



| | |
|--------------|---|
| Title | 固定化尿素サイクル酵素を応用したアンモニア解毒システムに関する研究 |
| Author(s) | 占部, 日出明 |
| Citation | 大阪大学, 1979, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/32558 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文について をご参照ください。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

| | |
|-------------|--|
| 氏 名・(本籍) | 占 部 日出 萌 |
| 学 位 の 種 類 | 薬 学 博 士 |
| 学 位 記 番 号 | 第 4 7 4 7 号 |
| 学位授与の日付 | 昭 和 54 年 11 月 13 日 |
| 学位授与の要件 | 薬学研究科 応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当 |
| 学 位 論 文 題 目 | 固定化尿素サイクル酵素を応用したアンモニア解毒システムに関する研究 |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 三 浦 喜 温 (副査) 教 授 近 藤 雅 臣 教 授 鎌 田 皎 教 授 青 沼 繁 |

論 文 内 容 の 要 旨

固定化酵素の臨床的利用には、体内に直接投与する場合と体外循環系の中に酵素反応器を組み込んで用いる場合に大別される。

ある種のリンパ性腫瘍に有効である L-asparaginase の固定化は比較的よく研究され^{1),2)}ており、種々の担体に固定化されたものが調製され、実験動物を使って応用の可能性が追求されている。将来において固定化酵素は酵素欠損症や臓器障害による代謝異常症の有効な治療手段となるものと期待されている。

固定化酵素を体外循環系に適用する際の問題点としては酵素の安定性、生体適合性と反応性等があるが、本研究においては酵素の安定性及び反応性にかかわる問題点を探り、さらには、肝機能の 1 部 (アンモニアの解毒) を体外で代行せしめることを目的として、尿素サイクルに関与する 5 種の酵素 (Fig. 1) を固定化、その反応性を調べた。固定化条件の検討にあたっては、関与する反応が複雑で比活性が低くかつ比較的不安定^{3),4)}な 2 種の酵素 carbamoyl phosphate synthetase (CPS) 及び arginino-succinate synthetase (ASS) に重点を置いた。

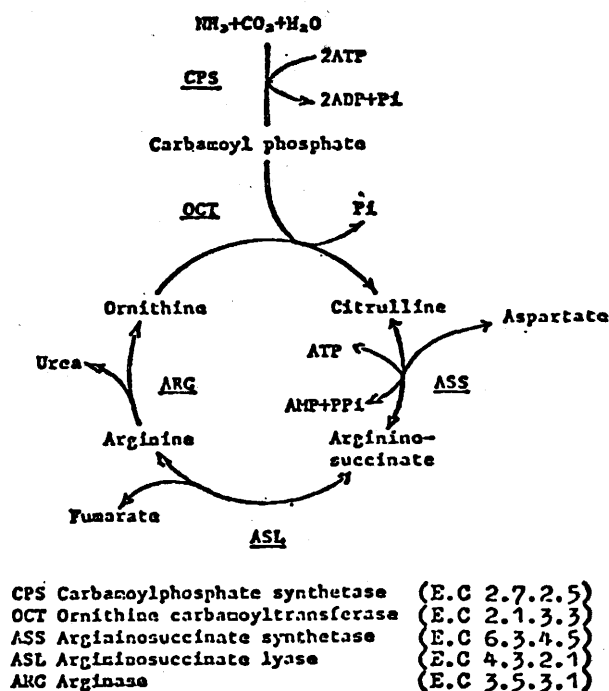


Fig. 1 Urea cycle

第1章 Carbamoylphosphate synthetase—Ornithine carbamoyltransferase の固定化とその特性

Carbamoylphosphate synthetase—Ornithine carbamoyltransferase(CPS—OCT) の調製は動物種の中でも比較的安定で、P.P.Cahen 及び S.Grisolia などによって研究され³⁾ている *hullfrog* の肝臓より抽出、部分精製したものをを用いた。代表的な五種の固定化方法によって CPS を固定化し、その調べた結果を Table 1 に示した。生体の適合性を考慮したポリアクリルアミド包括法、マイクロカプセル化（界面重合法⁵⁾）では、固定化条件下で CPS の失活がおこり、活性のある標品が得られなかった。水中乾燥法によるマイクロカプセル化では活性の高い固定化酵素が得られたが、酵素本来の不安定性は改善されなかった。⁶⁾ CNBr-activated Sepharose 4B に固定化した CPS は高活性かつ安定なものであった。以上の結果より、活性化した Sepharose 4 B に共有結合法で、尿素サイクル構成酵素

Table I Immobilization of CPS-OCT by Various Techniques

| Immobilization Methods | Results |
|--|---------------------|
| Polyacrylamide gel entrapping | Inactive |
| Microencapsulation: interfacial polymerization | Inactive |
| Microencapsulation: secondary emulsion method | Active but unstable |
| Crosslinking with glutaraldehyde | Inactive |
| Covalent binding to Sepharose 4 B | Active and stable |

を固定化し、その反応特性について検討した。なお CPS の固定化収率は50%であった。

固定化 CPS-OCT の保存時 (4℃), 及び反応条件下 (37℃) における安定性は Fig.2 に示す如く共に、固定化によって大幅に増加した。すなわち固定化 CPS は37℃, 200 時間後も80%の残存活性

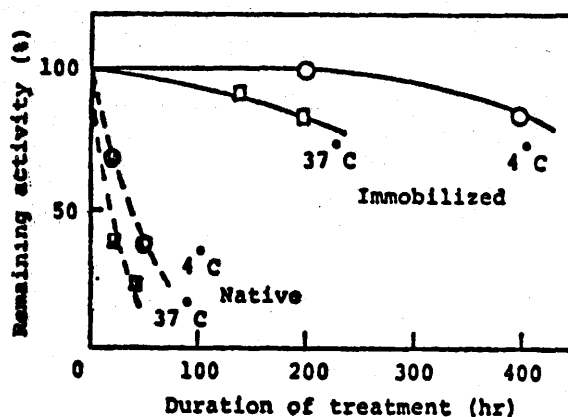


Fig. 2 Stability of native and immobilized CPS-OCT at 4℃ and 37℃.

を示した。固定化 CPS の最適な PH は native 酵素とくらべて変化しなかったが、固定化後活性領域が広がった。また CPS の基質, cofactor であるアンモニア, ATP と N-アセチルグルタミン酸に対する見かけの Michaelis 定数は固定化後も著しい変化は認められなかった。

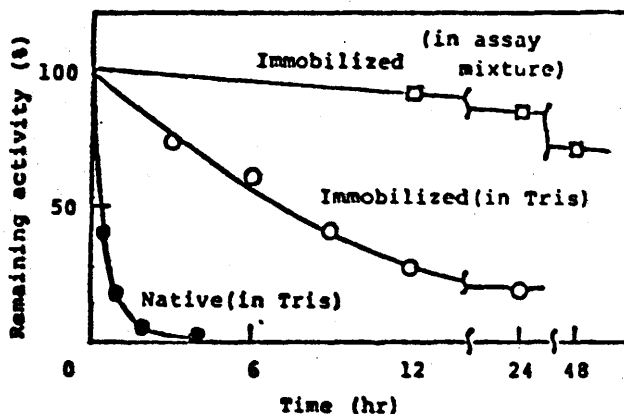


Fig. 3 Time course of inactivation at 37℃. Native argininosuccinate synthetase (●) was dissolved in 0.02 M Tris/HCl buffer at pH 7.5 at a concentration of 28mg protein/ml and held at 37℃, Immobilized enzyme (○) was suspended in the same buffer and treated as described for native enzyme. The assays was carried out using NADH decrease method. Stability of immobilized enzyme (□) was also tested in the presence of the assay reagents.

第2章 Argininosuccinate synthetase の固定化及びその特性

Argininosuccinate synthetase (ASS) は牛の肝臓より抽出し、部分精製したものをを用いた。酵素の固定化は、活性化した Sepharose 4 B に共有結合法により固定化した。なお ASS の固定化収率は 28% であった。Fig. 3 は反応時 (37°C) における安定性を示すものであるが、native ASS の活性の半減期は 25 分であるのに対して、固定化 ASS の半減期は 7 時間であった。また固定化 ASS の安定性は Tris/HCl 緩衝液中におけるよりも、反応試薬中において安定性はさらに高まり、2 日後においても少なくとも 70% の残存活性を示した。

固定化 ASS の至適 PH は native 酵素のもとにくらべ、PH 0.5 ほどアルカリ性側に移動した。見かけの Michaelis 定数は固定化後もほとんど変化しなかった。

全尿素サイクル酵素の固定化に先立ち、前章で記した固定化 CPS-OCT によりアンモニアからシトルリンの合成を行い、続いて ASS 以下の酵素である argininosuccinate lyase (ASL), arginase (ARG) などを同時固定化し、これをカラム反応器に充填し、連続反応を行ない、シトルリンが尿素に変換されるのを確認した。

第3章 充填層における固定化尿素サイクル酵素による尿素の合成

本章においては、全尿素サイクル酵素を固定化し、種々の充填システムにおいてアンモニアから尿素の合成について速度論的に解析し、実験結果とも比較検討した。またその最適な充填システムについて検討した。

固定化尿素サイクル酵素を充填する型式を Fig. 4 に示した。Separate 1 システムは [CPS] と [OCT, ASS, ASL] と [ARG] の 3 層に、separate 2 システムは [CPS] と [OCT 以下 4 種の酵素] を混合した 2 層に、mixed システムでは全固定化酵素を同一層に混合充填したシステムである。3 つの充填システムにおける尿素サイクルの反応を行う場合の基質の物質変化速度式を固定化酵素粒子内外の拡散抵抗と流れ方向の混合が無視でき、各層内での固定化酵素活性が均一であると仮定した。固定化酵素における反応が Michaelis-Menten 式に従うと仮定した。実験においては、内・外拡散抵抗が無視しえる条件で、そして CPS, ASS 以外の酵素は過剰な条件で行った。

Separate 2' と mixed システムにおける尿素合成について理論と実験値とを比較した結果を Fig. 5 に示した。両者はほぼ一致した。そこで、同量の CPS, ASS において、2 つのシステムで最大の尿素生成量を理論値より比較すると separate 2 が 10% ほど高い尿素生成量を示す。Separate 2 システムで最大尿素生成量を示す CPS, ASS の最適比は、10mM アンモニアを 1 mM に下げると、

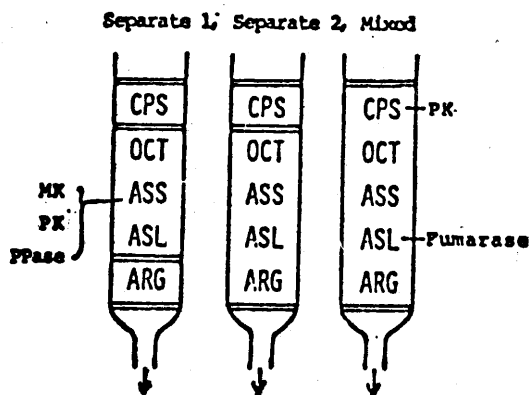


Fig. 4 Schematic representation of packed system of separate and mixed types with urea cycle and related enzymes immobilized on Sepharose 4 B.

(MK:
PK:
PPase:

6%ほどCPSの酵素量が高い方へずれる。

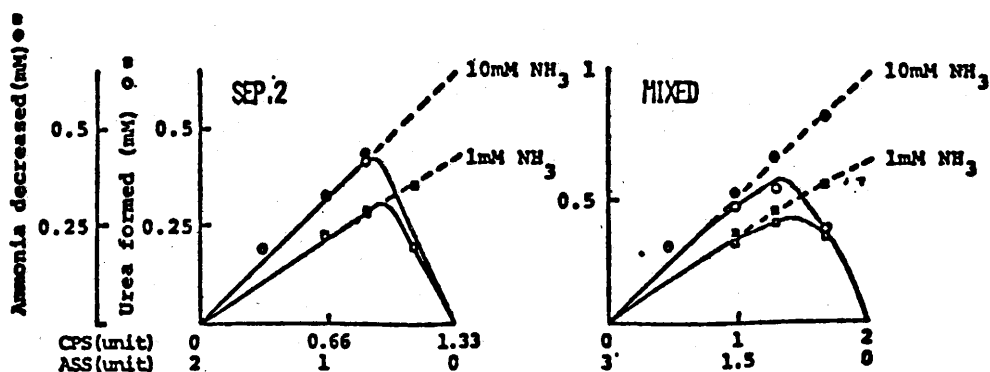


Fig. 5 Comparison between separate 2 and mixed system on the activities of immobilized urea cycle enzymes in the packed beds. Ammonia consumption (---) and urea formation (---) were estimated using K_m value, 0.4 mM for ammonia and K_m value, 0.06 mM for citrulline of immobilized CPS and ASS.

Separate 1 と 2 システムにおいて尿素サイクルの carrier substrate であるオルニチン量を変化させ理論値と実験値とを比較しその結果を Fig. 6 に示した。オルニチン濃度が高い場合 (10mM) には、どちらの充填方式も同様で、オルニチンを低濃度にすれば系内に生成するオルニチンを recycle する系すなわち separate 2 が separate 1 より高い尿素生成量を示した。

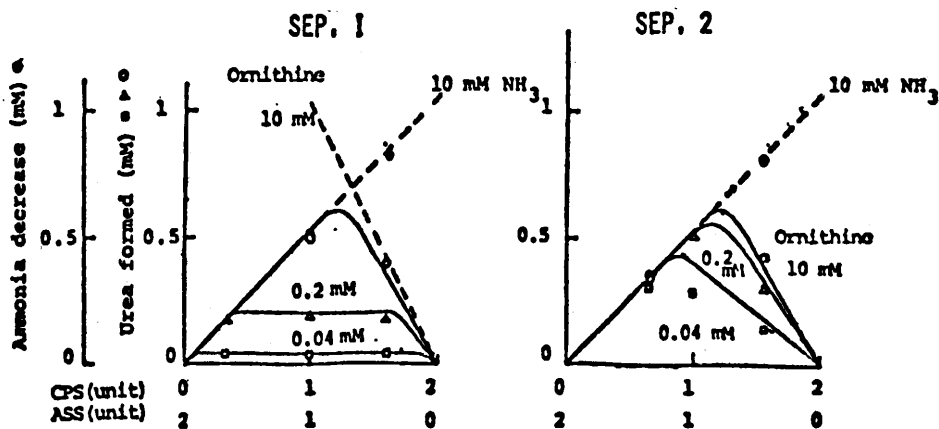


Fig. 6 Comparison between separate 1 and separate 2 systems under the various ornithine concentrations. Conditions, ATP 1 mM

以上のことより固定化尿素サイクル酵素の充填システムとして全酵素を同一層に混合充填した場合と、それを分割充填した場合とで比較してきたが、その中でも cycle 反応を効率よく実行し得る系す

なわち separate 2 システムが最もすぐれていることが確認された。すなわち、固定化尿素サイクル酵素の医療への応用として、血液中アンモニアを 1 mM と設定し、窒素化合物である cycle substrate のオルニチンの量を少くして尿素合成をしえる可能性を示し得た。

第4章 ATP 利用及び再生系酵素の塩基性イオン交換体への固定化及びその特性

生体内の合成反応酵素の多くは、ATP をエネルギー源または補酵素として利用する。そのような生化学的反応を行う場合 ATP の再生が重要となる。

ATP を利用する尿素サイクル酵素を用いて、アンモニアの解毒を行う上で、ATP の血液への過剰投与はその代謝産物としてアンモニア等を生じ、重要な問題となる。従って ATP の投与量を低くおさえることを目的として、塩基性イオン交換体(QAE-Sephadex A-50) へ ATP 利用及び再生酵素を同時固定化し、ガル内の ATP 濃度を静電気的作用により濃縮することによって、その酵素の ATP に対する見かけの $K_m(K'm)$ 値を低下させ、ATP の血液への流出を減少させる方法を用いた。

QAE-Sephadex A-50(QAE)への酵素の固定化方法は電荷をもたない Sepharose 4 B への固定化と同様に臭化シアンにて活性化し、共有結合法で固定化した。QAE への酵素(過剰に同時固定化した酵素)の固定化収率は Sepharose 4 B とほぼ同じで、hexokinase(creatine kinase)は 7%, creatine kinase(hexokinase)も 7% で、それらは、ATP 利用及び ATP 再生系のモデル酵素として利用した。一方 CPS(Pyruvate kinase)の固定化収率は 40% であった。QAE に固定化した hexokinase の ATP に対する $K'm$ 値は Table 2 に示したように、血液と同イオン強度 0.15 及び同 PH 7.5 において Sepharose 4 B に固定化した酵素の $K'm$ 値の 1/10 ほどになり、見かけ上酵素に対する ATP の親和性が高まった。

Table 2 K_m values of Hexokinase for ATP

| $K_m(mM)$ | | Immobilized on | | Immobilized on Native | |
|----------------|----|-------------------|------|-----------------------|------|
| | | QAE-Sephadex A-50 | | Sephadex 4 B | |
| Ionic strength | pH | 6.0 | 7.5 | 7.5 | 7.5 |
| 0.015 | | 0.06 | 0.06 | 0.5 | 0.25 |
| 0.15 | | 0.05 | 0.05 | — | 0.25 |
| 0.42 | | — | 0.7 | — | 0.25 |

Creatine kinase, CPS についても検討したが、イオン強度 0.15 において、hexokinase と同様に Sepharose 4 B に固定化した酵素に比べ QAE に固定化した酵素の ATP に対する親和性は約 10 倍ほど高くなることが確認できた。

この親和性増大の理由は Katchalsky¹¹⁾ による担体及び基質間の静電気作用による担体内への基質の分配によるものと考えられる。

第5章 固定化尿素サイクル酵素充填層と Hollow Fiber によるアンモニア解毒モデル

固定化酵素（タンパク）の医療への適用方法として、血液を直接固定化酵素（タンパク）に接した例として、大城ら⁸⁾によるハプトグロビンを Sepharose 4 B に固定化したものを用い、血液中に異常増大したヘモグロビンの除去を血液と接触させ行った例がある。しかし血小板の激減が見られ、その原因としては固定化担体 Sepharose 4 B の材質を上げている。一方間接的な方法として、Hollow Fiber 及びマイクロカプセルなどを用いた、すなわち、血液シャントを行うような透析器を用いた報告例⁹⁾がある。

本章では血液中アンモニアを Hollow Fiber と固定化尿素サイクル酵素充填反応器によって解毒するモデルユニット(Fig. 7)について検討した。血液側（アンモニア液：ユニットⅠ）が Hollow Fiber の tube 側（ユニットⅡ）に流れ再びユニットⅠへ環流する。一方固定化尿素サイクル酵素充填系（3章で記した最適充填システム：(A)ユニットⅣ（固定化 CPS 層）、(B)ユニットⅤ（固定化 OCT, AS-S, ASL, ARG 層）と Hollow Fiber の shell 側（ユニットⅢ）間の液は循環される。Tube 側と shell 側との液の流れは、透析効率が良いとされる交差環流の方法を採用した。各ユニットでの流れの様式は、ユニットⅠでは完全混合とし、Hollow Fiber の tube 側、shell 側そして固定化尿素サイクル酵素充填系では、押し出し流れと仮定した。尿素サイクルの各基質濃度を C_n (1; アンモニア, 2; カルバミルリン酸, 3; シトルリン, 4; アルギニノコハク酸, 5; アルギニン, 6; オルニチン, 7; 尿素) とし、各ユニットにおけるそれぞれの基質濃度を $C_{n\text{I} \sim \text{V}}$ と表わし、充填酵素反応は、基本的に Michaelis 型を用い、拡散抵抗は無視し得ると仮定した。同様に線速度(F)も $F_{\text{I} \sim \text{V}}$ とし、各ユニットの容量は $V_{\text{I} \sim \text{V}}$ で表わした。ユニットⅠ～Ⅴにおける物質収支をとるとⅠ～Ⅴ間の流れの遅れを無視すれば、それぞれの関与物質の濃度について、(1)～(5)の基礎式を得る。近似式は、上記の基礎式を用い、微小時間において定常とし、押し出し流れ型の物質移動速度は入口、出口での濃度の対数平均を推進力として計算した。なお最適化において、血液中のアンモニア濃度は 1mM と設定し、固定化尿素サイクル酵素によって合成される尿素が血液中に流入し、腎臓で尿素が除去されると仮定し、その

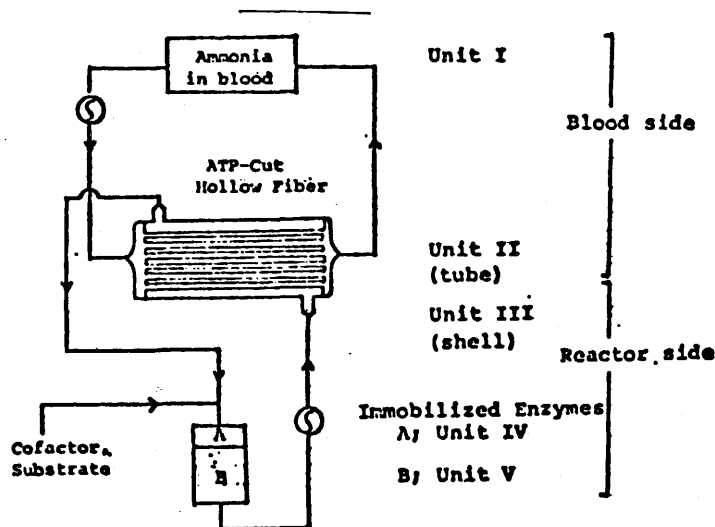


Fig. 7 Schematic Flow Sheet of Ammonia Detoxication System.

$$V_I \cdot \frac{dC_{nI}}{dt} = F_I \cdot (C_{nIi} - C_{nIo}) \quad (1)$$

$$-\frac{V_{II}}{L_{II}} \cdot \frac{dC_{nII}}{dt} = \frac{V_{II}}{L_{II}} \cdot F_{II} \cdot \frac{dC_{nII}}{dl} + \frac{V_{II}}{L_{II}} \cdot k_{nII} \cdot a_{II} \cdot (C_{nII} - C_{nIII}) \quad (2)$$

$$-\frac{V_{III}}{V_{III}} \cdot \frac{dC_{nIII}}{dt} = \frac{V_{III}}{L_{III}} \cdot F_{III} \cdot \frac{dC_{nIII}}{dl} - \frac{V_{III}}{L_{III}} \cdot k_{nIII} \cdot a_{III} \cdot (C_{nII} - C_{nIII}) \quad (3)$$

$$-\varepsilon_{IV} \cdot \frac{V_{IV}}{H_{IV}} \cdot \frac{dC_{nIV}}{dt} = \frac{V_{IV}}{H} \cdot F_{IV} \cdot \frac{dC_{nIV}}{dh} + \frac{V_{IV}}{H_{IV}} \cdot R_{IV}(C_{nIV}) \quad (4)$$

$$-\varepsilon_V \cdot \frac{V_V}{H_V} \cdot \frac{dC_{nV}}{dt} = \frac{V_V}{H_V} \cdot F_V \cdot \frac{dC_{nV}}{dh} + \frac{V_V}{H_V} \cdot R_V(C_{nV}) \quad (5)$$

尿素除去量が初期のアンモニア量の80%に至った時を80%尿素変換時間とした。

モデルユニットにおけるアンモニアの減少及び尿素の生成量をユニット I において測定した結果を Fig. 8 に示した。両者の実験値は計算値とはよく一致した。モデルユニットにおける各々の仮定及びそれより導いた近似式が妥当であることが確認され、アンモニアの解毒をよく表現しえた。

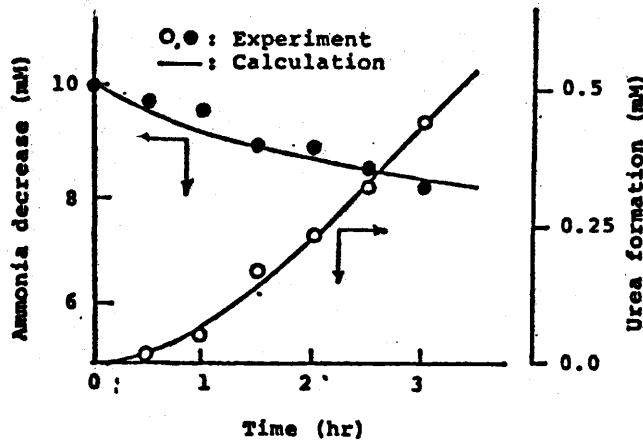


Fig. 8 Fitness between Experimental and Calculated Values of Ammonia Decrease and Urea Formation in the Unit I of the Ammonia Detoxication System

そこで計算により、アンモニア解毒の最適化を行ったところ Hollow Fiber の tube 側の流速は 0.22 cm/min, shell 側の流速は 0.44 cm/min 以下でよく、また血液処理量が 50 ml のとき、有効膜面積当りの充填酵素活性は 0.26 units/cm² 以下でよいことがわかった。そして cycle substrate であ

るオルニチン濃度を低下させてもモデルユニットにおいても十分アンモニアの解毒能を維持できることが確認された。

記 号

- a: Hollow Fiber の単位容積当りの膜面積 ($1/\text{cm}$)
Cn: 基質(n)の濃度 ($\mu \text{ mole}/\text{cm}^3$)
F: 線速度 (cm/min)
H: 充填層の高さ (cm)
h: 充填層高さ方向の距離 (cm)
i: Hollow Fiber また充填層の入口 (—)
Kn: Hollow Fiber による基質 n の膜物質透過係数 (cm/min)
Km: 見かけの Michaelis 定数 ($\mu \text{ mole}/\text{cm}^3$)
L: Hollow Fiber の長さ (cm)
I: Hollow Fiber 長さ方向の距離 (cm)
O: Hollow Fiber また充填層の出口 (—)
R(Cn): 固定化酵素単位体積当りの反応速度 ($\mu \text{ mole}/\text{cm}^3\text{-gel} \cdot \text{min}$) ($\frac{V_{\max} \cdot C_n}{K_m + C_n}$)
V: ユニットでの容量 (cm^3)
 ϵ : 充填層の空隙率 (—)

引用文献

- 1) T.Mori, T.Tosa and I.Chibata, *Cancer Res.*, **34**, 3066 (1974)
- 2) T.M.S.Chang, *Nature*, **229**, 117 (1971)
- 3) P.P.Cohen and M.Marshall, *The enzymes*, **6**, 327 (1962)
- 4) S.Ratner, *The enzymes*, **6**, 502 (1962)
- 5) T.M.S.Chang, *Artificial Cells*, Chales C Thomas, Springfield, I II., 1972
- 6) K.Miyamoto, N.Takamatsu, M.Okazaki, and Y.Miura, *J.Ferment.Technol.***52**, 899 (1974)
- 7) L.Goldstein, Y.Levin and E.Kachalski, *Biochemistry.*, **3**, 1913 (1964)
- 8) 大城孟, 洪性徳, 神前五郎, 船越哲, 大村孝男, *人工臓器*, Vol6, 75 (1977)

論文の審査結果の要旨

固定化酵素による生体内機能の代行の可能性を追求するため、その1つとして肝機能の中のアンモニア解毒をとりあげ、それを固定化尿素サイクル酵素により代行させることを目的とし、先ず尿素サイクル酵素を種々の方法で固定化し、Sephadex 4 Bへの共有結合により高活性で安定な固定化尿素サイクル酵素を得た。またその充填層において連続的にアンモニアより尿素への合成が行なわれるこ

とを確かめ、理論解とも合致することを確認した。さらに血中アンモニアを Hollow Fiber にて透析し、体外循環系に固定化尿素サイクル酵素充填層を組み入れる方式によりアンモニアの尿素への解毒を行うことに成功し、理論的解析とも合致し、その最適条件をも求めた。本研究は固定化酵素の人工臓器への応用の基礎として学位論文に価するものである。