

肝 Arginase 作用に關する研究 (第三報)

Acetyl-L-phenylalanyl-d-arginin の肝 Arginase 作用に
對する態度に就きて

内 野 研 究 室

醫 學 士 海 住 優

Arginin の生物學的意義が Arginase 作用と不可分の關係にありとして Arginin 作用を研究するとき、實際自然界に見る Arginin は其の單體としての形よりは結合乃至その誘導體と見做すべき化合物甚だ多く、従つてかゝる Arginin 結合物乃至誘導體に對する Arginase 作用如何を觀察するは甚だ重要なり。一定化學構造を有する、Arginin 誘導體に對する Arginase の態度を觀察するは、Arginase 作用の特性に關し知見を明にする外、尙蛋白分子中の Arginin 結合狀態も窺知する根據資料ともなる可きものなり。

Kossel 及び Dakin (1904)¹⁾ は Clupein 或は Clupeon には Arginase が作用せざる事を報告せり。Morinaka (1923)²⁾ は Clupeon を以て肝を灌流せしも殆ど其の分解を觀ざりき。Rieser (1906)³⁾ は Arginin の Racemi 體に Arginase を作用せしむるとき、d-型のみ分解せられ l-型は分解せられざる事を證明せしも、其後 Edlbacher 及び Zeller (1936)⁴⁾ は濃厚酵素を使用すれば l-Arginin に對しても作用を認むと報告せり。Guanidin 核を有する種々の物質に對する Arginase 作用の成績を觀るに、Edlbacher 並に Bonem (1925)⁵⁾ は Guanidinessigsäure (Glykocyamin) 及び Guanidinpropionsäure は Arginase に依り分解せられずと云ふ。其後 Karashima (1928)⁶⁾ は Glykocyamin が肝潰浸液にて分解せられる事を認め、Felix 及び Schneider (1938)⁷⁾ も同様に分解陽性なるを認めしも、本分解は Mn^{++} に依り賦活せられず、鶏の Ovarialextrakt は d-Arginin を分解するも本物質を分解せざる事を認め、該酵素作用に對しては特殊の酵素 (Glykozymase) を想像せり。Thomas (1913)⁸⁾ は ϵ -Guanidylcapronsäure は Arginase に依つて分解を受けず、 γ -Guanidylbuttersäure は Arginase により尿素と γ -Animbuttersäure に分解せられる事を報告せり。

Arginindipectid に對する Arginase 作用に關しては、Edlbacher 及び Bonem (1925)⁵⁾ の Arginylarginin に關する實驗あり。即ち Arginylarginin に純化 Arginase を作用せしめし所、

其の分子の半分だけが分解せらるゝ事を認めたり。同氏等は尙更に Agmatin 又は Argininmethylester が Arginase に依り分解せられざるを觀察し, Arginase は遊離炭素酸基を有する Arginin 分子にのみ作用するものならんと想説し, Arginylarginin は尿素と Arginylornithin とに分解せらるゝものと記述せり。最近 Hellerman 及び Stock (1938)⁹⁾ は Guanidovaleriansäure 又は Argininsäure の Arginase (肝又大豆) 作用に對し抵抗を示し, 大量酵素量に依つて僅に分解せられるものにして, この事實より, Arginin の α -Amino 基の Arginase 作用上の意義に就きて述ぶ。

著者は茲に Bergmann (1926)¹⁰⁾, (1927)¹¹⁾ 等の方法に依り合成せし Arginin の Acetyldipeptid 即ち Acetylphenylalanylarginin に Peptidase 作用を除去せる本酵素を作用せしめたり。

先づ牛肝 Glycerin 潰浸液を礬土 (C₇) にて處理し Peptidase 作用又 Acylase 作用を除去したる酵素液を Acetylphenylalanylarginin に作用せしめ, 其の分解産物たる尿素を Urease 法にて測定せしに, 其の消費酸量は 2.20 ccm にして, 供試せる本物質に含まる Arginin 分子の全分解時に於ける消費酸量に對する百分率は僅に 5% なり。亦 Mn⁺⁺ にて賦活せし場合に於ても其の分解率は僅に 8% なり (第 1 表)。而して對照として試験せる d-Arginin の分解に比すれば遙に微弱なり。更に本物質に一定時間本酵素を作用せしめ, 其の作用の停止せし後, 更に新鮮なる同酵素液を添加すれば其の分解値の稍々増大するを認めたり (第 3 表)。次に本物質を鹽酸にて加水分解したるものに純化 Arginase を作用せしむるに, その分解は著明にして對照にとりし d-Arginin の成績に略々等し (表 2)。

以上の實驗より Acetylphenylalanylarginin は Arginase に依り分解を受くるも, 甚だ微弱なるを認む。

本物質に純化せざる Roharginase を作用せしめしに (第 4 表), その分解度は 24 時間にて 31%, 72 時間にて 40% にして, 同時に Formoltitration に依り酸値増加を觀るに, Acetyl 基か或は Acetylphenylalanin か酸アミド結合 1 個だけが水解すると假定せし時の全分解値に對する百分率は 24 時間にて 30% 72 時間にて 40% なり。この兩定量法に依る分解百分率は大體一致するは興味あり。尙本物質に豚脾潰浸液を作用せしめ Formoltitration により酸値増加を觀るに明にその増加を認めたり (第 5 表)。Roharginase 作用の場合には本物質は直接 Arginase 作用を受くる事は少く, むしろ先づ Dipeptidase 或は Acylase 作用を受け分解した後, 初めて Arginase 作用を受くるものと説明せらる。

最近 Felix 及び Schneider (1938)⁷⁾ は Argininsäure, d-l- α -N-Meihylarginin, E-guanido- α -Aminocopronsäure, Guaindinessigaure は PH 7.0 に於て Clupein は PH 7.8 に於て Arginase

に依り分解せらるゝ事を報告せり。依つて PH の關係を吟味するため、PH 7.0 或は 7.8 に於て Acetylphenylalanylarginin に Arginase を作用せしめしも其の分解は亦微弱なりき（第6表）。上述の結果より考ふるに、Arginase 作用に於て基質の α -Amino 基も亦之に意義あるものとして、該酵素作用上に注意すべきものと思ふ。

實 驗 部

I, Acetylphenylalanylarginin の合成^{10) 11)}

(α) Azlacton des N-Acetyl-l-phenylalainin

5g l-phenylalanin を 50 ccm 無水醋酸に加へ、100°C の水溶中にて溫溶せしめ、之を減壓の許に加熱して醋酸及び無水醋酸を驅除すれば褐色の Syrup を殘留す。このものを 0.8 mm の低壓下に 118°C にて蒸溜すれば無色 Syrup 狀の Azlacton を收得す。本物質は空中に放置すれば Acetylphenylalanin (S. P. 150°-157°) に變化する故に蒸溜後密閉保存す。

(β) N-Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin

上記の Azlacton (2.2 g) を Arginin 鹽酸鹽 (2.0 g) と共に Alkali 溶液 (2 n-NaOH 4.5 ccm 水 + 2.0 ccm) 中に混ち更に Aceton (20.0 ccm) を加へ約 2 時間振盪し 15 時間室溫に放置す。然る後、濾過し低溫 (40°C) 減壓下に濃縮し得たる Sirup 様物質を無水 Alkohol に溶し冷却結晶せしむ。結晶せざるときは Aceton にて沈澱せしむ。本實驗に用ひしものは Aceton にて沈澱せしめたる白色、粉末なり。

茲に得たる物質は水に溶解易く、冷 Äthylalkohol には稍々難溶なるも溫めればよく溶けるも Methylalkohol には難溶なり。Aceton 並に Äther には不溶性なり。非常に吸濕性にして空中にて水を吸ひ溶解す。従て 78°C, 0.1 mm にて、 P_2O_5 を乾燥劑として乾燥す。

性質；熔融點 172°, 遊離 Amino 窒素陰性、坂口氏反應陽性、Ninhydrin 反應陰性、無機物を證明し得す。水溶液は弱酸性を示す。

II, 酵素 (Arginase) 精製法

牛肝の 3 倍容量 Glycerin 漬浸液を 200 ccm とり水を以て 5 倍容量となし、PH 5.6—6.0 にて少量の Kaolin に吸着せしめ、更にその Restlösung に Kaolinsuspension (7 g Kaolin : 50 ccm 水) を加へ吸着せしむ。此の Restlösung に 10 ccm 礬土浮游液を加へ吸着せしめ、其の Restlösung に更に礬土浮游液 100 ccm を加へ吸着せしむ (PH 6.0—7.0)。この礬土に吸着せられしものを、PH 9.0 の 0.1 Mol Glykokll-NaCl-NaOH 調節液にて溶出し、茲に精製 Arginase 液を得。以上は Edlbacher 並に Simons (1927) の記載に依りしものなり。本酵素液は赤褐色、

半透明の液にして Peptidase 作用又 Acylase 作用陰性なることを試験せり (第 7 表).

礬土浮游液は Willstätter u. Kraut (1923)¹³⁾ の記載に依りて調製し, 其の C_T に相當す. 即明礬 (500 g) 溶液に 20 % アンモニア 水 (1000 ccm) を多量の水と共に大なる容器中にて混じ, 生じたる白色沈澱を約 3 ヶ月間毎日水にて洗滌せし後, 500 ccm の水浮游液として貯ふ. この白色沈澱は 35 % 鹽酸と共に熱すれば直に溶解す.

Ⅲ, 分 解 試 験

(1) Acetyl-l-phenylalanyl-l-arginin の精製 Arginase に依る分解

4.0 ccm	0.1 Mol 基質溶液
8.0 ccm	0.1 Mol Glykokoll-NaOH 調節液 (PH 9.0)
1.0 ccm	水 (非賦活)
	或は 0.005 Mol 硫酸 Mangan (賦活)
2.0 ccm	精製酵素液

本試験液 (PH 9.0) を 24 時間, 37°C に保置したる後, 煮沸水中にて酵素作用を中絶せしめたる後, 分解發生せる尿素を Urease 法にて分解し, 發生安門を 0.02 n 酸中に蒸溜測定す. 基質の代に水を用ひしもの, 及び酵素液の代に水を用ひしものを對照試験となし, 其の値を本試験値より除去せり. 表に掲げし分解の % は基質の理論的全分解値 (40 ccm 0.02n-SO₄ H₂) に對する百分率なり.

第 1 表

基 質	非 賦 活		賦 活	
	消 費 酸 量 (ccm)	分 解 (%)	消 費 酸 量 (ccm)	分 解 (%)
Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin	2.20	5.5	3.10	7.8
d-Argininmonochlorhydrat	30.40	76.0	40.00	100.0

(2) Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin の鹽酸分解產物に對する精製 Arginase 作用

1 Mol Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin 2 ccm に 10 n-Hcl 5 ccm を加へ, 6 時間逆流冷却装置を付して煮沸, 加水分解す. 苛性曹達液にて中和し, 全量を 20 ccm となし, その 4 ccm をとり Arginase 作用を (1) と同様にして測定す.

第 2 表

基 質	非 賦 活		賦 活	
	消 費 酸 量 (ccm)	分 解 (%)	消 費 酸 量 (ccm)	分 解 (%)
Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin	27.30	68.2	38.90	97.2
d-Argininmonochlorhydrat	30.40	76.0	40.00	100.0

(3) Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin に對する Arginase の重添加試験

{ 20 ccm 0.1 Mol 基質溶液
12 ccm 精製酵素液
28 ccm 0.1 Mol Glykokoll-NaCl-NaOH 調節液 (PH 9.0 に調節す)

試験液 10 ccm 宛に就き、試験直後より 24 時間毎に尿素發生を觀察す。その消費酸量のほど一定したるとき、更に該酵素液を試験液 10 ccm に就き 2 ccm 宛の割合に加へ、その後試験液 12 ccm に就き Arginase 作用を觀る。この場合基質溶液の代に水を用ひたる試験液を對照として附す。

第 3 表

基 質	消 費 0.02n-硫 酸 量 (ccm)					
	試験直後	24時間	48時間	試験直後	24時間	48時間
Acetsyl-l-phenylalanyl-d-arginin	0.40	1.30	1.35	1.40	1.60	1.60

↑
新酵素 6 ccm ヲ添加ス

(4) Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin の Roharginase (牛肝潰浸液) に依る分解

{ 20 ccm 0.1 Mol 基質溶液
10 ccm 酵素液 (牛肝潰浸液)
70 ccm 0.1 Mol Glykokoll-NaCl-NaOH 調節液 (PH 9.0 に調節す)

直後、24 時間又 48 時間目に試験液 10 ccm 宛をとり (1) の如くして Aginarse 作用を測定す。勿論對照として其基質液の代に水を用ひし液を同様に試験す。尙試験 10 ccm に就きて Formoltitration を行ふ。

第 4 表

分 解 時 間	Urease 法に依る發生安門量		Formoltitration	
	消費酸量 (0.02n-SO ₄ H ₂ ccm)	分 解 (%)	10ccm 中酸値増加 (0.1n-NaOH ccm)	分 解 (1ヶ所で切れ るとして)
24 時 間	6.30	31.5	0.61	30.5
72 時 間	8.10	40.5	0.80	40.0

(5) Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin の豚膵潰浸液に依る分解

豚膵の Glycerin 水 (6:4) 潰浸液を用ひ、PH 7.5 37°C にて作用せしめ其の 4 ccm に就き Formoltitration に依り分解を觀る。基質を添加せざる酵素液調節液を對照試験となす。

- { 5 ccm 0.1 Mol 基質溶液 (對照試験には水)
- { 2 ccm 豚膵潰浸液
- { 3 ccm 燐酸調節液 (PH 7.5 に調節す)

第 5 表

基 質	4 ccm 液中酸値増加 (0.1 n-NaOH ccm)	分 解 (%)
Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin	1.70	42.5

(6) PH 7.8 並に PH 7.0 に於ける Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin の精製 Arginase に依る分解

試験液には燐酸調節液を用ひて PH 7.0 或は 7.8 に調節し 24 時間、37° に保置したる後、Urease 法にて測定す。この場合も (1) と同様に對照試験を附す。

- { 4.0 ccm 0.1 Mol 基質溶液
- { 8.0 ccm 燐酸調節液 (PH 7.0 或は 7.8 に調節す)
- { 1.0 ccm 水 (非賦活) 或は 0.005 Mol 硫酸 Mangan (賦活)
- { 2.0 ccm 精製酵素液

第 6 表

基 質	PH	消費酸量 (0.02n-SO ₄ H ₂ ccm)	
		非 賦 活	賦 活
Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin	7.0	0.75	1.10
	7.8	1.20	1.70

(7) 精製 Arginase の Acylas 及び Peptidase 作用試験

{ 10 ccm 0.1 Mol 基質溶液
8 ccm 磷酸調節液 (PH 7.5 に調節す)
4 ccm 酵素液

試験液 5 ccm 宛をとり Formoltitration にて酸値増加を観る. (37°, 72 時間). 対照試験として基質液の代に水を用ひしものを附す.

第 7 表

基 質	5 ccm 液中酸値増加 (0.1 n-NaOH ccm)
Benzoylglycylglycin	0
Benzoylglycin	0
Glycylglycin	0.05
Acetylphenylalanylarginin	-0.05

結 論

Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin は Arginin に比し肝 Arginase 作用に依りて甚だ微弱なる分解を受けるに過ぎず該酵素作用に對し抵抗あるものとなす. 依て基質の α -Amino 基も亦 Arginase 作用に際し之に意義あるものなるべ可しと想像す.

本研究の一部は服部報公會研究援助に依りて行はれたるものに就き茲に感謝の意を表す.

擱筆に臨み恩師内野教授の懇切なる御指導並に御校閲の勞に對し衷心より謝意を表す.

文 獻

- 1) Kossel, A. und Dakin, H. D., (1904), Zeits. f. physiol. Chem., **42**, 181.
- 2) Morinaka, K., (1923), ebenda **132**, 152.
- 3) Riesser, O., (1906), ebenda **49**, 210.
- 4) Edlbacher, S. und Zeller, A., (1936), ebenda **242**, 253.
- 5) Edlbacher, S. und Bonem, P., (1925), ebenda **145**, 69.
- 6) Karashima, F., (1928), ebenda, **177**, 42.
- 7) Felix, K. und Schneider, H., (1938), ebenda **255**, 132.
- 8) Thomas, K., (1913), ebenda **88**, 465.

- 9) Hellerman, L. und Chester Stock, C., (1938), Tourn. of Biolog. Chem., **125**, 771.
- 10) Bergmann, M., Stern, F. und Witte, C., (1926), Liebig. Annal. **449-450**, 299.
- 11) Bergmann, M. und Köster, H., (1927), Zeits. f. physiol. Chem. **167**, 91.
- 12) Edlbacher, S. und Simons, E., (1927), ebenda **167**, 76.
- 13) Willstätter, R. und Krant, H., (1923), Ber. **56**, 146.

腫瘍の生化学的研究(A第八報)

家兔癌腫組織の蛋白分解酵素作用に就きて

内 野 研 究 室

醫學博士 内 野 仙 治
吉 岡 政 七

腫瘍の蛋白分解酵素作用, 殊に家兎及び家鶏肉腫 Kathepsin (内野, 吉岡, 1937)¹⁾ に就きては既に報告せり. H. Kleinmann (1931)²⁾ の Nephelometrie に依る Kathepsin 作用の比較研究に依れば, 腫瘍組織 Kathepsin 作用は正常實質性組織のそれには及ばず, 之と非實質性組織との中間にありと云ふ又 E. Maschmann 等 (1933)³⁾ は Hühnersarkom 又 Mäusesarkom に就きて悪性腫瘍組織の Kathepsin 作用は正常組織に比し特に増強を認めず, 且つ賦活に依る全活性度も著しく大ならずと發表せり.

H. Kleinmann (1931)²⁾ は悪性人癌腫組織に依る Diglycin (PH 7.0) 又 dl-Leucylglycin (PH 8.0) の分解陽性を報告せしが, 吾等 (1935)⁴⁾ は家鶏肉腫 Dipeptidase 作用に就きて試験し, 其の程度は肝のそれに及ばず, 筋に近似なるを観たり. 尙末期 (移植後十九日) に及び, その分解値は更に低下せり. 家兎肉腫 Dipeptidase 作用 (内野, 吉岡, 1937)¹⁾ は同動物 筋のそれより遙に強く, 肝程度の分解を示せり.

Polypeptidase (dl-Leucyldiglycin 分解) 作用に就きては, E. Maschmann 等 (1933)³⁾ の Mäusecarzinom (Ehrlich) 又 E. Waldschmidt-Leitz 等 (1933)⁵⁾ の Rattencarzinom に就きて發表せる分解陽性成績とほぼ同様の結果を得たり.

更に腫瘍蛋白分解作用の知見を擴充すべく, 動物癌腫殊に家兎辜丸癌腫 (Brown-Pearce) に就きて移植後三十日又六十日目二期に分ちて, その Kathepsin, Peptidase 又 Acylase 作用を観察せり.

Kathepsin 作用に關しては Cystein 賦活を考慮し, Casein 又 Gelatine の分解作用を観察せし成績は第 1 表の如き結果を得たり. E. Waldschmidt-Leitz 等 (1933)⁵⁾ の Sarkom Philadelphia 及び Rat ten-Carzinom Walker 256 を材料とせるものに於て, 壊死部増加に伴ひ Kathepsin

作用減弱すと報告せり。上述の如く家兔肉腫 Kathepsin 作用は筋と大差なく、肝より遙かに弱きものなりしが、移植後30日目の家兔睾丸癌腫 (Brown-Pearce) の Kathepsinaktivität は明に之を認め、その分解値は Cystein 添加に依り更に著しく増強せらる。対照とせし正常睾丸組織の Kathepsinaktivität は極めて微弱にして、Cystein 賦活に依り、著明に發現するも、その程度は癌組織に比し之より低弱なり、移植後60日目の癌組織 Kathepsin の Cystein 賦活に依る全活性度は甚だ弱し。

家兔癌腫 Kathepsin 作用は同動物肝のそれとほぼ同程度なりと云ふ可し。

Diglycin 又 dl-Leucylglycin の分解試験は表2の如く、何れも家兔肉腫 (内野, 吉岡, 1937)⁶⁾ 同様著明に家兔睾丸癌腫組織に依りて分解せらる。短時間消化 (3 時間) に於ては PH 8.0 に最高分解値を見るも、24 時間後に於ては PH 7.0 に最大酸値増加を得たり。dl-Leucyldiglycin は PH 7.5 に於て著明に分解せらる。

Pepton の分解試験も陽性成績を示し、正常睾丸組織の場合と大差を認めず。

Glycylsulfanilsäure は酵素作用に抵抗あり。

Acylase 作用は表3の如く何れも分解を認めず、肉腫組織と同じく陰性成績なり。

Halogenacylase 作用に關して市岡 (1937)⁷⁾ に依れば、Chloracetylphenylalanin 分解試験は家鶏肉腫に於て陽性を示し、家兔肉腫及筋は陰性にして、同動物肝又腎は著明に之を分解 (PH 6.5—7.5) すと云ふ。家兔癌腫に於ても或はかゝる特殊性を示すに非ずやと試験せしも、分解陰性にして又 dl- α -Bromisocapronylglycin も抵抗を示せり。但し正常睾丸組織の長時間作用の場合に、 $\text{NH}_2 \cdot \text{N}$ の増加を見たるは甚だ興味ある成績にして更にその特性に就きて研究すべし。

實 験 の 部

(1) 酵素液: 家兔睾丸に無菌的に移植せし家兔睾丸癌腫組織 (Brown-Pearce) の増殖せしものを用ふ。移植後2週間前後頃より睾丸組織は瀰漫性に癌腫組織化し、癌腫形成部と其の睾丸組織と分離する事困難なりしが、睾丸組織と見る可き部分は出来る限り除去せり。対照としては、移植せざりし健康家兔の睾丸組織を用ふ。移植後30日又60日の二期に就き腫瘍部を剔出し、之を細斷し、よく磨潰す (末期の60日目のものは注意深く壊死部を出来るだけ除去す)。此の組織粥にその重量の3倍容量の Glycerin-Wasser (Glycerin 1 : Wasser 1 の割に混和し、0.05% Essigsäure を含有す) を加へ再び能く磨潰し、細目篩を篩したるものに Toluol を重層し氷室に貯ふ。此の潰浸液を酵素液として使用する。