

アデノシン 5'-三リン酸（ATP）の加水分解におよぼすアミノ酸の影響

我謝 孟俊*・宮内 とみ子*・伊東 文恵*

（1986年 9月27日受理）

The Effects of Amino Acids on the Hydrolysis of Adenosine 5'-Triphosphate (ATP)

Taketoshi GASHA*, Tomiko MIYAUCHI* and Fumie ITOH*

（Received September 27, 1986）

は じ め に

細胞では食物分子の分解によって生成した化学エネルギーをADPの共役リン酸化によってアデノシン 5'-三リン酸（ATP）として回収、貯蔵される。貯蔵されたATPは細胞のエネルギーを必要とする時あるいは場所で利用される物質のなかで最も重要な化合物の一つである。細胞のエネルギーを要求する機能、たとえば生合成反応、筋肉収縮、能動輸送へその化学エネルギーを転移することが明らかにされたことは周知のことからである。

ATPが原始地球上でどういう過程を経て非生物的に生成されてきたのか、また原始細胞あるいはそれにいたる発展の過程のなかで高エネルギーリン酸化合物の生成とリン酸転移によるATPの生成がどのように進化をなしとげてきたかは、分子進化および生命の起源の問題にとりくんでいる研究者の最も関心をいただく問題の一つである。

物質進化が進行するためには、化学反応が進行しなければならないが、そのためには活性化エネルギーを供給しなければならない。原始地球上で供給されたエネルギーとして太陽からのエネルギー（可視光線、紫外線、プロトン、電子など）、熱エネルギー、放電エネルギー、地殻中の放射線などが考えられている。原始大気をつくっていた分子は、これらの種々のエネルギーによって化学反応をおこし、次々と複雑な有機化合物を生成して分子進化がすすんだと考えられている。

Reid *et al.* (1967) は、化学反応のエネルギー源として熱エネルギーをとりあげ、ヌクレオシドの合成を試み、種々のヌクレオシドを得ており、Fuller *et al.* (1972) も同様プリンヌクレオシドの合成例を報告している。ヌクレオチドの非生物的生成に関しては、Ponnamperuma and Mack (1965), Waehnelndt and Fox (1967) の報告がある。原始地球上で生成されたヌクレオシドやヌクレオチドは水圏に蓄積され、いわゆる“有機物のスープ”の一構成成分となったと考えられるが、これらの化合物が、安定な状態で存在しえたかどうかは、これら化合物のその後の進化を考え

* 茨城大学教育学部化学研究室

るうえでも興味ある問題を含んでいると思われる。

A T P の加水分解に関する研究は数多く報告されており (Albery, 1968, 1969, Ramirez *et al.* 1980, Friess, 1953, Lipkin, 1959), これらの報告は主として A T P の加水分解に対する pH, 金属イオン, 酸, 塩基の影響に関するものであり, 有機化合物の影響については, Suzuki *et al.* (1972) のポリアミンの例がある。水中あるいは人工海水中での A T P の安定性の問題については Hulett (1970) の報告があるが, これは化学進化の立場から考察した一例であり, この立場で検討された報告例はほとんど見あたらない。著者ら (1986) は, 先に A T P の紫外線照射に対する安定性の問題やヒスチジンの影響について報告したが, 今回は熱に対する A T P の安定性や加水分解におよぼすアミノ酸の影響について実験を試み, いくつかの知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 試薬類

本実験に使用した試薬類はつぎの通りで, いずれも市販品の特級品を用いた。アデノシン 5'-三リン酸二ナトリウム (A T P), アデノシン 5'-リン酸ナトリウム (A M P), アデノシン (adenosine), アデニン (adenine), L-アスパラギン (Asn), L-プロリン (Pro), L-セリン (Ser), L-フェニルアラニン (Phe) 以上は和光純薬工業 (株) 製。アデノシン 5'-二リン酸二ナトリウム (A D P) は P-L Biochemicals Inc. 製。L-ヒスチジン (His), L-システイン (Cys), L-メチオニン (Met) は日本理化学薬品 (株) 製。

2. 標準物質の検量線作成

$1 \times 10^{-3} \text{ M}$ A T P 溶液を 3 個のメスフラスコ (50 ml) にそれぞれ 1 ml, 2 ml, 3 ml ずつ分取し, 蒸留水を加えて 50 ml とし, $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, $4 \times 10^{-5} \text{ M}$, $6 \times 10^{-5} \text{ M}$ 溶液を調製した。A D P および A M P も同様に同じ濃度の標準溶液を調製した。adenosine および adenine については $4 \times 10^{-5} \text{ M}$, $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ および $12 \times 10^{-5} \text{ M}$ の標準溶液をつくり, それぞれ 255 nm の波長における吸光度を測定し標準化合物の検量線を作成した。

3. A T P の加水分解法

A T P を単独で加水分解する場合には, $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ A T P 水溶液を調製して 0.25 ml を小型試験管にとり栓を施し, 100 °C, 80 °C, 60 °C で加水分解をおこなった。A T P の加水分解に対するアミノ酸の影響を調べる場合には, $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ A T P 水溶液にアミノ酸の濃度が $5 \times 10^{-1} \text{ M}$ あるいは $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ になるように溶解した試料をつくり, これを小型試験管に 0.25 ml をとり, 先述と同じ方法で加水分解をおこなった。

4. 分析方法

加水分解した試料は放冷したあと, マイクロシリンジで 10 μl をろ紙 (東洋ろ紙 No. 53) にスポットし, 標準物質とともにイソ酪酸: 濃アンモニア水: 水 (66: 1: 33 V/V) の溶媒系で上昇あるいは

下降法で展開した。風乾のあと紫外線ランプ（波長 254 nm）でスポットの位置を確認し、標準物質との照合により化合物の同定をおこなった。スポットの部分は切りとって細片とし、蒸留水で成分を溶出した液は 255 nm の波長における吸光度を測定（日立 100-10 型分光光度計）、標準物質の検量線からその濃度を求めた。

実験結果および考察

1. 標準物質（ATP，ADP，AMP，adenosine および adenine）の検量線について

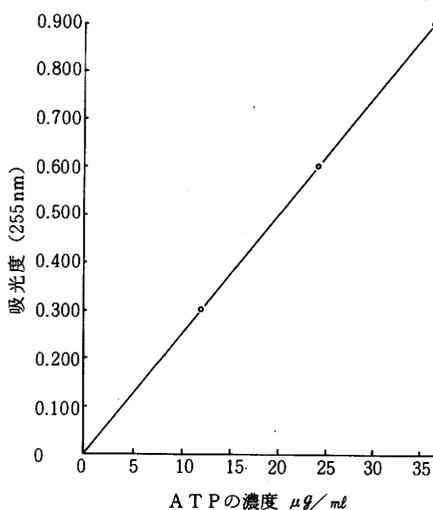


図 1-1 ATPの検量線

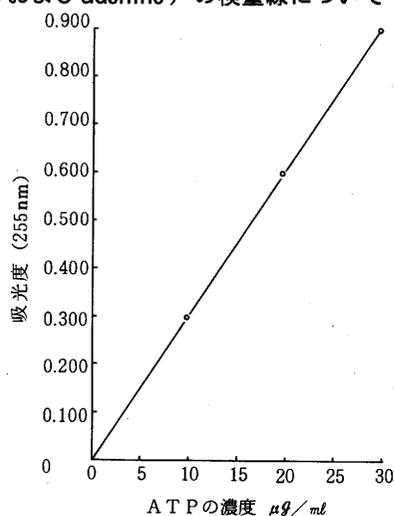


図 1-2 ADPの検量線

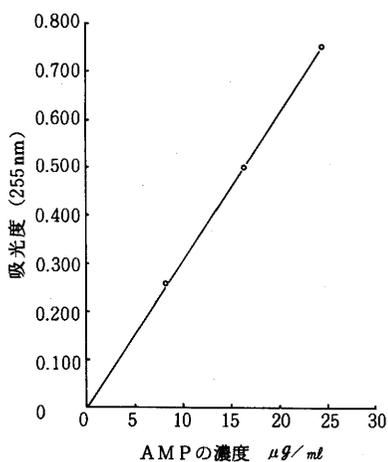


図 1-3 AMPの検量線

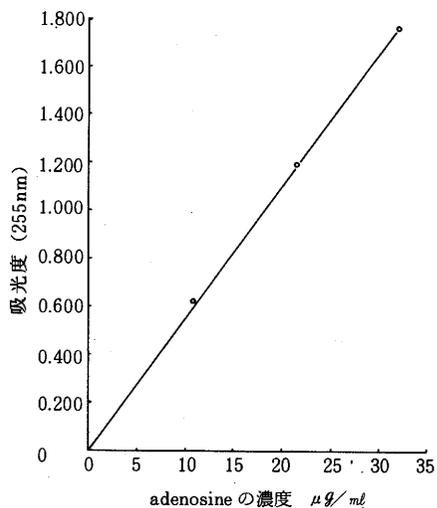


図 1-4 adenosineの検量線

ATPはもちろんのことATPを加水分解して生成されるADP, AMP, adenosineおよびadenineの分析にはペーパークロマトグラフィーでそれぞれの成分に分離した後, 溶出した液の吸光度を測定して定量するいわゆる分光学的方法によるため, あらかじめ標準物質の検量線を作成しなければならない。ATP, ADPおよびAMPについては $2 \times 10^{-5} M$, $4 \times 10^{-5} M$ および $6 \times 10^{-5} M$ 溶液を, adenosineおよびadenineについては $4 \times 10^{-5} M$, $8 \times 10^{-5} M$, $12 \times 10^{-5} M$ 溶液を調製し, それぞれ255 nmの波長で測定した吸光度から検量線を作成した(図1-1~図1-5)。

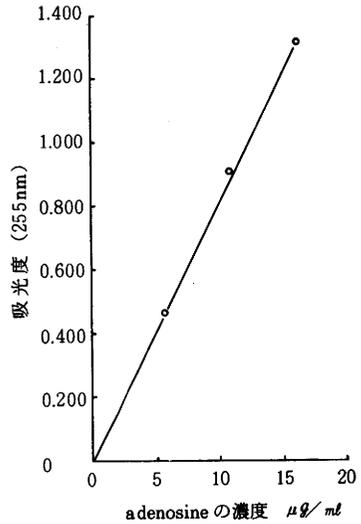


図1-5 adenineの検量線

2. ペーパークロマトグラフィー

ATPを加水分解して生成されるADP, AMP, adenosineおよびadenineを定量するため, それぞれの成分に分離しなければならない。その方法として先に報告(我謝・藤田, 1986)したように, ペーパークロマトグラフィーによる方法によった。各成分のRf値の例を示すとATP: 0.34, ADP: 0.40, AMP: 0.60, adenosine: 0.75, adenine: 0.84であった。

3. ATPの加水分解

3-1 温度による影響 ATPの加水分解が加熱する温度によってどのように影響をうける

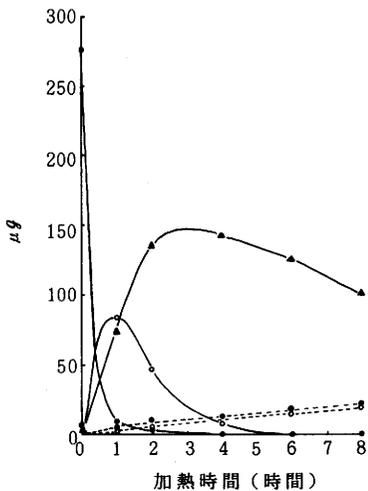


図2. 100°CにおけるATPの加水分解および分解生成物
 ATP ●—● ADP ○—○
 AMP ▲—▲ adenosine ○---○
 adenine ●---●

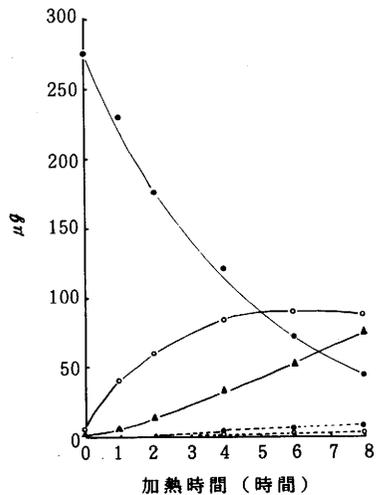


図3. 80°CにおけるATPの加水分解および分解生成物
 ATP ●—● ADP ○—○
 AMP ▲—▲ adenosine ○---○
 adenine ●---●

かを調べてみた。ATP ($5 \times 10^{-2} M$) 溶液 $0.25 ml$ を小型試験管にとり栓を施し、 $60^\circ C$ 、 $80^\circ C$ および $100^\circ C$ で加水分解をおこない、経時的に試料をとりペーパークロマトグラフィーにより ATP および分解生成物をそれぞれの成分に分離、同定後蒸留水で各成分を溶出した。各成分の画分の $255 nm$ の波長における吸光度から残存する ATP および各成分の量を先に作成した検量線から求めた。それぞれの温度における ATP の加水分解の様子を示すと図 2 ~ 4 のようになる。これらの結果から、ATP の加水分解の様子を比較してみると、水中における ATP の安定性はその温度によってずいぶん異なることが明らかとなった。 $100^\circ C$ においては ATP は $80^\circ C$ 、 $60^\circ C$ の温度のときよりかなり不安定で、加熱後 10 数分で 50% の ATP は加水分解されており、1 時間後では 90 数% の ATP が加水分解をうけたことになる。

$80^\circ C$ における水中の ATP は $100^\circ C$ におけるそれにくらべ、かなり安定であることがわかる。すなわち 50% の ATP が加水分解するのに 3 時間あまりの時間が必要であり、8 時間後においてもなお 10 数% の ATP が加水分解されずに残存していることから明らかである。 $60^\circ C$ では ATP はさらに安定な状態で水中に存在していることである。これは先述の $100^\circ C$ および $80^\circ C$ における ATP の加水分解の程度から比較しても明らかで、加熱後 8 時間たった時点で加水分解をうけた ATP の量は、初発の ATP の量のわずか 10 数% 程度で 80 数% の ATP は加水分解されずに残存していることからもうなずける。これはとりもなおさず水中における ATP の安定性が環境の温度によって左右されることを意味している。

4. 温度のちがいによる ATP の分解生成物の消長

水中で ATP が加水分解される様子が加熱する温度によって著しく違うことはすでに述べた通りである。つぎに、ATP が加水分解されると ADP、AMP、adenosine および adenine が生成されるが、これら分解生成物が ATP の加水分解にともない、温度のちがいによって経時的にどのような過程を経るのかを調べてみた。それらの結果を示したのが図 2 ~ 4 である。

4-1 $100^\circ C$ で加熱した場合 $100^\circ C$ では、ATP は短時間に急速に加水分解され、それとともなって ADP と AMP が生成される。ADP の生成量は ATP を加熱して 1 時間後に最多量となりそれ以後は次第に分解して減少している様子がわかる。一方 AMP は加熱後 2 時間までは直線的に増加して 3 時間後頃にピークに達し、それ以後はゆるやかに減少している様子が観察された(図 2)。ATP から ADP あるいは AMP が生成するには、つぎの反応式によるものと考えら

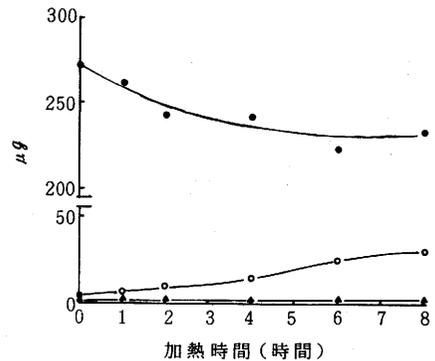
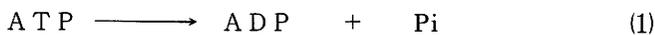


図 4. $60^\circ C$ における ATP の加水分解および分解生成物
ATP ●—● ADP ○—○
AMP ▲—▲

れるが、加熱後1時間の間は、ADP、AMPとも直線的に生成されることからおそらく(1)および(2)の反応式から生成され、AMPの一部はまた(3)式の反応で生成されたとも考えられる。加熱1時間後ではATPはほとんど分解されてしまっているため、それ以後のAMPはATPから(2)式にしたがって生成されることは考えられず、ADPの減少にともない(3)式にしたがってAMPが生成されたと考えるべきであろう。ATPが(1)および(2)式にしたがって加水分解されてADPとAMPが同時に生成され、AMPがある濃度に達するとAMPによってATPからADPが生成する反応が阻害されてADPはそれ以上は生成されず、それ以後はADPは熱のためAMPへと加水分解されてAMPが生成するものと推定される。

adenosineとadenineは100℃および80℃で少量生成されており、60℃では検出されなかった。adenosineおよびadenineの生成量はいずれも80℃の場合よりも100℃の場合の方が多かった。100℃および80℃におけるadenosineとadenineの生成量を比較してみると、いずれの温度でもadenosineよりもadenineの量が多く生成されていた。この両者がAMPから生成するとすれば、adenosineの生成量よりもadenineの生成量が多いということから、AMP分子中のエステル結合よりグリコシド結合の方が切断しやすいとも考えられる。ところが、AMPを加熱して生成されるadenosineとadenineの量を経時的に比較してみると先の結果とは逆にadenosineの量がadenineの量を上まわっている結果を得ているので、AMP分子中のエステル結合よりもグリコシド結合の方が必ずしも切断しやすいとも言いきれない。この両者でのちがいがどういふ理由によるかは現在のところ不明であるが、水中のATPを加熱する場合は水中のAMPを加熱する場合にくらべ、前者の方が分解生成物の種類が多くより複雑な系であるので、考えられる生成物例えばADPからadenineができるとすればribose 5'-diphosphate、AMPからadenineが生成するならばribose 5'-monophosphateの検出や、あるいは、adenosineからadenineが生成される時副生されるriboseなどの経時変化を分析し検討しなければならないと考えられる。

4-2 80℃で加熱した場合 80℃におけるATPの分解生成物は100℃の場合と同じく、ADP、AMP、adenosineおよびadenineであった(図3)。ADPおよびAMPの生成曲線は100℃で加熱した場合にくらべ、ともにゆるやかで、ADP生成のピークは加熱して数時間後にあり、AMPは加熱後8時間までADPの生成曲線よりさらにゆるやかに直線的に生成している様子がわかる。加熱後8時間まではADPの生成量がAMPの生成量を上まわった。このことは100℃で加熱した場合と様子が異なっている。すなわち、100℃での加熱では加熱後1時間も過ぎるとAMPがADPよりも多く生成されたわけで、これは80℃の場合よりも100℃でのATPの分解速度が速い証拠であるといえる。80℃におけるATPの加水分解でも、加熱して9時間後にはADPの生成量よりもAMPの生成量が多くなることは予想された。これは、温度によってATPの加水分解速度が速いか遅いかの違いであって、ATPが加水分解してADPおよびAMPが生成される過程は100℃の場合でも80℃の場合でも同じであると考えられる。

4-3 60℃で加熱した場合 水中のATPを60℃で加熱した場合のATPの加水分解のされ方は図4に示した通りで、100℃、80℃の場合よりも分解されたATPの量はごくわずかで、8時間後でも80数%が加水分解されずに残存していた。ATPからの分解生成物はADPとAMPだけで、しかも生成量はともにごく少量であった(図4)。adenosineとadenineの生成が確認されなかったことは、100℃および80℃の加熱の場合と大きく違う点であった。

5. アミノ酸の影響

加熱温度のちがいによる水中のATPの加水分解のされ方や、その分解生成物の消長の様子についてはすでに述べた通りである。つぎに水中におけるATPの加水分解に対してアミノ酸が共存することによりどのような影響をおよぼすのか実験を試みた。アミノ酸の影響をみるためには、ATPが熱に対して不安定な状態、すなわち100℃で試みることにした。その方がアミノ酸の影響がより顕著にあらわれるであろうと考えたからである。

$5 \times 10^{-2} M$ ATP水溶液にアミノ酸（L-アスパラギン、L-ヒスチジン、L-プロリン）を別々に $5 \times 10^{-2} M$ の濃度に溶解、小型試験管に0.25 mlをとり栓を施し、100℃で加熱した。経時的に試料をとりペーパークロマトグラフィーで残存するATPを分離、ペーパークロマトグラムから溶出した画分の吸光度からATPの量を求めた。同様に対照としてアミノ酸の共存していないATP試料についても同様の操作をおこない、ATPの加水分解に対するアミノ酸の影響を調べた。その結果を示したのが図5である。これらアミノ酸が共存している場合のATPとアミノ酸が共存していない対照のATPとでは、加熱2時間後のATPの量には大きなちがいはないが、それ以前ではアミノ酸が共存していない方のATPの加水分解が著しい。すなわち、加熱開始の初期にはアミノ酸が共存しているとATPの加水分解に対してアミノ酸がATPを保護しているのではないかと考えられる。しかし、時間がたつにしたがい、その効果も弱まり2時間後にはその効果もほとんどない状態となる。同様にATP

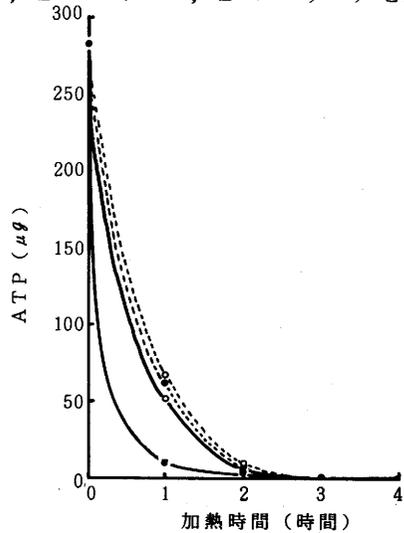


図5. ATPの加水分解（100℃）に対するアミノ酸の影響
+His ○---○ +Asn ●---●
+Pro ○---○ 対照 ●—●

P ($5 \times 10^{-2} M$) 溶液中にアミノ酸が共存している場合と共存していない場合について、80℃の加熱下ではアミノ酸がATPを保護している様子は8時間の加熱時間中観察されなかった。100℃の加熱下では加熱初期1時間位まではアミノ酸がATP

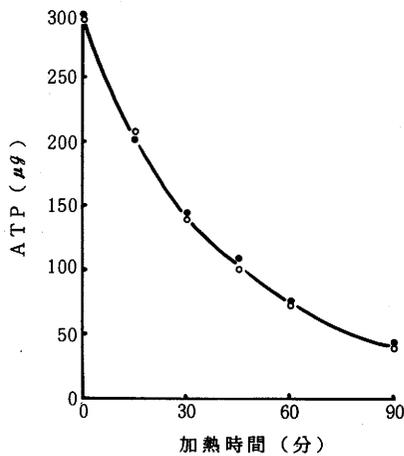


図6. ATPの加水分解（100℃）に対するCysの影響
+Cys ●—● 対照 ○---○

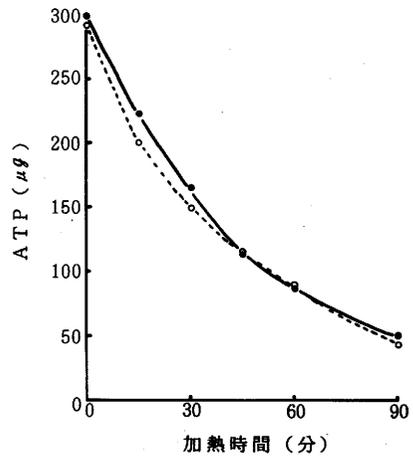


図7. ATPの加水分解（100℃）に対するMetの影響
+Met ●—● 対照 ○---○

を保護している様子が観察されたわけで、先に予測したとおり、ATPがより不安定な環境下でアミノ酸がATPの加水分解を阻害する作用が加熱した初期だけではあるが、その効果があらわれたということである。

さらに他のアミノ酸例えば、L-システイン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-セリンについてATPの加水分解(100℃)に対する影響を調べた。その結果を示したのが図6~図10である。これらはいずれも加熱をはじめから90分間までの影響を調べた

結果である。Cysの影響について調べた結果を示したのが図6であるが、Cysが共存している場合としない場合とではATPの加水分解にはその影響はほとんどみられなかった。

Metの影響については、図7に示した通りである。加熱した初期にMetがATPの加水分解を阻害しているようにもみられるが、効果ありとするかどうかの判断はしにくい結果である。

つぎにPheについてもその影響を調べ、その結果を図8に示した。5×10⁻²MのPheがATP水溶液に存在する場合にはATPの加水分解を多少阻害しているようである。念のためPheの濃度を2倍にして1×10⁻¹Mの濃度での影響を試みたところ、Pheの濃度を2倍にしたことにより、ATPの加水分解を阻害する効果が増大したことは確かである(図9)。アミノ酸の種類にもよると思われるが、共存させるアミノ酸の濃度も重要な因子となることを示唆していると考えられた。

Serについても1×10⁻¹M濃度で実験した結果が図10である。Serの場合もPheと同様ATPの熱による加水分解に対して顕著ではないが、その分解反応を阻害していることは明らかである。

これまで述べてきたように、いくつかのアミノ酸についてATPの加水分解を阻害する作用があるかどうかを調べてきたが、ATPの加水分解を完全に阻害するアミノ酸を見出すことはできな

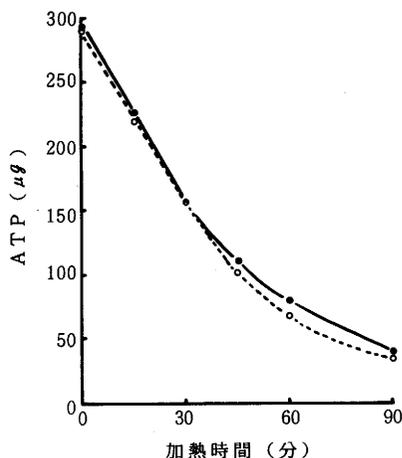


図8. ATPの加水分解(100℃)に対するPhe(5×10⁻²M)の影響
+ Phe ●—● 対照 ○---○

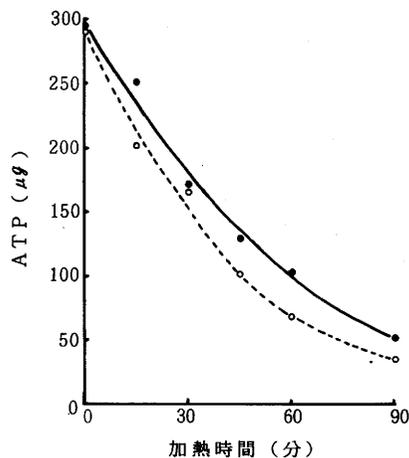


図9. ATPの加水分解(100℃)に対するPhe(1×10⁻¹M)の影響
+ Phe ●—● 対照 ○---○

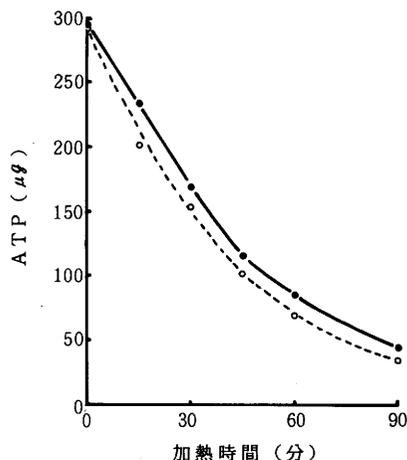


図10. ATPの加水分解(100℃)に対するSer(1×10⁻¹M)の影響
+ Ser ●—● 対照 ○---○

かった。しかしながらアミノ酸の種類によってはATPの加水分解に対してそれを保護しようとする働きのあるアミノ酸のあることが確かめられた。

要 約

水中におけるATPの熱による加水分解、これにともなって生成する分解生成物の経時的な消長およびATPの加水分解に対するアミノ酸の影響について実験をおこない、いくつかの新しい知見を得た。これを要約するとつぎのようになる。

1. 蒸留水に溶解したATP ($5 \times 10^{-2} M$) を加熱するとその温度によって加水分解の速度が異なった。いいかえれば、加熱温度によってATPの安定性が異なった。

2. $100^{\circ}C$ においては、加熱後10数分で50%のATPは加水分解され、1時間後には90数%のATPが加水分解された。ATPが加水分解されるにともない分解生成物としてADP, AMP, adenosine および adenine が生成した。ATPの加水分解直後からADPは急速に増加、1時間ほどでピークに達し、以後は次第に加水分解されて減少した。AMPも同様にATPの加水分解直後から2時間の間に直線的に生成し、3時間ほどでピークに達し、ADPの減少よりもゆるやかに加水分解されて減少した。

3. ATPの加水分解後1時間ぐらまでは、AMPはADPと同様にATPから生成されること、AMPがある濃度にまで生成されるとATPからADPが生成する反応が阻害され、ADPはATPからそれ以上は生成されず、それ以後はADPが加水分解されてAMPが生成されることを推測した。

4. $80^{\circ}C$ の温度では、50%のATPが加水分解されるのに3時間以上の時間が必要で8時間後においてもなお10数%のATPが加水分解されずに残存した。分解生成物は $100^{\circ}C$ のときと同様、ADP, AMP, adenosine および adenine であった。

5. $60^{\circ}C$ の温度では、 $80^{\circ}C$ のときよりもさらに安定に存在し、加熱して8時間後でも加水分解を受けたATPはわずか10数%程度であった。分解生成物はADPとAMPだけでAMPはわずかの量であった。adenosine と adenine を確認できなかったことは、 $100^{\circ}C$, $80^{\circ}C$ の場合にくらべ大きな違いであった。

6. ATP ($5 \times 10^{-2} M$) 水溶液に $5 \times 10^{-2} M$ のアミノ酸を共存させた場合に、熱によるATPの加水分解が阻害されるかどうかはアミノ酸の種類によってその効果が異なった。7種類のアミノ酸(L-アスパラギン, L-ヒスチジン, L-プロリン, L-システイン, L-メチオニン, L-フェニルアラニン, L-セリン)について調べた結果、L-アスパラギン, L-ヒスチジンおよびL-プロリンは、わずかではあるが、加熱開始の初期にATPが加水分解されるのを阻害する作用のあることを示した。L-フェニルアラニンについては、 $5 \times 10^{-2} M$ 濃度でATPの加水分解に対して多少の保護効果が認められ、その濃度を2倍にすることにより、ATPの加水分解に対する保護効果も増大した。

7. ATPの加水分解に対して、これを完全に保護しうる作用のあるアミノ酸は見出せなかったが、アミノ酸の種類によってはその作用のあるあることが確認された。また共存するアミノ酸の濃

度も重要な因子であることを指摘した。

この研究には1986年度文部省指定配分特定研究 (代表者 茨城大学徳永正之教授) の経費を一部使用した。

引用文献

- Alberty, R.A. 1968. Effect of pH and Metal Ion Concentration on the Equilibrium Hydrolysis of Adenosine Triphosphate to Adenosine Diphosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, **243**, 1337-1343.
- . 1969. Thermodynamics of the Hydrolysis of Adenosine Triphosphate. *Journal of Chemical Education*, **46**, 713-718.
- Friess, S.L. 1953. Rates and Energetics of Activation of the Acid-catalyzed Hydrolysis of Adenosine Triphosphate. *Journal of American Chemical Society*, **75**, 323-326.
- Fuller, W.D., R.A. Sanchez and L.E. Orgel. 1972. Studies in Prebiotic Synthesis VI. Synthesis of Purine Nucleotides. *Journal of Molecular Biology*, **67**, 25-33.
- 我謝孟俊, 藤田洋子. 1986. アデノシン5'-三リン酸 (ATP) の紫外線による分解およびヒスチジンの影響予備的実験. 茨城大学教育学部紀要 (自然科学), **35**, 11-21.
- Hulett, H.R. 1970. Non-enzymatic Hydrolysis of Adenosine Phosphates. *Nature*, **225**, 1248-1249.
- Lipkin, D., R. Markham and W.H. Cook. 1959. The Degradation of Adenosine-5'-triphosphoric Acid (ATP) by Means of Aqueous Barium Hydroxide. *Journal of American Chemical Society*, **81**, 6075-6080.
- Ponnamperuma, C. and R. Mack. 1965. Nucleotide Synthesis under Possible Primitive Earth Conditions. *Science*, **148**, 1221-1223.
- Ramirez, F., J.F. Marecek and J. Szamori. 1980. Magnesium and Calcium Ion Effects on Hydrolysis Rates of Adenosine 5'-Triphosphate. *Journal of Organic Chemistry*, **45**, 4748-4752.
- Reid, C., L.E. Orgel, C. Ponnamperuma. 1967. Nucleoside Synthesis under Potentially Prebiotic Conditions. *Nature*, **216**, 936.
- Suzuki, S., T. Higashiyama, K. Ueda, and A. Nakahara. 1972. Hydrolysis of Adenosine 5'-Triphosphate in the Presence of Various Polyamines. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **45**, 1579.
- Waehneltdt, T.V. and S.W. Fox. 1967. Phosphorylation of Nucleosides with Polyphosphoric Acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, **134**, 1-8.