

家兔膵臓の蛋白分解酵素作用の研究 (第一報)

家兔膵臓及び小腸粘膜潰浸液の蛋白分解酵素作用の研究

醫學士 市岡冬太郎

消化管系統臓器の蛋白分解酵素作用の研究は、最近長足の進歩を見るに至つたが⁽¹⁾、其試料は主として牛、豚又犬に關するものである。著者は比較研究の目的と、醫學上試験動物として最も多く使用される家兔の消化系臓器、殊に膵臓に關する蛋白分解酵素作用の研究に従事した。

本報告はその一部にして、家兔膵潰浸液又小腸粘膜潰浸液の蛋白又合成 Dipeptide 或は Acylpeptide に對する態度を觀察した成績である。之は一面には各種動物膵又小腸粘膜の蛋白分解酵素作用の比較資料となし、他面には、今後研究せむとする膵液作用との異同比較研究の基礎となす爲めである。尙 Vonk 氏⁽²⁾の Pankreatin に依る Fibrin, Rindfleisch 又 Hechtfleisch の消化作用が、膽汁添加 (1/20 量) に依り、増強され、而も PH 6.2 の弱酸性をその至適酸度とすると云ふ報告を參考として、小腸粘膜潰浸液に就いて、かゝる消化酵素に及ぼす膽汁の影響如何の問題をも検討する目的で實驗した成績をも報告致します。

研究結果は、膵潰浸液は弱鹼反應 (PH 7.0—8.0) にて Gelatine 又 Casein を分解し、該分解能は Kinase 粉又 Kinase 液を添加するも、特に増強しない。即潰浸液中の Trypsin 作用は全賦活の状態のものと考へらる。第二報に報告する膵液自體には該作用陰性なる爲め、潰浸液調製過程に於いて賦活されしものなる可し。(表 1)

膵潰浸液は既に Diglycin 分解能を示す。Kinase 粉添加潰浸液は Diglycin 又 Leucylglycin を著明に分解す。表に依り潰浸液の Dipeptidase 作用は甚だ強力のものとも考へられず、又 Kinase 粉自體の Erepsin 作用の殘存保有は否定出來ざるも、決して強力なるものに非ず、然るに兩者混合液は比較的強力なる Dipeptidase 作用を發揮せる觀がある(表 1)。

之は兩者混液の結果から由來する何等か特殊作用の發現に依るものかも知れないが、判定には尙研究を要す。

膵潰浸液は尙 dl-Leucyl-glycyl-phenylalanin (β) をも分解陽性なり。潰浸液にかゝる Dipeptidase 又 Polypeptidase 作用のある事が膵液本來の作用なりや否やは疑はしく、之恐らく組織 Peptidase 作用に依るものと思ふ。(表 1)(第二報参照)

Benzoylglycin 又 Benzoyldiglycin は潰浸液の賦活如何に關せず常に陰性である。Chloracetyl-L-tyrosin 又 Benzoyl-dl-leucyl-glycin は何れも賦活潰浸液にて分解陽性である。(表 1)

第1表 家兔潰浸液の蛋白分解酵素作用

(4 ccm 消化液, 酸値増加, ccm n/10 NaOH)

 (2 ccm 消化液, $\text{NH}_2\text{-N}$ 増加, mg $\text{NH}_2\text{-N}$)

基 質	酵 素 液	時間	PH						
			6.0	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	
Casein (1 %)	脾 潰 浸 液	5	0.67	0.67	—	0.60	—	—	
		24	0.90	0.97	—	0.80	—	—	
		72	1.20	1.21	—	1.04	—	—	
	同 上 Kinase 液 賦 活	5	0.78	0.81	—	0.75	—	—	
		24	1.03	1.09	—	0.96	—	—	
		72	1.27	1.33	—	1.26	—	—	
Gelatine (1 %)	脾 潰 浸 液	5	0.16	0.32	—	0.32	—	—	
		24	0.40	0.56	—	0.50	—	—	
		72	0.51	0.78	—	0.63	—	—	
	同 上 Kinase 液 賦 活	5	0.16	0.38	—	0.32	—	—	
		24	0.38	0.59	—	0.42	—	—	
		72	0.51	0.76	—	0.63	—	—	
Diglycin	脾 潰 浸 液	24	—	—	0.12	0.15	—	0	
		72	—	—	0.13	0.21	—	0.02	
	同 上 Kinase 粉 賦 活	5	0.04	0	—	0.09	0.06	0.16	
		24	0.04	0.08	—	0.20	0.29	0.53	
		同 上 Kinase 粉 賦 活	24	0.06	0.19	—	0.65	0.84	0.97
			72	—	—	—	—	—	—
dl-Leucyl-glycin	同 上 Kinase 粉 賦 活	5	-0.04	0.04	—	0.20	0.29	0.33	
		24	0.05	0.10	—	0.62	0.69	0.75	
		72	0.17	0.30	—	0.74	0.74	0.77	
dl-Leucylglycyl- dl-phenylalanin (β)	同 上 Kinase 液 賦 活	24	—	—	0.079 (mg NH ₂ -N)			—	
		48	—	—	0.063			—	
Benzoylglycin	脾 潰 浸 液	5	-0.02	0.02	0	0	—	0.01	
		24	-0.02	0	0	0.01	—	0.01	
		72	-0.02	0	0	0.01	—	0.03	
	同 上 Kinase 粉 賦 活	5	0	0	0	0	—	0	
		24	0	0	0	0	—	0	
		72	0	0	0	0	—	0	
	同 上 Kinase 液 賦 活	5	0	0	—	0	—	—	
		24	-0.01	-0.02	—	0.01	—	—	
		72	0.01	-0.02	—	0	—	—	
Benzoyldiglycin	脾 潰 浸 液	5	0.09	0	—	0.02	—	0.03	
		24	0	0	—	0	—	0.03	
		72	0	0	—	0	—	0.03	
	同 上 Kinase 粉 賦 活	5	-0.05	0.02	0	0.07	—	0.03	
		24	-0.05	0.02	0	0.07	—	0.03	
		72	-0.05	0.02	0	0.07	—	0.03	
	同 上 Kinase 液 賦 活	24	0.01	0.02	0.06	0.03	—	0.02	
		144	0	0.02	0	0	—	0.02	
		—	—	—	—	—	—	—	
Benzoyl-dl-leucyl- glycin	脾 潰 浸 液 Kinase 液 賦 活	24	—	—	0.057 (mg NH ₂ -N)			—	
		72	—	—	0.100			—	
Chloracetyl- tyrosin	脾 潰 浸 液 Kinase 液 賦 活	24	—	—	0.145 (mg NH ₂ -N)			—	
		72	—	—	0.153			—	

内野⁽³⁾は豚脾潰浸液中に賦活性 Benzoyldiglycin 又 Phtalyldiglycin 分解作用を発見して居るが, E. Waldschmidt-Leitz⁽⁴⁾ は同様豚浸出液中に賦活性 Chloracetyl-l-tyrosin 又 Phtalyldiglycin 分解酵素を認め Carboxypolypeptidase と稱して居る。

家兔脾潰浸液に就いては Benzoyldiglycin 分解陰性である。本研究は脾液に就いて詳細に観察したい。

小腸粘膜潰浸液も Gelatine を分解し (PH 7.0—8.0), 又 Diglycin (PH 7.0—7.5) 又 dl-Leucylglycin (PH 6.0—7.0) を分解する。dl-Leucylglycin は既に内野等⁽⁵⁾が報告せる如く弱酸性反応にてよく分解能を発現せる點に注意したい。(表 2)

第2表 家兎小腸粘膜潰浸液の蛋白分解酵素作用

(4 ccm 消化液の酸値増加, ccm n/10 NaOH)

基 質	時間	PH						
		5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	9.0
Gelatine	3	—	0.07	0.12	0.24	—	0.27	0.15
	8	—	0.24	0.60	0.80	—	0.91	0.90
	24	—	0.87	2.07	2.30	—	2.51	2.40
Diglycin	3	0	0.11	—	1.00	1.47	1.19	0.55
	8	0	0.30	—	1.56	1.47	1.39	0.72
	24	0	0.67	—	1.63	1.54	1.46	1.09
dl-Leucyl-glycin	8	0	0.23	—	0.32	0.17	0.12	0.02
	24	0	0.55	—	0.41	0.18	0.13	-0.03
	72	0	1.03	—	0.38	0.20	0.17	0.07

小腸粘膜潰浸液に依る Gelatine 又 Diglycin 分解作用に及ぼす胆汁添加の影響を観察したるに、總べて胆汁濃度上昇とともに寧ろ著明なる阻止作用を認むるも、促進的影響は著明ならず、PH 7.0—8.0、胆汁濃度 $\frac{1}{50}$ の試験に僅にその観ある程度に過ぎなかつた。(表3、表4)

第 3 表

家兎小腸粘膜潰浸液の Gelatine 分解作用に及ぼす胆汁の影響

(4 ccm 消化液の酸値増加, ccm n/10 NaOH)

消化時間	胆汁濃度	PH				
		6.0	6.5	7.0	8.0	9.0
3	0	0.07	0.12	0.24	0.27	0.15
	1/100	0.06	0.15	0.19	0.25	0.19
	1/50	0.04	0.12	0.28	0.29	0.21
	1/20	0.02	0.13	0.14	0.15	0.13
	1/10	0	0.10	0.10	0.13	0.12
8	0	0.24	0.60	0.80	0.91	0.90
	1/100	0.13	0.55	0.66	0.76	0.74
	1/50	0.23	0.39	0.90	0.91	0.85
	1/20	0.12	0.52	0.59	0.58	0.55
	1/10	0.01	0.44	0.41	0.47	0.45
24	0	0.87	2.07	2.30	2.51	2.40
	1/100	0.68	2.16	2.19	2.44	2.41
	1/50	0.97	1.52	2.50	2.62	2.29
	1/20	0.55	1.70	1.76	1.80	1.67
	1/10	0.66	1.84	1.65	1.74	1.69

材料を異にするものなれど、Vonk⁽²⁾ 氏の如き促進的影響或は作用至適酸度の移動等は観察出来なかつた。

實 験 部

1) 脾潰浸液及び小腸

粘膜潰浸液、家兎脾臓を周圍組織より分離しよく磨潰し、三倍容量グリセリン(4水6グリセリン)を加へ更によく磨潰した

るものにトルオール上層

して氷室に貯ふ。

家兎小腸を開き、粘膜を搔取り、三倍容量グリセリン(同上)を加へ、磨潰したものを、トルオール上層の許に氷室に貯ふ。

2) 基質溶液・蛋白は1%溶液に、合成 Peptide

第 4 表

家兎小腸粘膜潰浸液の Diglycin 分解作用に及ぼす胆汁の影響

(4 ccm 消化液の酸値増加, ccm n/10 NaOH)

消化時間	胆汁濃度	PH				
		6.0	6.5	7.0	8.0	9.0
3	0	0.11	—	1.00	1.19	0.55
	1/100	0	0.33	0.60	0.77	0.59
	1/20	0	0.10	0.20	0.35	0.17
	1/10	0	0	0.10	0.29	0.20
8	0	0.30	—	1.56	1.39	0.72
	1/100	0.05	0.56	0.85	1.02	0.90
	1/20	0	0.15	0.38	0.55	0.35
	1/10	0	0.05	0.29	0.59	0.87
24	0	0.67	—	1.63	1.46	1.09
	1/100	0.23	1.01	1.53	1.35	1.25
	1/20	0	0.45	0.83	0.83	0.60
	1/10	0	0.20	0.74	1.04	0.77

は 1/20 Mol 溶液となす。何れも Citrat 又 Phosphatpuffer にて適宜水素イオン濃度溶液に調節す。Acylpeptide の水難溶のものは n-NaOH 溶液を計算量滴加し、アルカリ鹽とせるものを用ふ。

3) 賦活法、豚潰浸液原液 10 ccm に就き 0.05—0.1 g Kinase 粉又等量 Kinase 液を加へ室溫(20°)三十分放置す。

Kinase 粉は家兎小腸粘膜粥を三回三倍容量 Aceton にて處理し、Aceton-Aether 等量混液にて一回洗滌し、最後に一回 Aether にて洗滌し、扇風器にて Aether を除去し、空眞乾燥器中に乾燥す。Kinase 液は 5 g 小腸粘膜乾燥粉末に 250 ccm 0.04 n-NH₃ を加へ 30°, 30 分浸出し、その濾液を眞空蒸溜して NH₃ を去り、200 ccm とし n- 醋酸を滴加し生じたる沈澱を濾別し、濾液に 1% Sublimat 溶液を加へ沈澱の生ぜざるに至り、その濾過より SH₂ にて Hg を除去し、SH₂ 過剰を通風にて去り、全容量 200 ccm とす、是 Waldschmidt-Leitz-Shinoda⁽⁶⁾ 法に依る。本液は Kinase 作用あるも、Esepsin 作用は殆ど無し。

4) 試験法、消化液 20 ccm に對し、酵素液 2—4 ccm を加へトルオール上層の許に 37° に消化せしむ。一定時消化後消化液 4 ccm に就き Formoltitration にて酸値測定し、又 2 ccm に就き Van Slyke 法にて NH₂-N を定量す。試験直後値及び酵素液のみの定量値を對照値として引去りたる、増加酸値 (ccm NaOH) 又増加 NH₂-N 値 (mg N) を、分解値として表に掲ぐ。

5) 胆汁添加試験。消化液の 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 容量の家兎胆汁を、それに加へ、上記條件の許に消化せしめ、増加酸値を掲ぐ。

總 括

1) 家兎豚潰浸液は、全賦活状態にある Trypsin 作用を有す (PH 7.0—8.0)、恐らく潰浸操作に依り賦活されしものと考へらる。

2) 同上液には Dipeptidase 及び Aminopolypeptidase 作用 (PH 7.0—8.0) を有す。之は恐らく組織 Peptidase に由來するものなる可し。

3) 同上液に Benzoylglycin の分解能を認めず、Histozym 作用無し。尙 Benzoyldiglycin も賦活又非賦活に關係なく分解陰性なり。

4) Chloracetyl-l-tyrosin 及び Benzoyl-dl-leucylglycin は賦活豚潰浸液に分解さる。

5) 家兎小腸粘膜潰浸液中には Gelatine 分解陽性 (PH 7.0—8.0) 又 Diglycin (PH 7.0—7.5) 及び dl-Leucylglycin (6.0—7.0) 分解著明なり。即 Trypsin 作用及び Erepsin 作用を認む。

6) 上記兩作用に對し、胆汁の影響を観察するに、寧ろ量的に阻止作用を認め、促進的影響は明かならず。

(第 6 回京都講演會に於て發表)

文 献

- (1) R. Willstätter, Untersuchungen über Enzyme (1928).
W. Grassmann, Ergebnisse der Enzymforschung 1, 129 (1932).
J. Northrop, " 1, 302 (1932).
- (2) Vonk, Zerts. f. physiol. Chem., 218, 33 (1933).
- (3) S. Utzino, J. of Biol. Chem., 9, 483 (1928).
- (4) E. Waldschmidt-Leitz u. A. Purr, Ber. d. deutsch. Chem. Ges., 62, 2218 (1929).
- (5) 内野仙治, 日本生化学會會報第7回總會號 7, (1931).
- (6) E. Waldschmidt-Leitz u. O. Shinoda, Zeits f. physiol. Chem., 176, 301 (1928).