Introduction
2. Significance of nucleodeaminase in vivo
3. Distribution of nucleodeaminase in vivo
4. Determination of nucleodeaminase and nucleic base
5. Crystallization and purification of 5'-adenylic acid deaminase
6. Physical and chemical property of 5'-adenylic acid deaminase
7. On industrial application of 5'-adenylic acid deaminase
8. Preparation of industrial nucleodeaminase

1. 緒 言

核酸およびその誘導体のアミノ基を水酸基に置換し、アンモニアを遊離する酵素は、一般に nucleodeaminase (略して deaminase) といわれる。deaminase は 1904年 Jones が胸腺の自家融解中に核酸塩基の脱アミノが起ったことを発見して以来、漸次研究せられてきた。そしてこの中には adenase, adenosine deaminase, 5'-adenylic acid deaminase, 2'-adenylic acid deaminase, 3'-adenylic acid deaminase, guanase, guanosine deaminase, guanylic acid deaminase など種々存在することがあきらかとなった。これらの deaminase のうち、近年、核酸化学の急激な発展にともない工業的に製造されるようになった inosinic acid (5'-IMP) の製造に用いられている

adenylic acid deaminase は最もよく研究されており、Schmidt¹⁾ が1928年新鮮な脊椎動物の骨格筋において、その中に含まれている adenylic acid (5'-AMP) が自己消化のすすむにつれて、脱アミノを受け 5'-IMP に変化するという事実を報告して以来、Conway²⁾、Kalckar³⁾、Nikiforuk⁴⁾ によりウサギの骨格筋に adenylic acid deaminase の存在が確認され、その物理化学的性質について報告されているが、まだ結晶化には至らなかった。ところが、1957年 Lee⁵⁾ はウサギの骨格筋からこの酵素の結晶化に見事に成功し、結晶酵素を用いて重要な新しい知見を報告している。

齊藤、新井らは⁶⁾ コイ筋肉の有機リン酸化合物を検索中、新鮮な筋肉をゆっくり凍結させると ATP (adenosine triphosphate) が急激に減少する一方、5'-IMP が着しく蓄積されることを確かめ、この現象は筋肉中に生じた 5'-

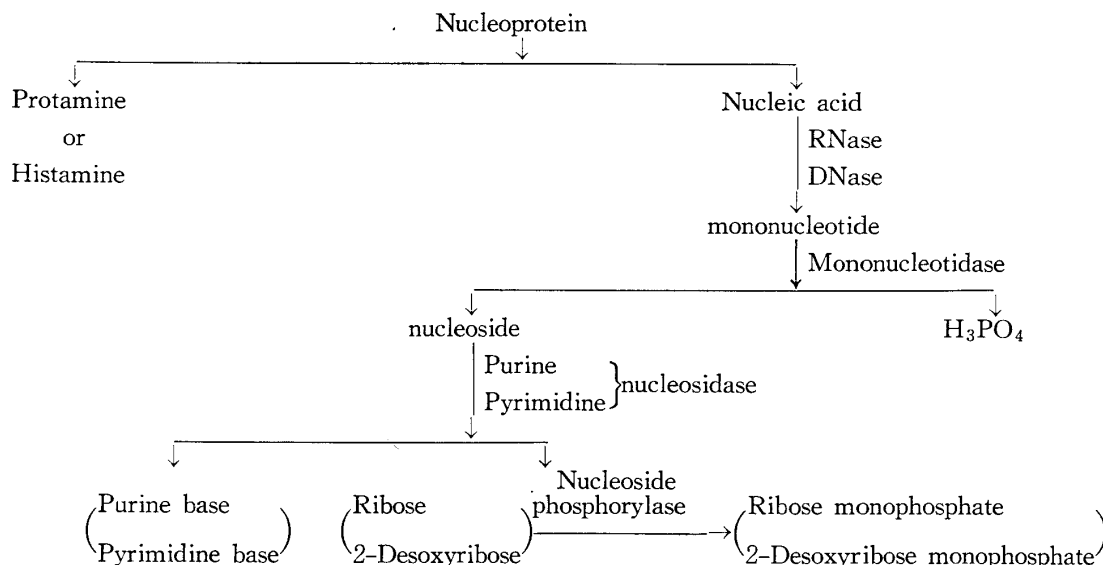


Fig. 1. Digestion of Nucleoprotein

Table 1 Component of Nucleic Acid

| | Base | Nucleoside (Base + Sugar) | Nucleotide (Base + Sugar + H ₃ PO ₄) | Source |
|------------|--|--|--|----------------------------------|
| Purine | Adenine (6-Aminopurine) | Adenosine | Adenylic acid | RNA, DNA |
| | Guanine (2-Amino-6-hydroxypurine) | Guanosine | Guanilic acid | RNA, DNA |
| | Hypoxanthine (6-Hydroxypurine) | Inosine Hypoxanthine desoxyribo- side | Inosinic acid Hypoxanthine desoxy- ridotide | Adenine Oxidative deamination |
| | Xanthine (2,6-Dihydroxypurine) | Xanthine riboside Xanthine desoxyriboside | Xanthine ribotide Xanthine desoxyribotide | Guanine Oxidative deamination |
| Pyrimidine | Cytosine (2-Hydroxy-6-amino- pyrimidine) | Cytidine | Cytidylic acid | RNA, DNA |
| | Thymine (2,6-Dihydroxy-5- methyl pyrimidine) | Thymidine | Thymidylic acid | DNA |
| | Uracil (2,6-Dihydroxy- pyrimidine) | Uridine | Uridylic acid | RNA |

AMP が adenylic acid deaminase の作用をうけ, 5'-IMP になったものと推定した. また, 奈良は⁷⁾コイ筋肉中の 5'-adenylic acid deaminase を Lee の方法で分別し, その性質を報告している.

一方, カビの生産する deaminase の研究もかなり行なわれており, taka-diastrase 中の deaminase は Mitchell⁸⁾ら, Kaplan⁹⁾ および中西ら¹⁰⁾により精製され, その酵素化学的性質が報告されている.

このように deaminase の全貌は最近漸く明らかにされつつあり, 近い将来あらゆる起源の deaminase の性状があきらかになることが期待できるようになった.

この総説ではこのように脚光をあびている adenylic acid deaminase を中心としてその生体内における意義, 生体内分布, 定量法, 酵素の分離精製, 結晶化, 性状およびその工業的利用について, 最近までの知見を総括する.

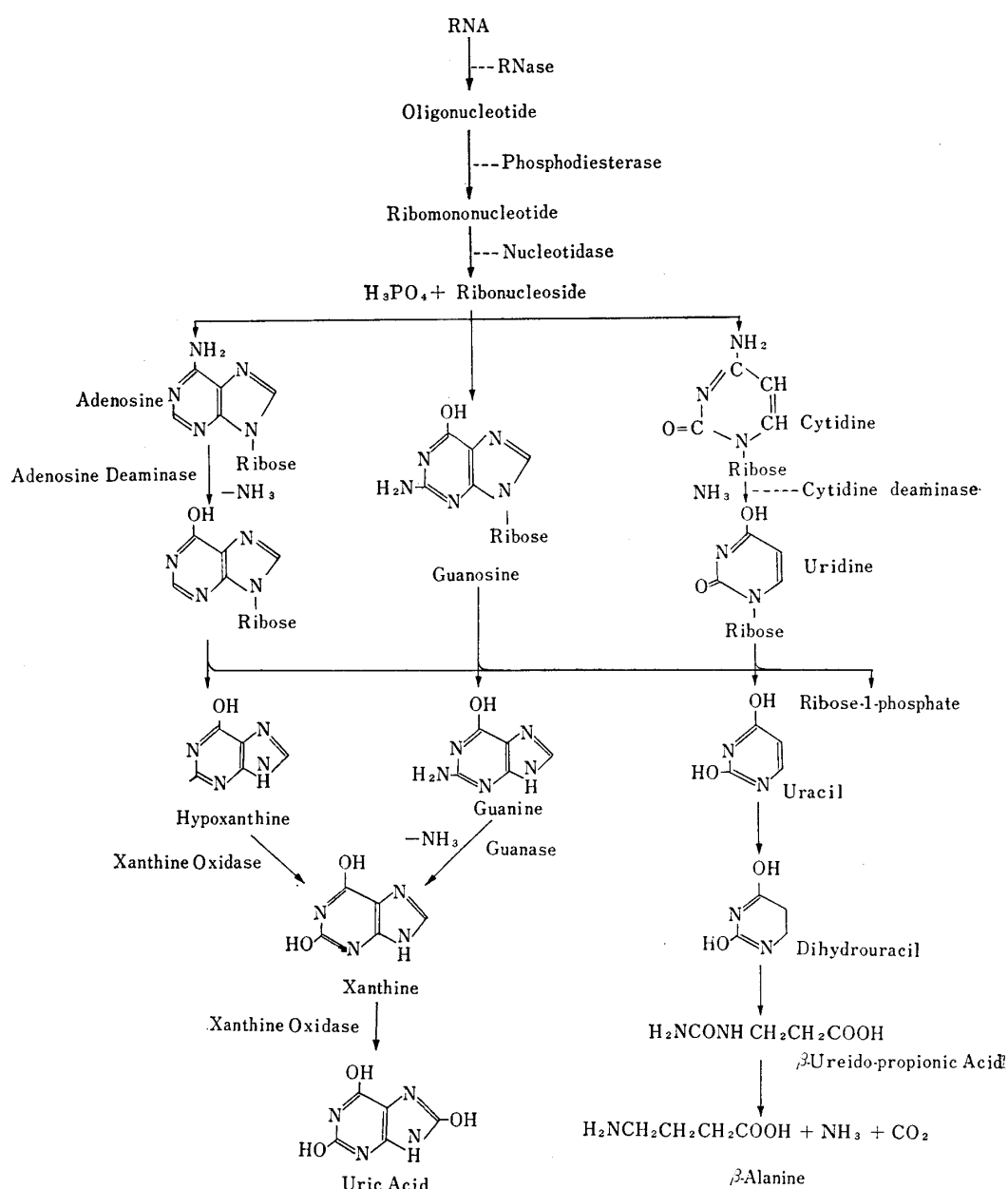


Fig2. Metabolism of Nucleic Acid

2. Deaminase の生体内における意義

食物中の核蛋白質は蛋白酵素により蛋白質部を分離して核酸となり、更に脾、腸液中の核酸酵素によりその構成成分にまで分解されて血液中に入る。

このように分解されて血液中に入った遊離のpurine及び pyrimidine 塩基のうち、組織核酸に入りうるものは adenine (主に RNA に、DNA には少い) のみで一定の割合で guanine に変化し一部は分解排泄され、他の塩基は全部代謝排泄される。

核酸の成分を Table I. に示す、またその生体内における代謝系路を Fig 2. に示す。この系路から核酸代謝には deaminase がいかに重要であるかがうかがわれる。

また、1957年 Cook らと Sutherland によって発見された cyclic AMP は Sutherland らの研究により、これがホルモンによる酵素活性調節のメカニズムの中で重要な役割をはたしていることが確認された。Fig3. はそのメ

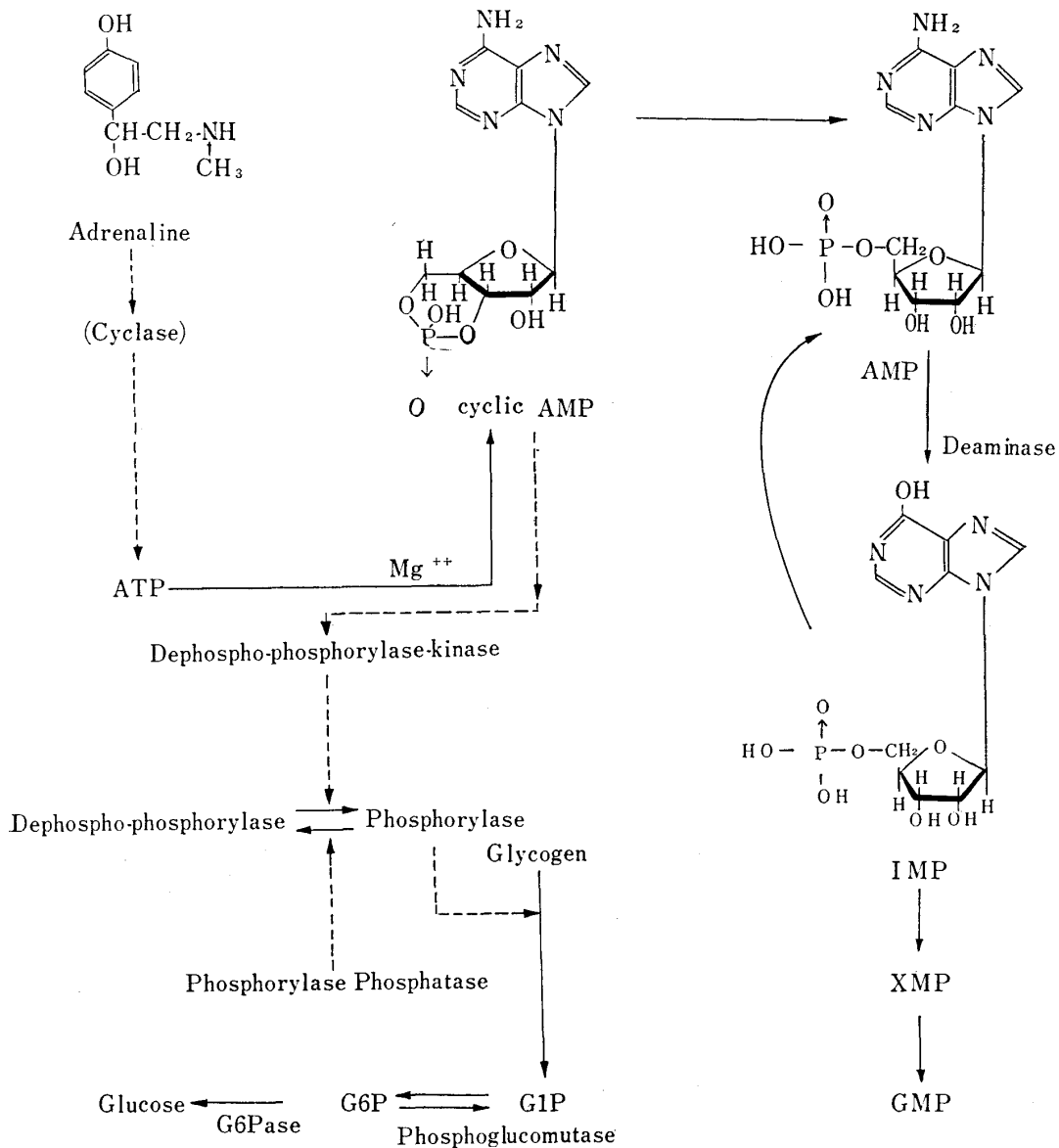


Fig3. Relation between Glycolysis and Hormone

カニズムを示したものであるが, adrenalinに限らず glucagon, ACTH, TSH, GH, 抗利尿ホルモン, serotonin, acetyl choline などの神経体液性物質の各種組織での作用機序の間に介存することが見いだされ, そのおもな作用点は phosphorylase 系であることが見いだされている.

このように ATP より Cyclic AMP となり, AMP を経て IMP となり, 筋内中に蓄えられ, 必要に応じて IMP より AMP, XMP, GMP が合成されてこれらの代謝系を形成している. このような代謝系においても deaminase は重要な役割をはたしている.

3. 5'-Adenylic Acid Deaminase の生体内分布について

生体内において deaminase は各種組織に存在するが, 特に多いのは骨格筋で骨, 皮膚, plasma 等にはほとんど存在しない.

Table II. The Distribution of the Deaminase in Tissues

| Tissue | M. adenylic acid deaminated at 1 % | Tissue | M. adenylic acid deaminated at 1 % |
|---------------------|------------------------------------|------------------|------------------------------------|
| Alimentary: | | Glandular: | |
| Appendix | 8.3 | Spleen | 14.8 |
| Jejunum | 6.6 | Testicles | 16.5 |
| Peyer's Patches | 12.1 | Salivary glands | 9.8 |
| Duodenum | — | Suprarenals | 15.5 |
| Duodenum } mucosa | 14.4 | Pancreas | 3.0 |
| Jejunum } scrapings | 11.6 | Thyroid | — |
| Colon | — | Kidney | 5.6 |
| Ileum | — | Ovary | 5.6 |
| Caecum | — | Liver | 2.8 |
| Pyloric mucosa | 2.2 | Pituitary | 24.6 |
| Stomach muscle | 5.1 | Nervous: | |
| Muscular: | | Spinal cord | 14.8 |
| Auricle | 9.4 | Brain(Whole) | 12.2 |
| Diaphragm | 108.0 | Cerebral cortex | 15.9 |
| Ventricle | 2.8 | Pituitary | 24.6 |
| Stomach muscle | 5.1 | Sciatic nerve | 4.8 |
| Skeletal muscle | 1145.0 | Respiratory: | |
| Circulatory: | | Lungs | 6.0 |
| Auricle | | Miscellaneous: | |
| Whole blood | | Embryonic tissue | 10.7 |
| Artery | | Bone marrow | 9.7 |
| Ventricle | | Uterus | 6.5 |
| Plasma | | Skin | 0.0 |
| | | Bone | 0.0 |

The units in which the deamination is expressed are $\mu\text{g. N/ml/min.}$ for the original tissue. Tissues ground with quartz in 20 vol. water. To 1 vol. extract plus 1 vol. of 2% nucleotide. pH 7.0. Room temperature.

¹¹⁾
Table II. は Conway および Cooke が家兎の各種組織について deaminase 力を比較したものである. この表からもみられるように deaminase は生体内において非常に広い範囲にわたって存在していることはあきらかである. なかでも骨格筋はエネルギー代謝の活発な所であり特異的に deaminase が多く存在している.

4. Purine Compounds および 5'-Adenylic Acid Deaminase の定量法

deaminase の定量には、遊離するアンモニアを定量する方法と紫外線吸収スペクトルを測定する方法がある。前者は再現性にとほしく非常に技術的にむづかしいので、現在ではもっぱら後者の方法が利用されている。

紫外部の differential spectrum を利用し purine 化合物を定量し、deaminase 活性を測定する方法は、1946年、Copenhagen 大学 (デンマーク) の Herman M. Kalckar¹²⁾ により確立せられた。この方法は極めてすぐれた方法²⁰⁾ であると考えられているので、ここに彼の業績の一端を紹介し、測定に際し注意すべきことを著者らの経験から二、三述べることにする。

4-1 Hydroxy purine 化合物の定量

Table III は hydroxypurine 類の molecular extinction coefficients (ϵ) および absorption maxima をまとめたものである。

Table III. Molecular Extinction Coefficients of Hydroxypurines.

| Compounds | $\epsilon \times 10^{-4}$ | Maxima | PH | Bibliographic reference |
|------------------------------|---------------------------|------------|------------------|---------------------------------------|
| Hypoxanthine | 0.85 | 249m μ | Water | Holiday ¹³⁾ |
| Hypoxanthine* (Synthetic) | 1.05 | 250 | 7.2 ⁺ | Kalckar ¹²⁾ |
| Inosine | 1.33 | 247 | 2 | Gulland and Holiday ¹⁴⁾ |
| " | 1.18 | 250 | 2.7 ⁺ | Kalckar ¹²⁾ |
| Xanthine | 1.1 | 270 | Water | Stimson and Reuter ¹⁵⁾ |
| Guanine | 0.9 | 250 | 6.6 | Heyroth and Loofbourow ¹⁶⁾ |
| Guanosine | 0.8 | 250 | 7.2 ⁺ | Kalckar ¹²⁾ |
| Uric acid | 1.35 | 250 | Water | Gulland and Story ¹⁷⁾ |
| | 1.22 | 290 | 7 | Stimson and Reuter ¹⁵⁾ |

* Prepared by Dr. E. Bueding Western Reserve University.

+ Glycylglycine buffer, PH 7.2, 0.05M. Correction was made for absorption due to the glycylglycine.

これらの化合物は波長 250~290m μ の紫外部領域において吸光係数は、10,000から15,000を示す。

しかし、個々の化合物についてみれば hypoxanthine 及びその誘導体は 250m μ において maximal absorption を示し、尿酸は 290m μ において吸収ピークを持つ。

このように吸収スペクトルが異なるので、その extinction changes (ΔE) を測定することにより hydroxypurine 化合物を定量することができる。

4-1-1 Hypoxanthine の定量

Hypoxanthine (0.5 to 5 γ per ml) を 0.1 M-glycyl glycine buffer, pH 7.5 となし、酵素を飽和し、精製した xanthine oxidase を 10~20 γ 添加し、 ΔE を 290m μ と 248m μ にて測定する。

4-1-2 Inosine の定量

Inosine は hypoxanthine riboside であるから ribosidic linkage

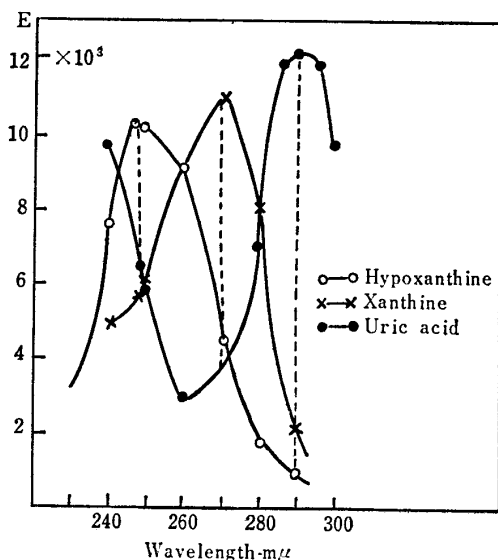


Fig4. Molecular extinction curves for hypoxanthine, xanthine, and uric acid

Table IV. Optical Constants of Hydroxy purine Reaction*

| Hydroxypurine, γ per ml | Enzymes used | ΔE_{290} | ΔE_{270} | ΔE_{260} | ΔE_{248} |
|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Hypoxanthine \rightarrow uric acid | Xanthine oxidase | +0.080 | -0.007 | | -0.030 |
| Xanthine \rightarrow uric acid | Xanthine oxidase | +0.066 | -0.053 | | 0 |
| Guanine \rightarrow uric acid | " " + guanase | +0.048 | -0.025 | | |
| Uric acid \rightarrow allantoin | Uricase | -0.072 | | -0.023 | |

* Extinctions, measured in 1 cm, cells.

Table V. Determination of Hypoxanthine

Solution of hypoxanthine in glycylglycine buffer, pH 7.5, added to hypoxanthine-free liver filtrate and saturated with oxygen. Enzyme xanthine oxidase (10 γ of protein per ml of mixture) added, Oxidation to uric acid.

| Concentration of hypoxanthine (γ per ml) | ΔE_{290} | |
|---|-------------------------|--|
| | Experimental (observed) | Theoretical (calculated from Table II) |
| 2.2 | 0.162 | 0.176 |
| 3.3 | 0.270 | 0.264 |
| 5.5 | 0.431 | 0.440 |

を加水分解してから hypoxanthine と同様に定量する。inosine の希釈液は 0.5N-H₂SO₄ 中で 3 時間煮沸することにより遊離の hypoxanthine と ribose に分解される。

Table VI. Determination of Inosine

Inosine added to oxygen-saturated glycylglycine, 0.1 M, pH 7.97. Addition of xanthine oxidase did not change E₂₉₀ or E₂₄₈, Addition of nucleosidase caused the recorded changes in E.

| Inosine present | ΔE_{290} | Inosine* calculated from ΔE_{290} | ΔE_{248} | Inosine* calculated from ΔE_{248} |
|-------------------|------------------|---|------------------|---|
| 2 γ per ml | +0.076 | 1.9 γ per ml | -0.033 | 2.2 γ per ml. |
| 4 | +0.154 | 3.9 | -0.064 | 4.3 |
| 6 | +0.216 | 5.4 | -0.095 | 6.4 |

* From the data in table IV. 0.505 γ of hypoxanthine per microgram of inosine

4-1-3 xanthine の定量

Xanthine は hypoxanthine と同様な方法により定量することができる。即ち, xanthine に xanthine oxidase を用させ尿酸とし, xanthine および尿酸の 248, 270 及び 290m μ の E から計算することができる。

4-1-4 Guanine の定量

Guanine は guanase と xanthine oxidase の作用により尿酸となし, ΔE_{290} (+0.048) および ΔE_{270} (-0.025) より計算する。

4-1-5 Guanosine の定量

Guanosine は nucleoside phosphorylase, xanthine oxidase 及び guanase の作用により尿酸となし guanine と同様な方法で定量する。

4-1-6 尿酸の定量

尿酸は特異的な比色定量法が存在するが、ここでは紫外部吸収による方法を述べる。即ち、 ΔE_{290} を測定し尿酸を定量する。

4-2 Adenine 化合物の定量

Table V. は adenine 化合物の extinction coefficient を示したものである。この表からわかるように adenine 化合物はほとんど同じスペクトルを示し 260m μ に吸収極大を有する。その吸光係数はほぼ 1.5×10^{-4} である。adenine 化合物を定量するには deaminase により hypoxanthine 化合物にかえその spectrum shift を利用して定量することができる。

Table VII Extinction Coefficients of Adenine Compounds

| Compound | $\epsilon \times 10^{-4}$ | Maxima | PH | Bibliographic reference |
|------------------------|---------------------------|--------|----|------------------------------------|
| Adenine | 1.42 | 260 | 7 | Gulland and Holiday ⁴¹⁾ |
| Adenosine | 1.43 | 260 | 7 | Myrbäck et al ¹⁸⁾ |
| " | 1.51 | 260 | 7 | Kalckar ¹²⁾ |
| 5-Adenylic acid | 1.58 | 260 | 7 | Kalckar |
| Adenosine triphosphate | 1.49 | 260 | 2 | Gulland and Holiday ¹⁴⁾ |
| " " | 1.35 | 260 | 11 | " " |
| " " | 1.6 | 260 | 7 | Kalckar ¹²⁾ |

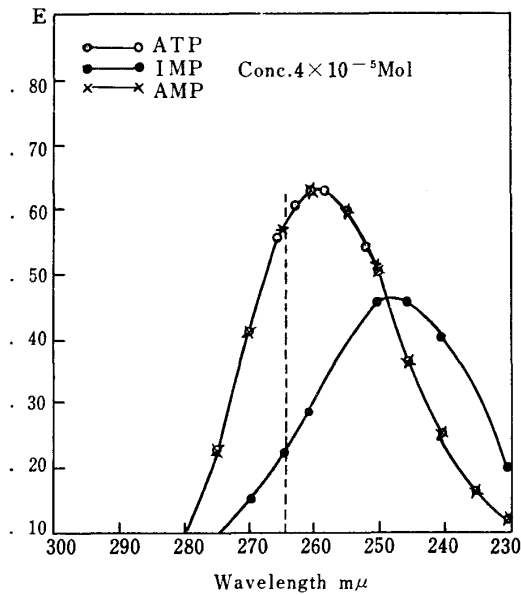


Fig 5. Absorption curves of adenosine triphosphate(ATP), adenosinemonophosphate(AMP), and inosine monophosphate (IMP).

4-2-1 Adenosine 化合物の定量

Adenosine (4 ~16 γ /ml) を 0.1 M-glycylglycine (pH7.2) にとかし、adenosine deaminase を 0.12~3 γ /ml 加える。そして 265m μ の吸収の減少を測定する。

4-2-2 Adenylic acid の定量

Adenylic acid は muscle deaminase を使用して inosinic acid にかえ、 ΔE_{265} を測定することにより定量できる。

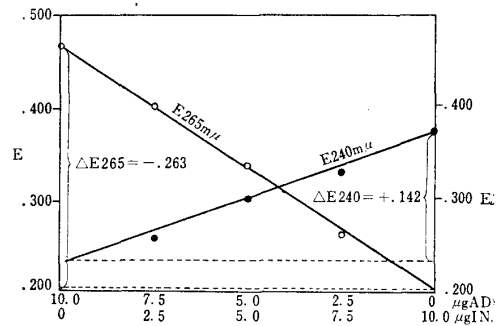


Fig 6. Optical densities of mixtures of adenosine and inosine at 240 and 265m μ . Line E 265m μ shows the rate of decrease in density at 265m μ which would result from conversion of adenosine to inosine, while Line E240m μ indicates the expected increase in density at 240m μ due to such a reaction. Concentrations are given in micrograms per ml.

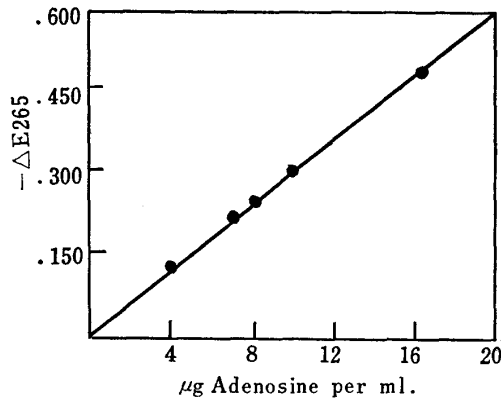


Fig 7. Illustration of the proportionality between decrease in absorption (ΔE_{265}) and adenosine concentration resulting from enzymatic conversion to inosine.

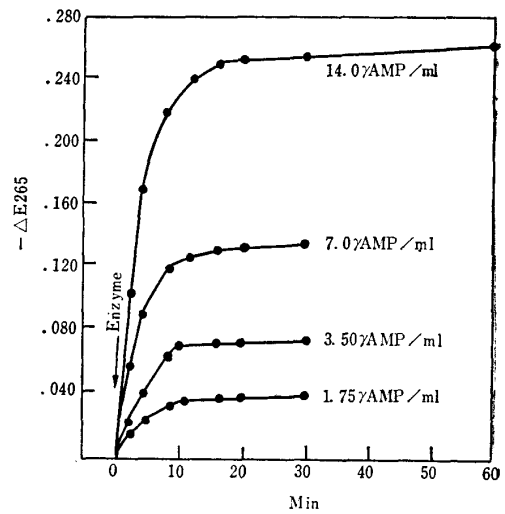


Fig 8. Time curves showing the fall in absorption (ΔE_{265}) resulting from the addition of muscle deaminase to varying amounts of adenosine monophosphate (adenylic acid). proportionality between final ΔE_{265} and adenylic acid concentration is also shown.

Table VIII. Microdetermination of Adenosine

aliquots (0.106ml) of adenosine solutions (1 and 2 γ per ml) in 0.1-M-glycylglycine, pH 7.5 were pipetted into 2×10 mm. quartz cells. Adenosine deaminase (0.2 γ of protein in 0.003ml) was added.

| ΔE_{265} | Adenosine found γ | Adenosine present γ |
|------------------|--------------------------|----------------------------|
| -0.030 | 0.12 | 0.11 |
| -0.053 | 0.21 | 0.22 |

4-3 Deaminase の定量

Adenylic acid deaminase は adenylic acid を基質として用い、 $\Delta E_{265} m\mu$ を測定することにより定量できる。

4-3-1 測定波長の範囲

²⁰⁾ 著者らの実験の結果、測定に使用できる波長範囲は Fig 9. のごとくで、波長 260~270 $m\mu$ の範囲では良好な直線関係となり、deaminase の測定に使用できることがわかった。

4-3-2 測定法 (Aspergillus Deaminase)

酵素活性を測定しようとする酵素を ΔE_{265} が 0.100 位になるように一定量サンプリングし、酵素液を調製する。

10ml 容目盛付試験管に 5'AMP (5 mg/ml) 1 ml. M/15 phosphate buffer. pH 5.6. 2 ml を入れ 37° で 15 分間反応させる。反応終了後、直ちに 2% PCA 4 ml を加えて反応をとめる。反応停止液より 2 ml サンプリングし、

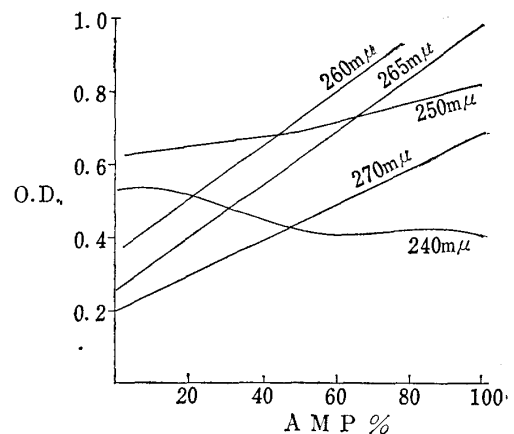


Fig 9. Relation between O. D. and AMP concentration

100mlに fill up 後, 波長 265m μ にて吸光度を測定する.

別に 0 時間用として前記の 5'-AMP 1ml, phosphate buffer 2ml, 2% PCA 4ml を 10ml 容目盛付試験管にサンプリングし, 100ml に定容後同様に測定する. 直線範囲は $\Delta OD_{265} = 0.03 \sim 0.130$ である. この測定法で最も注意すべきところは「必ずセル補正を行なう」ことである.

5. 5'-Adenylic Acid Deaminase の精製と結晶化

5'-Adenylic acid deaminase の精製は多くの研究者により行なわれているが, ここでは YA-PIN LEE⁵⁾ の精製結晶化法を紹介することにする.

抽出液: ウサギの首を切り, 直ちに筋肉をとり出し凍結させる. そしてこれを 0.06M K_2HPO_4 : 0.3M KCl, 0.09M- KH_2PO_4 を含む PH6.5 の塩類溶液 3.5 倍量と waring blender で 1 分間ホモジェナイズする. 1 時間後 (約 3°C) 遠心分離 (1500 \times G, 30min) し, 酵素液を抽出する. 残査は再び同様に操作し抽出する.

低塩濃度分画, 抽出液を冷水で 10 倍積し, 15 分間攪拌 (30°C) 後シャープレスで分離する. 沈澱は 0.5M-KCl 溶液にとかし, 蛋白濃度 1.5% に調整する (通常 200ml/100g muscle).

加熱分画: この酵素液に 1M- $MgCl_2$ 溶液を加え, 0.02M の濃度にし, 1M- K_2HPO_4 溶液にて pH を 6.8 に調整する. この液 1000ml を 2l のビーカーで 50°C, 2 分間加熱し, 3°C まで冷却後遠心分離 (1500 \times G, 30min) する. 沈澱を 0.5M-KCl 溶液に懸濁し 45°C に加熱, 灼過する. 遠心分離液を合し, 0.5N-HOAC 溶液で pH を 6.5 に調整する (通常 100ml/100g muscle).

エタノール分画: pH 調整液を -2°C に冷却, 95% アルコールをゆっくり 7% になるまで加え (-2°C), 遠心分離し, 上澄に 95% アルコールを加えて 23% にする (-5°C). 遠心分離して得た沈澱を 0.5M-KCl 溶液にとかし, 蛋白濃度を 0.5% に調整する (通常 20ml/100g muscle).

硫酸分画: pH 6.5, 3°C にて硫酸分画を行ない, 硫酸 1.26~2.26M の濃度範囲で沈澱する区分をとり, 0.5M-KCl 溶液にとかし, 蛋白濃度を 0.5% に調整する (通常 10ml/100g of muscle).

低塩濃度分画: 0.02M-KCl 溶液の 10 倍量に対し, 3°C にて 8 時間透析する. 沈澱は 0.5M-KCl にとかし, 蛋白濃度を 0.5% に調整する (通常 5ml/100g of muscle).

磷酸カルシウムゲル分画: 磷酸カルシウムゲルは Keilin and Hartree の方法で調製し, ゲルの 2ml に酵素液 10ml を加え, 0.5N-HOAc 溶液で pH 6.5 に調整し, 3°C にて 30 分間攪拌後遠心分離し, ゲルの等量の 0.3 M-KCl 溶液で洗滌し, 次にゲルの半量の pH 8.5, 0.08M- K_2HPO_4 溶液で 2 回溶離する (溶離時間 3°C, 2 時間)

Table IX, Purification of 5'-Adenylic Acid Deaminase

3 Kilos of Rabbit Skeletal Muscle,

| Fraction No. | | Total protein | Total units | Units per mg | Purification | Yield |
|--------------|---------------------------|---------------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| | | mg | | | | Percent (100) |
| 1. | Muscle extract | 340,000 | 3,730,000 | 11* | 1 | 90 |
| 2. | Low salt ppt | 168,000 | 3,360,000 | 20 | 1.8 | 66 |
| 3. | Heat-treated fraction | 49,500 | 2,470,000 | 50 | 4.5 | 34 |
| 4. | Ethanol fraction | 3,960 | 1,270,000 | 320 | 29 | 25.5 |
| 5. | Ammonium sulfate fraction | 1,320 | 960,000 | 720 | 65.5 | 24 |
| 6. | Low salt fraction | 850 | 930,000 | 1,100 | 100 | 14.5 |
| 7. | Ca phosphate gel elute | 120 | 540,000 | 4,500 | 410 | 5 |
| 8. | Crystals (1st crop only) | 18 | 183,000 | 10,200 | 920 | |

* This value is not corrected for the inhibition caused by phosphate(25).

結晶 deaminase: 高比活性の溶離液を集め, pH8.0 に調整後 -3°C に冷却し, 95%アルコールを 0.15 容量攪拌しながらゆっくり加える. 遠心分離して得た沈澱物を 0.5M-KCl の少量にとかし, 蛋白の飽和溶液をつくる. これを攪拌しながらゆっくり冷却すると結晶が折出する.

6. 5'-Adenylic Acid Deaminase の物理的, 化学的性質

6-1 基質特異性

5'-adenylic acid deaminase の基質特異性はその起源により異なり, muscle deaminase は *Aspergillus deaminase* にくらべ特異性が強い. これを表にすると下のようである.

Table X. Substrate Specificity of Deaminases

| Investigator | Origin | Substrate | Unsubstrate |
|--------------------------|-------------|--|---|
| Kaplan ⁹⁾ | Asp, oryzae | 5'-AMP, 3'-AMP ATP, DPN, ADPR ADP, Adenosine | 2'-AMP, TPN, Adenine 3', 5'-Diphosphoadenosine 2', 5'-Diphosphoadenosine |
| Nakanishi ¹⁰⁾ | Asp, oryzae | ATP, ADP, 5'-AMP, NAD, NADH, FAD 3'-AMP, 2'-AMP, 5'Deoxy- AMP, Adenosine, Deoxyadenosine β -Glucopyranosyladenine | Cytidine, 2'/CMP, 3'/CMP 5'/CMP, Guanosine, 2'/GMP 3'/GMP, 5'/GMP, Adenine NADP, NADPH, α -Glucopyranosyladenine |
| Nara ⁷⁾ | Carp | 5'AMP | 3'AMP, Adenosine |
| Lee ⁵⁾ | Rabbit | 5'AMP | ADP, ATP, Adenosine. Adenine, 2,6-Diaminopurine 2'AMP, Cytidine-5'-phosphoric acid, Guanosine-5'-phosphoric acid, Histidine, Lysine, Creatine |

6-2 酵素化学的性質

5'-adenylic acid deaminase は一般に至適 pH は 6 付近であり, 各種のカチオンおよびアニオンにより阻害される. 安定 pH は至適 pH の付近であり, 低温では水溶液中にてもかなり安定である.

Table XI. Property of Deaminases

| | | Opt. pH | Opt. temp. | Stabilit. pH | Inhibitor | Actibator |
|--------------------------|-------------|------------------------------|------------|--------------|---|-----------|
| Kaplan ⁹⁾ | Asp, oryzae | 6.3 | | | | |
| Nakanishi ¹⁰⁾ | Asp, oryzae | 5.5 | | 5.5 | Cu^{++} , Ag^{+} , Fe^{++} , Hg^{++} | |
| Nara ⁷⁾ | Carp | 6.4 (succinate buffer) | 40°C | | Hg^{++} , Zn^{++} , F^{-} , COO^{-} , COOH , PO_4^{---} ICH_2COOH , PCMB | ATP |
| Lee ⁵⁾ | Rabbit | 6.4 (succinate buffer) | | | Zn^{++} , Cu^{++} , Fe^{+++} , Ag^{+} Orthophosphate, Pyrophos- phate Fluorid, <i>P</i> -Mercuri benzene sulfamic acid | |

6-3 物理的性質その他

5'-adenylic acid deaminase の物理的性質はまだあまりよくわかっていない。それ故、ここでは Lee⁵⁾ と Nara⁷⁾ の研究データを比較するにとどめる。

Table XI. Physicochemical properties

| | Lee ⁵⁾ | Nara ⁷⁾ |
|--------------------------------------|--|--|
| Diffusion coefficient | $3.76 \times 10^{-7} \text{cm}^2, \text{sec}^{-1}$ | |
| Sedimentation constant | $12.29 \times 10^{-13} \text{sec}$ | |
| Molecular weight | 3.2×10^5 | |
| Isoelectric point | pH5.6 | |
| Ratio, OD280/OD260 | 1.11 (succinato) | |
| $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280m μ | 16.7 (succinate) | |
| E_{max} | 275~276m μ | |
| Nitrogen content | 16.5% | |
| Michaeris-Menten constant (Km) | 1.43×10^{-3} (pH6.4, 30°C) | 1.52×10^{-3} (pH6.4, 30°C) |
| Velocity constant (k) | $6.67 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ | $4.46 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ |
| Turnover number | 598,000 moles per mole Proteine per min | |
| Energy of activation | 10,500 cal/mol | 8,000 cal/mol |
| Energy of inhibition | 96,000 cal/mol | 123,000 cal/mol |
| Order of the reaction | | first order reaction |

7. Deaminase の工業的利用

最近、核酸化学の急速な発展にともないイノシン酸製造法も大きく変化しつつある。

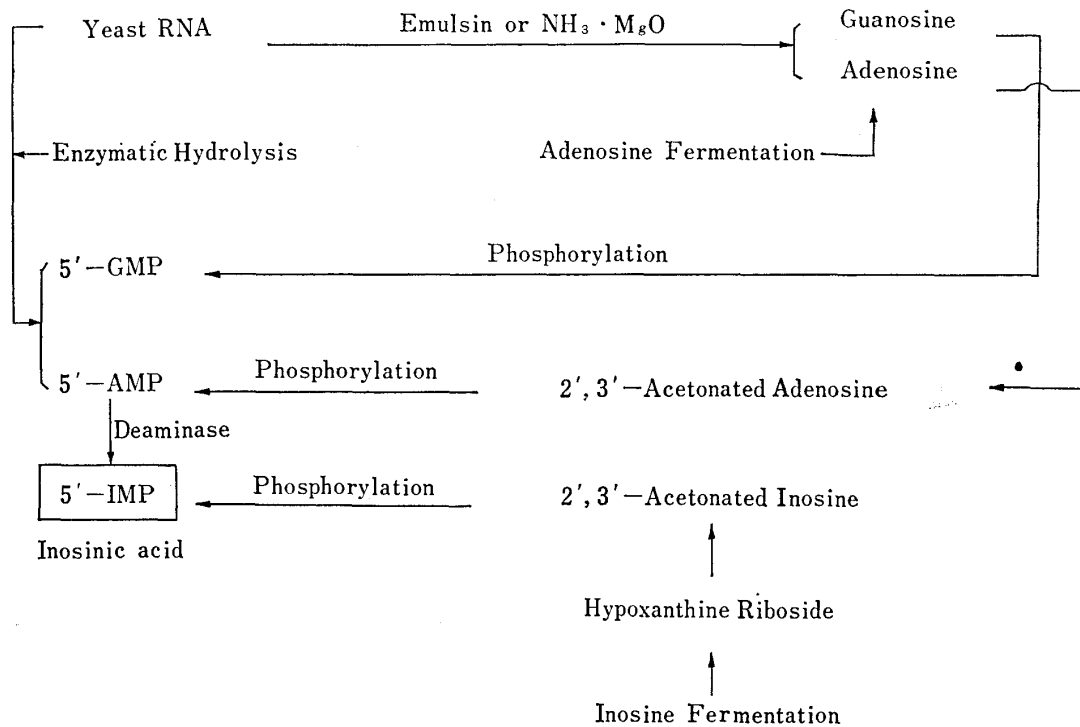


Fig. 10. Process of Industrial Production of IMP.

イノシン酸は1847年 Liebig により牛肉抽出液から初めて単離された化合物で, nucleotides の中では歴史的に最も古く発見されたものである。しかも, 他の nucleotides は核酸の化学的あるいは酵素による加水分解により生成するが, イノシン酸は直接筋肉から抽出精製される点で特異的である。それ故, 以前はイノシン酸の製法はもっぱら抽出法で行なわれていたが, 核酸化学の進歩とともにパルプ廃液より容易にイーストRNAが生産できるようになったので現在はイースト RNA を用い, これを酵素により分解し AMP および GMP となし, AMP をデアミナーゼにより脱アミノ化し IMP とする製造法が用いられるようになった。

また, 最近のヌクレオチド発酵の急速な発展にともない, 直接 adenosine または inosine を製造し, これを酵素により燐酸化して IMP または AMP をつくり, AMP は deaminase により IMP とする製造法が開発されつつある。いずれにしても adenylic acid deaminase はイノシン酸製造に必要な酵素で今後ますます利用されることになる。

5'-nucleotide の中で呈味性を示すのは Fig11. のように塩基が purine であり, 6位が OH, リボースの5'位にリン酸が結合していることが必要であることが国中, 中尾らによって認められている。

8 工業用 Deaminase の製造法

工業用 deaminase は資源的理由から *Aspergillus* 属より生産されるものが用いられている。著者らが最近得た *Aspergillus* 属の一菌株は, 培養時間と酵素形成を観察すると次の如くなる。

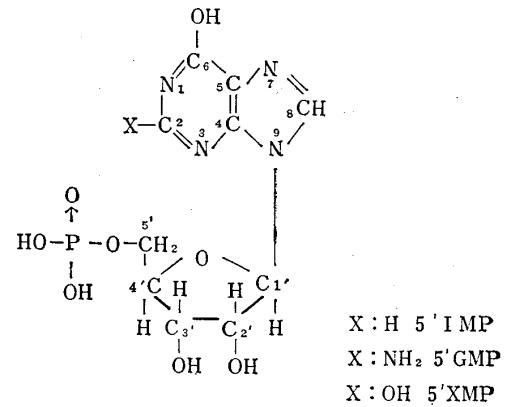


Fig11. The Relation between the Taste and Construction of Nucleotides

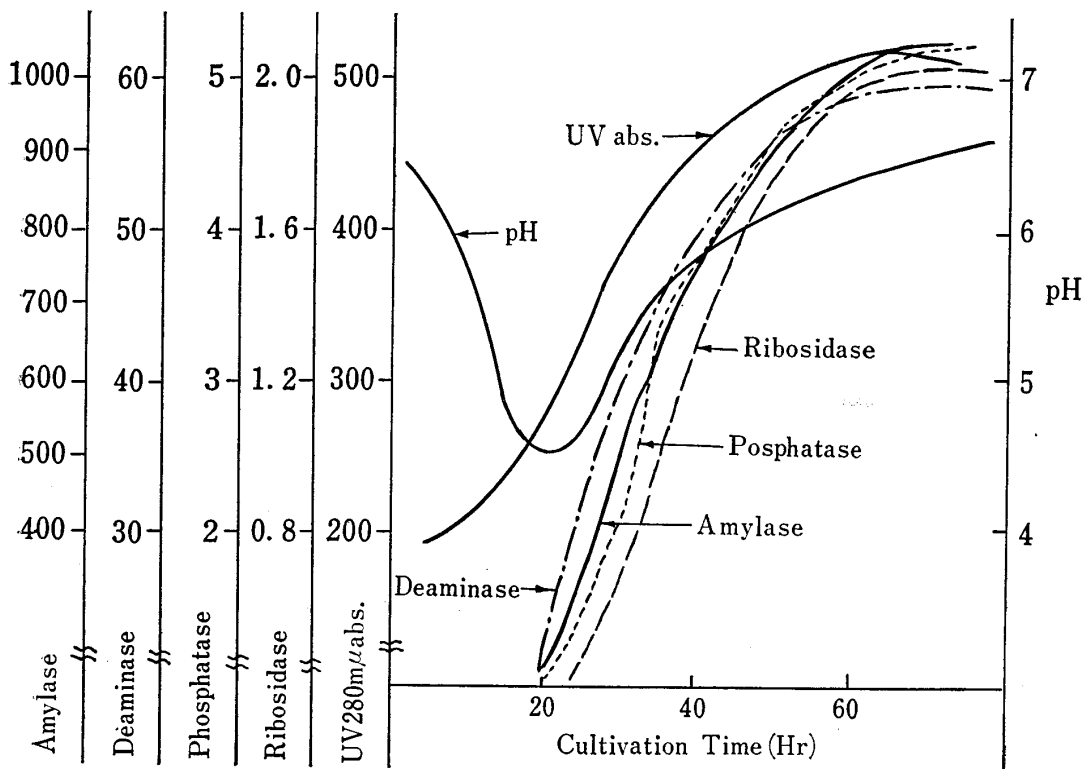


Fig.12. Culturing Time and Formaton of Enzymes
The value was expressed as dried matter

Aspergillus 属は強力なる deaminase 生産能をもっているが、反面イノシン酸製造のときに、その収率を低下させる酵素を必ず含んでおり、これらの酵素の除去が問題となる。

これらのうち ribosidase は菌株により生産能がかなり異り、性状、pH が他の deaminase, phosphatase と異なるので問題はないが、phosphatase は deaminase に必ず随伴して生産されるので最も収率に影響をあたえる。そこで著者らは、²²⁾ この問題解決のため種々の分離法を研究した結果イオン交換樹脂処理が最も有効であることを知った。結果は次の如くである。

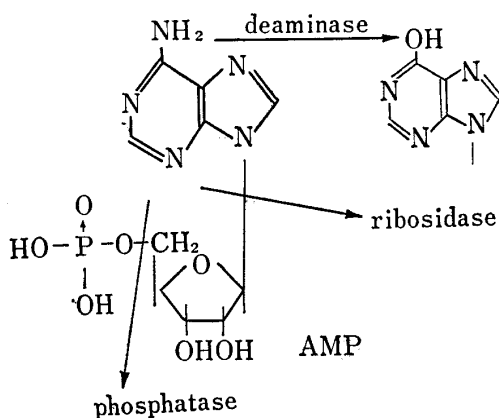


Table XIII Procedure of Separation of Deaminase and Phosphatase

| | | Deaminase | | Phosphatase | |
|---------------|--------------|-----------|----------|-------------|----------|
| | | Activity | Recovery | Activity | Recovery |
| Enz. Soln. -1 |125u/ml | | 100 | 15u/ml | 100 |
| ↓ | | | | | |
| Duo. CS101-Na | | | | | |
| ↓ | | | | | |
| XE225-Cl |120u/ml | | 96 | 1u/ml | 6.7 |
| ↓ | | | | | |
| Enz. Soln. -2 |120u/ml | | 96 | 1u/ml | 6.7 |
| ↓ | | | | | |
| Conc. Enz. |1500u/g | | 33.6 | 25u/g | 4.7 |

おわりに

著者らは以上のように adenylic acid deaminase を主体とし、生体内における分布とその意義、定量法、酵素の分離精製、ならびに微生物の生産する deaminase について最近までの知見を総括してみた。最近になって漸く、しかも急激に deaminase の研究が活発化してきたので、近い将来あらゆる起源の deaminase の酵素的性質があきらかにされ、応用方面への開発利用が実現するのもそう遠くはないと考えられる。

文 献

- Schmidt, G: Z. physiol. Chem, **179**, 243 (1928)
- Conway, E. Jy Cook, R: Biochem. J. **33**, 479 (1939)
- Karckar, H. M: J. Biol, Chem, **167**, 461 (1947)
- Nikiforuk, G. Colowick, S. P: J. Biol, Chem, **219**, 119 (1956)
- Lee, Y. P: J. Biol, Chem, **227**, 987, (1957)
- 斎藤恒行, 新井健一: 日水誌, **22**, 569 (1957)
- 奈良盛: 生化学, **32**(No3)204 (1960)
- Mitchell, H. K, Gordon, M. and Haskins, F. A: J. Biol. Chem, **180**, 1071 (1947)
- Kaplan, N. O, Colowick, S. P, and Ciotti, M. M: J, Biol. Chem **194**, 579 (1952)
- 中西一夫, 湊貞正, 田川忠: 生化学, **37** (No3), 137 (1965)
- Conway. E. J, Cook, R: Biochem. J, **33**, 479 (1939)
- Kalckar H. M, : J. Biol. Chem, **167**, 429, 445, 461 (1947)
- Holiday, E. R: Biochem. J, **24**, 619 (1930)
- Gulland, J. M. and Holiday, E. R: J. Chem. Soc, 765 (1936)
- Stimson, M. M, and Reuter, M. A: J. Am. Chem, Soc, **65**, 153 (1943)

- 16) Heyroth, F. F, and Loofbourow. J. R: J. Am. Chem. Soc, **53**, 3441 (1931)
- 17) Gulland, J. M, and Story, L. F: J. Chem, Soc, 692 (1938)
- 18) Myrbäck, K, Von Euler, H, and Hellström, H: Z. physiol. Chem. **212**, 7 (1932)
- 19) 国中明: 農化 **34**, 489 (1960)
- 20) Nakao, Y; Ogata, K: Agr. Biol. Chem **27** 491 (1963)
- 21) 杉浦 衛, 伊藤万蔵, 浅野弘: 日本薬学会東海支部例会発表 (その1) (1965.6)
- 22) 杉浦 衛, 伊藤万蔵, 浅野弘: 日本薬学会東海支部例会発表 (その2) (1965.6)

吉田甚吉: Private Brand について

Jinkichi Yoshida: On Private Brands

1. Preface
2. Definition of Private Brand
3. Development of Private Brands
4. Retailers' Private Brand Policies.
 - (1) Reasons for a Retailer's Private Brand.
 - (2) Prerequisites to a successful Private Brand Policy.
5. Wholesalers' Private Brand Policies.
 - (1) Reasons for a Wholesaler's Private Brand.
 - (2) Prerequisites to a Successful Private Brand Policy.
6. Manufacturers' Private Brand Policies.
7. Conclusion.

1. 序

Brand (商標) とは, 企業がその販売又は提供する商品またはサービスについて, 他企業のそれと区別して用いる名前, 象徴, 意匠. またはこれらの結合体^(注1)をいう. ただし, 本稿での Brand は, Brand の付せられた商品, つまり商標品 (branded goods) の意味をも有する. アメリカでは, 商標合戦 (battle of the brands) は, 単に, メーカーの有名商標品, すなわち, "National Brand" 間の競争を意味するのみでなく, それらと, 販売業者の商標品, すなわち, "Private Brand", 特に大チェーン (chain store) の Brand との競争をも意味し, しかも最近では, 後者の競争が重大視されている. クリストポーロス (G. Christopoulos) 氏は, "Private Brand は, 明日のマーケティングのダーク・ホース" といってその将来を予告し, またバウティン (P. Voutin) 氏は, "小売革命の第2ラウンド" としてその意義は強調している. 流通革命の進度が, 日本とアメリカとは大いに異なり, したがって, これらの事柄について両国を同一に断ずることは早計であるが, しかし, わが国でも, 任意連鎖店 (Voluntary chain) や, 共同仕入機構などで, その Brand が強調せられるなど, 類似の徴候が現われ始めてい

(注1) 三上富三郎: 商品政策 p.139.