

## 15 ホウ酸塩の代謝について (第4報)

## ホウ酸塩のグリセルアルデハイドフオスフェイトデハイドロチネース (3炭糖磷酸脱水素酵素) におよぼす影響

北海道立衛生研究所 三沢隆行 金島弘恭  
北海道大学薬学部 赤木満洲雄

## 緒言

近年薬害問題に関連して、医薬品の安全性が重要な問題になっている。著者らは医薬品の一つであるホウ酸塩をとりあげ、その慢性毒性に関連するホウ酸塩の生体への作用について数年前より生化学的な研究<sup>1) 2) 3)</sup>を続けて来た。前報<sup>3)</sup>ではホウ酸塩を投与されたラットおよびモルモットの3時間後の肝内に、fructose-1, 6-diphosphate (以下 FDP と略) が明らかに蓄積する傾向のあること、ならびにこの種動物の肝および脳ホモジネートによる嫌氣的解糖系がホウ酸塩によつて著しく阻害されることを報告した。

今回はモルモットの肝および脳ホモジネートによる嫌氣的解糖系においても、FDP が in vivo 同様に蓄積するか否かをしらべた後、FDP 以後の嫌氣的解糖系における如何なる酵素系が、ホウ酸塩の阻害を受けるかをしらべた。

## 実験方法

## 動物組織中の F6P\* および FDP の定量法

その定量は Roe<sup>4)</sup>らの方法にしたがつて分光光学的に行つた。

## イーストの Glyceraldehydephosphate Dehydrogenase (以下 GAPD と略) の分離精製法

本酵素は Kunitz および McDonald<sup>5)</sup>の方法に準拠して述べられた Krebs<sup>6)</sup>の方法により、パンイーストから結晶として分離精製した。

## GAPD の活性分析法

本酵素の活性分析は、Warburg および Christian<sup>7)</sup>によつてはじめて述べられたものと本質的には同一である Krebs<sup>6)</sup>の方法によつて、340m $\mu$  (NADHの最大吸収波長)における吸光度の変化 (増加) を測定して行つた。なお Warburg および Christianは、磷酸塩の存在下で酵素が 1000 倍量程度用いられるならば、D-glyceraldehyde (GA) も D-glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) と同様に補酵素 NAD と反応することを見ており、また Meyerhof<sup>8)</sup>も GA で GAP での反応における同様の現象が見

られることを確認しているので、以下の実験の多くは比較的手入れしやすい GA を基質に用いた。

## 肝ホモジネートの GAPD 活性の分析法

ホモジネートの場合、前記の酵素結晶に対する Krebsの方法はそのまま利用出来ないで、前記と同一の試液を用いて次の通り活性分析を行つた。

ピロ磷酸塩—システイン緩衝液 (PH 8.5) 1.5ml, NAD, 磷酸塩それぞれ 0.1ml および GAP 0.3ml の不完全反応液を 10-ml の共栓試験管にとり、最後に 10% 肝ホモジネート 1.0ml を加えて (全液量 3.0ml) 反応を開始せしめた。室温で 20 分間保つた後 10% トリクロル酢酸 3.0ml を加えて反応を中止せしめ、反応液を遠沈器にかけて除蛋白した。上澄液をシリカキュベットにとり、340m $\mu$  における吸光度の読みをゼロ時間に対して補正した。

## 兔筋肉の Lactate Dehydrogenase の活性分析法

酵素は Sigma Chemical Company の製品を用い、その活性分析は Kornberg<sup>9)</sup>の方法により 340m $\mu$  における吸光度の変化 (減少) を測定して行つた。

## モルモット肝ホモジネート Lactate Dehydrogenase の活性の分析法

10-ml の共栓試験管に、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>—K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 緩衝液 (PH 7.4) 1.0ml, NADH, ビルビン酸ナトリウム溶液各 0.1ml ならびに水 0.8ml より成る不完全反応液をとり、最後に 0.01 M NaCl 溶液で調製した 10% 肝ホモジネートを加えて (全液量 3.0ml) 反応を開始せしめた。用いた試液の濃度は上記 Kornberg の方法におけるものと同一にした。室温で 20 分間保つた後、10% トリクロル酢酸 3.0ml を加えて反応を中止せしめた。反応液を遠沈して除蛋白後、上澄液をシリカキュベットにとり 340m $\mu$  における読みをゼロ時間に対して補正した。

## ホウ酸塩による GAPD 阻害の図式解析法

Lineweaver および Burk<sup>10)</sup>の方法ならびに Dixon<sup>11)</sup>の方法により阻害型の図式解析を行つた。

## 実験結果

ホウ酸塩による嫌氣的解糖系の F6P および FDP の蓄積 0.033M ホウ酸—炭酸—水素カリ緩衝液 (PH 7.6) を兼

\*F6Pは fructose-6-phosphate を表はす

氣的解糖反応液に加えてホウ酸塩濃度を 0.01 M となし、モルモットの肝および脳ホモジネートの嫌氣的解糖反応を Thunberg tube 内で 38°C、30 分間行はしめた後、除蛋白して反応液中の F6P レベルおよび FDP レベルを測定した。

その結果は Table 1 に示すとおりこれら兩レベルはホウ酸塩の添加によつて明らかに上昇し、反応系内に F6P および FDP が蓄積することが認められた。

**Table 1 Effect of Borate on the Levels of FDP and F6P in Anaerobic Glycolysis of Tissue Homogenate**

Exper. NO.	Sugar phosphates levels in react. mixture after 30 min.						
	FDP			F6P			
	Control $\mu\text{g/ml.}$	Borate $\mu\text{g/ml.}$ *	Rate of increase %	Control $\mu\text{g/ml.}$	Borate $\mu\text{g/ml.}$ *	Rate of increase %	
Rat liver homog.	1.	9	27	200	5	22	340
	2.	17	33	94	8	23	190
	3.	10	22	120	6	18	200
	4.	16	29	81	7	13	86
	5.	14	31	120	8	21	160
		Average	123 ± 12		Average	195 ± 41	
Guinea pig liver homog.	1.	18	85	360	11	18	64
	2.	10	52	420	8	20	150
	3.	29	84	189	12	39	210
	4.	31	101	220	4	16	300
	5.	23	86	270	12	34	180
		Average	291 ± 43		Average	200 ± 39	

\* 0.01 M borate.

The reactions were performed at pH 7.6, at 38°C. The sugar phosphates were determined by the method of Roe et al.

**ホウ酸塩のイーストGAPDおよび肝ホモジネートGAPD 活性に対する影響**

イーストの GAPD の反応液に 0.09 M ホウ酸塩 0.1ml を加え、pH 8.5, 23°C で本酵素に対するホウ酸塩の影響をしらべた。基質として GAP ならびに GA を用いた場合の結果をそれぞれ Fig. 1, Fig. 2 に示した。これによれば、いずれの基質の場合も本酵素は 0.003M ホウ酸塩によつて著明に阻害を受けることが認められた。なお Fig. 2 はホウ酸塩濃度を変えて阻害の程度を比較した結果を併せて示したものである。

次にラッテおよびモルモットの肝ホモジネートによる反応液に 0.15 M ホウ酸塩 0.2ml を加えてその濃度を 0.01 M となし、ホモジネートの GAPD 活性に対するホウ酸塩の影響をしらべた。その結果は Table 2 に示すとおり、20 分後の NADH の吸光度は対照に比して明らかに小さく、これら肝ホモジネートの GAPD 活性は 0.01 M ホウ酸塩によつて阻害されることが認められた。

**兎筋肉の Lactate Dehydrogenase およびモルモット肝ホモジネートの Lactate Dehydrogenase 活性に対するホウ酸塩の影響**

兎筋肉の Lactate Dehydrogenase に対するホウ酸塩の

影響は、0.15 M ホウ酸塩 0.1ml を反応液に添加してその濃度を 0.005M となししらべた。またモルモット肝ホモジネートの同酵素活性に対するホウ酸塩の影響は、0.15M ホウ酸塩 0.2ml を反応液に添加してその濃度を 0.01M となししらべた。その結果はそれぞれ Fig. 3, Table 3 に示すとおり、いずれの場合も Lactate Dehydrogenase はホウ酸塩によつて影響されないことが認められた。

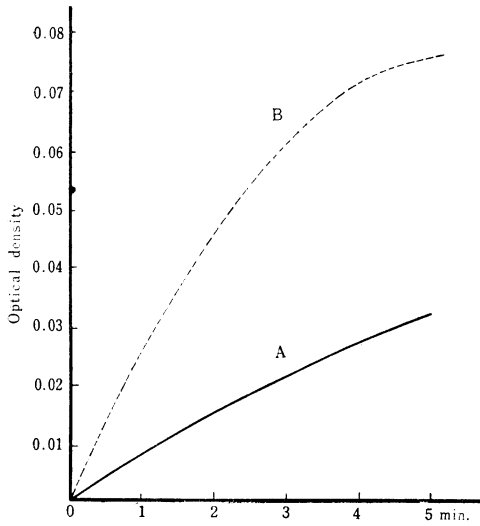
**ホウ酸塩の GAPD 阻害に対するポリハイドロオキシ化合物の影響**

ホウ酸塩は糖その他のポリハイドロオキシ化合物と結合してコンプレックスをつくることが知られているので、GAPD のホウ酸塩阻害が過剰の糖その他のポリハイドロオキシ化合物の添加で回復されるか否かをしらべた。グルコース、ソルボース、リボース、マニトール、グリセロールで試験したが、その結果は Fig. 4, Fig. 5 に示すとおりこの実験条件下では、GAPD のホウ酸塩阻害はこれらのポリハイドロオキシ化合物のいずれによつても回復されないことが認められた。

**ホウ酸塩による GAPD 阻害の透析の影響**

0.15M ホウ酸塩溶液を比活性  $1.85 \times 10^3$  の GAPD 溶液に 3 倍容加えることによつて、その比活性が  $0.16 \times 10^3$  に低

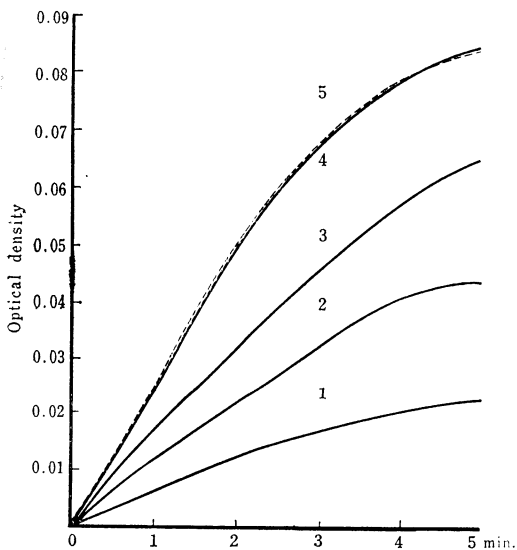
**Fig. 1 Effect of Borate on Yeast GAPD with GAP as Substrate**



Curve A, 0.003M borate ; Curve B, control.

0.0025 M GAP was used as substrate, and the enzyme activities were measured at pH 8.5, at room temperature by the method of Krebs.

**Fig. 2 Effect of Borate on Yeast GAPD with free GA in Relation to Various Borate Concentrations**



Curve 1, 0.01 M borate ; Curve 2, 0.005 M borate ; Curve 3, 0.003 M borate ; Curve 4, 0.001 M borate ; Curve 5, control. 0.002 M GA was used as substrate, and the enzyme activities were measured at pH 8.5, at room temperature.

下したホウ酸塩阻害酵素溶液を透析用セロファン・チューブに入れて密封し、3°Cの冷蔵庫において500mlの水で24時間若しくは48時間透析した。対照としてホウ酸塩溶液の代わりに、水を同じく3倍容加えた酵素液を用いて同様に透析した。その結果は Table 4 に示すとおりホウ酸塩阻害酵素の比活性は対照酵素のそれと全く等しくなった。この

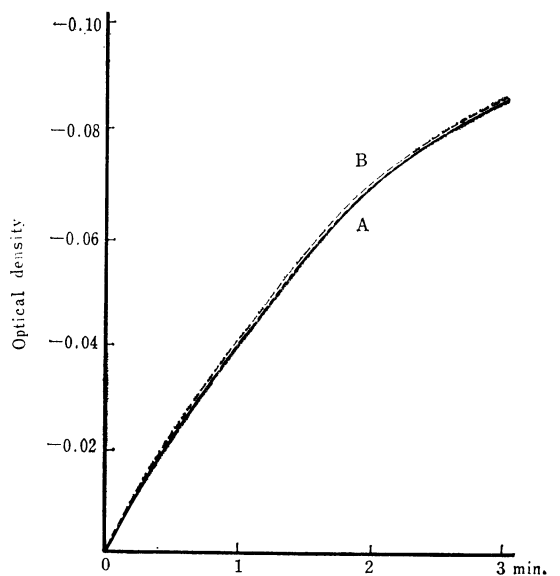
**Table. 2 Effect of Borate on GAPD in Liver Homogate**

	opt. density of NADH after min.		
	* Borate	Control	RatioB/C
Rat liver homog.	0.010	0.026	1 : 2.6
	0.011	0.033	1 : 3.3
	0.010	0.028	1 : 2.8
	Average		1 : 2.9
Guinea pig liver homog.	0.015	0.033	1 : 2.2
	0.010	0.030	1 : 3.0
	0.012	0.031	1 : 2.5
	Average		1 : 2.5

\* 0.01 M borate.

The enzyme reactions were performed at pH 8.5, at room temperature. GAPD activities in liver homogenate were measured as described in the section of methods.

**Fig. 3 Effect of Borate on Lactate Dehydrogenase from Rabbit Muscle**



Curve A, 0.005 M borate ; Curve B, control. The enzyme activities were measured at pH 7.4, at room temperature by the method of Kornberg.

ことからホウ酸塩は透析され得ること、またホウ酸塩の阻害作用は透析により回復されることが認められた。

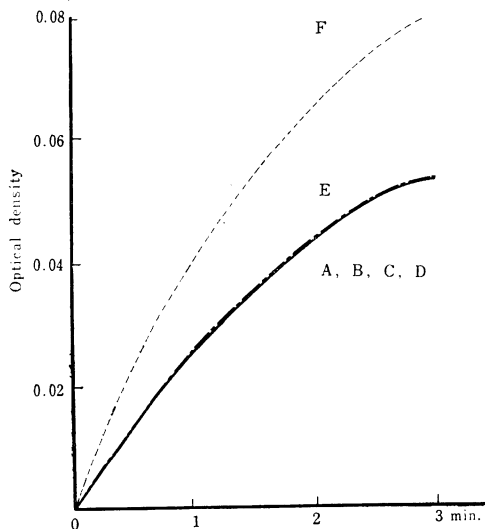
**Table 3 Effect of Borate on Lactate Dehydrogenase in Liver Homogenate**  
opt. density of NADH after 20 min.

Borate*	Control
0.025	0.025
0.019	0.020
0.031	0.030
0.024	0.024
0.024	0.022
0.020	0.020

\* 0.01 M borate.

The enzyme reactions were performed at pH 7.4, at room temperature. Lactate dehydrogenase activities in liver homogenate were measured as described in the section of methods.

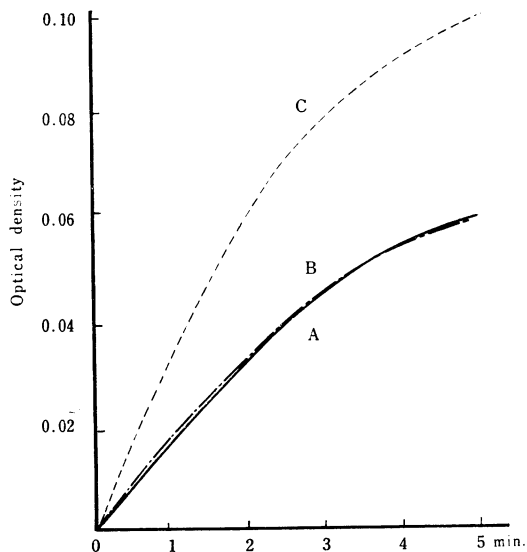
**Fig. 4 Effect of Sugar or Sugar Alcohol on Borate Inhibition of Yeast GAPD**



Curve A, 0.003 M borate and 0.12 M glucose; Curve B, 0.003 M borate and 0.12 M sorbose; Curve C, 0.003 M borate and 0.033 M ribose; Curve D, 0.003 M borate and 0.033 M mannitol; Curve E, 0.003 M borate alone; Curve F, control (no borate).

In Curve A, B, C, and D, borate and sugar or sugar alcohol were added to the reaction mixture adjusted to pH 8.5 with 0.03 M sodium pyrophosphate-0.003 M cysteine buffer and in Curve E, borate alone was added to the same reaction mixture.

**Fig. 5 Effect of Glycerol on Borate Inhibition of Yeast GAPD**



Curve A, 0.003 M borate and 0.04 M glycerol; Curve B, 0.003 M borate alone; Curve C, control (no borate).

In Curve A, borate and glycerol were added to the reaction mixture adjusted to pH 8.5 with 0.03 M sodium pyrophosphate-0.003 M cysteine buffer, and in Curve B, borate alone was added to the same reaction mixture.

**Table 4 Effect of Dialyse on Borate Inhibition of Yeast GAPD**

Hours for dialyse	Specific activity of enzyme Control	Boron
0 hour	1.850×10	0.160×10
24 hours	2.390×10	2.310×10
48 hours	1.588×10	1.583×10

Dialyses were carried out in 500 ml. of water with cellophane tube for dialyse in a cold room at 3°C. Specific activities were measured by the method of krebs.

ホウ酸塩による GAPD 阻害の図式解析

Lineweaver および Burk の方法により 0.003 M ホウ酸塩を含む場合および阻害剤を含まざる場合における反応速度の逆数を、それぞれ基質 (GA) の諸濃度の逆数に対してプロットして得られた Lineweaver-Burk plots を Fig. 6 に示した。また Dixon の方法により 0.008 M GA, 0.016 M GA の二種濃度基質に対する反応速度の逆数を、それぞれ阻害剤の諸種濃度に対してプロットして得られた Dixon's plots を Fig. 7 に示した。いづれの図からも本阻

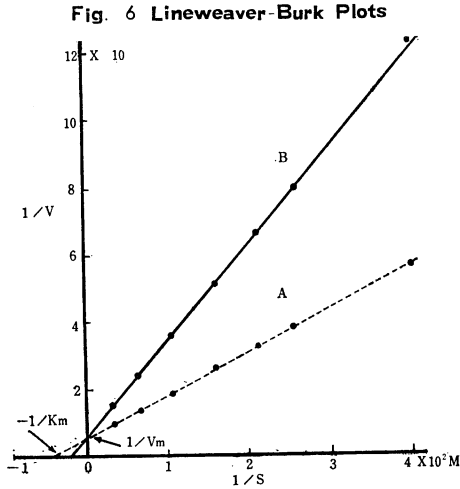


Fig. 6 Lineweaver-Burk Plots  
 $V$ , initial velocity expressed in opt. density of NADH/min. ;  $S$ , substrate (GA) concentration. Curve A, no borate ; Curve B, 0.003 M borate.

The reactions were performed at pH 8.5, at room temperature.  $K_m$  and  $V_m$  express the Michaelis constant and maximum velocity obtained from this graphical analysis respectively.

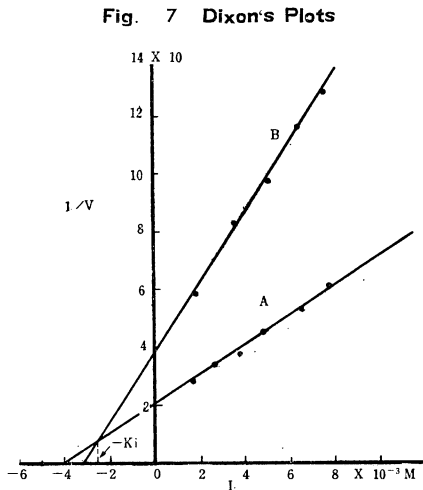


Fig. 7 Dixon's Plots  
 $V$ , initial Velocity expressed in opt. density of NADH/min. ;  $I$ , inhibitor (borate) concentration. Curve A, 0.016 M GA as substrate with the inhibitor ; Curve B, 0.008 M GA as substrate with the inhibitor.

The reactions were performed at pH 8.5, at room temperature.  $K_i$  expresses the enzyme-inhibitor dissociation constant obtained from this graphical analysis.

害は酵素に対して基質と拮抗的 (competitive) であることが認められ、さらにFig. 6より Michaelis constant( $K_m$ ), 最大速度 ( $V_m$ ) はそれぞれ  $1.72 \times 10^{-2}$  M,  $1.47 \times 10^{-1}$  (NADH の O. D.) として、また Fig. 7より酵素一阻

害剤の解離恒数 ( $K_i$ ) は  $2.80 \times 10^{-3}$  M として算出された。

## 考 察

本実験でホウ酸塩によつて F6P および FDP が嫌氣的解糖系内に蓄積すること、Lactate dehydrogenase はホウ酸塩によつて何ら阻害されないにもかかわらず、GAPD はホウ酸塩によつて著しく阻害されることが認められた。

GAPD に対するホウ酸塩の阻害作用は Lineweaver-Burk plots または Dixon's plots から基質と拮抗的であることが認められ、さらにその阻害作用は透析によつて回復されるけれども糖その他のポリヒドロキシ化合物では回復されなかつた。このことからこのホウ酸塩阻害は、ホウ酸塩とポリヒドロキシ化合物である基質との結合によつて起るのではないように思はれる。

最近ホウ酸塩と NADH との結合が Strittmatter<sup>11)</sup> によつて報告されているが、本実験ではホウ酸塩は NAD の関与する GAPD の活性を阻害するにもかかわらず、同一補酵素の関与する Lactate dehydrogenase の活性を阻害しないことが認められた。

Zittle ら<sup>12)</sup> はアルカリフオスファターゼのホウ酸塩阻害に関してこの阻害は、基質と拮抗的なホウ酸塩アニオンと酵素とが直接結合するために起るであろうと考えている。GAPD のホウ酸塩阻害も先に述べたところから、ホウ酸塩が基質または補酵素と結合するために起ると考えるよりは、むしろ Zittle らによつて論じられているアルカリフオスファターゼ、ウレアーゼ、アルギナーゼ、ペプシンに対するホウ酸塩阻害と同じ様式で、ホウ酸塩がアニオンとして GAPD を阻害するであろうと考えられる。その阻害機構については改めて詳細な kinetic の研究が必要である。

最後に嫌氣的解糖系に対するホウ酸塩の阻害について生化学的な見地から考察するに、嫌氣的解糖系におけるFDPの蓄積は、FDP 以後のいずれかの酵素系がホウ酸塩によつて阻害されるためであると考え実験を進めた結果、Lactate dehydrogenase はホウ酸塩によつて何ら阻害されず、また aldolase も Herbert ら<sup>13)</sup> の酵素活性測定法から推してホウ酸塩阻害を受けないものと考えられるに反し、GAPD はホウ酸塩によつて著しく阻害されることが認められたことから、ホウ酸塩投与動物の肝内 FDP の蓄積は主として GAPD のホウ酸塩阻害にもとづく肝内の解糖阻害で起るものであろうと説明される。

以上のことから生体がホウ酸塩を摂取した場合、肝内における解糖阻害が起つて糖代謝が攪乱される結果、当然エネルギー源である ATP 生産の低下を来たすので、このようなホウ酸塩の解糖阻害は、ホウ素毒性に重要な関連性があるものと考えられる。

要 旨

- 1 ホウ酸塩によつてモルモットの肝および脳ホモジネートの嫌氣的解糖系内に、fructose -6- phosphate および fructose-1, 6- diphosphate が蓄積することが認められた。
- 2 ホウ酸塩は基質と拮抗的に glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPD) を阻害することが認められた。
- 3 ホウ酸塩は Lactate dehydrogenase を阻害しないことが認められた。
- 4 ホウ酸塩の GAPD 阻害は、この実験条件下では糖その他のポリヒドロキシ化合物では回復されないが、透析により完全に回復されることが認められた。
- 5 ホウ酸塩は基質または補酵素と結合することにより GAPD を阻害すると考えるよりは、むしろホウ酸塩が基質と拮抗的にアニオンとして酵素と直接結合することによつて、この酵素を阻害するであろうと考えられることを述べた。
- 6 ホウ酸塩を投与された動物の肝内に fructose -1, 6- diphosphate の蓄積するのは、ホウ酸塩によつて主として GAPD が阻害されて肝内の解糖作用の阻害が起り、その結果糖代謝が攪乱されるためであろうと考えられ、したがつてこのようなホウ酸塩による解糖阻害は、ホウ素毒性に重要な関連性があるものと考えられることを述べた。

文 献

- 1) 三沢, 金島, 赤木: 本誌, 第13集, 183 (1962).
- 2) 三沢, 金島, 赤木: 本誌, 第13集, 187 (1962).
- 3) 三沢, 金島, 赤木: 本誌, 第14集, 110 (1964).
- 4) J. H. Roe, *et al.*: J. Biol. Chem., 138, 535(1941).
- 5) M. Kunitz, McDonald: J. Gen. Physiol., 29, 393 (1946).
- 6) E. G. Krebs: Methods in Enzymology, 1, 407 (1955).
- 7) O. Warburg, W. Christian: Biochem. Z., 303, 40 (1939).
- 8) O. Meyerhof, P. Oesper: J. Biol. Chem., 170, 1 (1947).
- 9) A. Kornberg: Methods in Enzymology, 1, 441 (1955).
- 10) H. Lineweaver, D. Burk: Am. Chem. Soc., 56, 658 (1934).
- 11) P. Strittmatter: J. Biol. Chem., 239, 3043(1964).
- 12) C. A. Zittle, *et al.*: Advances in Enzymology, 12, 493 (1951).
- 13) D. Herbert, *et al.*: Biochem. J., 34, 1108 (1940).

15 Studies on the Metabolism of Borate (Part 4)

Effect of Borate on Glyceraldehydephosphate Dehydrogenase

Takayuki Misawa, Hiroyasu Kaneshima  
(Hokkaido Institute of Public Health)

Masuo Akagi

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University)

- 1 It was found that fructose 1, 6-diphosphate and fructose 6-monophosphate were accumulated by borate in anaerobic glycolysis system of liver homogenates of guinea pigs.
- 2 Glyceraldehydephosphate dehydrogenase from yeast and in liver homogenates of rats and guinea pigs were found to be inhibited remarkably by borate in both cases free D-glyceraldehyde or D-glyceraldehyde 3-phosphate was used as substrate.
- 3 The borate inhibition of glyceraldehydephosphate dehydrogenase was of competitive and was reversed by dialyse, but not by addition of excess sugars or polyhydroxy compounds in the experimental condition.
- 4 Borate has no effect on lactate dehydrogenase from rabbit muscle and also in liver homogenates of guinea pigs.
- 5 Toxicity of borate was discussed from biochemical point of view.