

# 豚の胃粘膜，小腸粘膜，膵臓および腎臓の 蛋白質分解酵素に関する知見

長谷川 喜 斐\* · 副 島 正 美

## Note on the Proteases of Swine Stomach Mucosa, Intestinal Mucosa, Pancreas and Kidney

YOSHII HASEGAWA and MASAMI SOEJIMA

### I 緒 言

動物臓器の蛋白質分解酵素，特に胃粘膜のペプシン，膵臓のトリプシンやカルボキシペプチダーゼ，腎臓のカテブシン，ロイシンアミノペプチダーゼやアジラーゼ，小腸粘膜のロイシンアミノペプチダーゼやジペプチダーゼ等に関する報告は膨大な数にのぼっている。しかしながら現在もお研究が続行されているいわば古くて新しい研究課題である。著者等は蛋白質の消化分解に最も関連のある胃，膵臓，小腸の他に腎臓を加えた4つの屠殺直後の臓器について主としてミルクカゼインを基質として用いた場合の酵素活性（プロテナーゼ）および L-Leu-ucyl- $\beta$ -naphthylamide<sup>1)</sup>を基質として用いた場合の酵素活性（ロイシンアミノペプチダーゼ）を調べた結果若干の知見を得た。

すなわち，プロテナーゼに関しては胃粘膜の場合

1.7 附近に至適 pH をもつ酸性プロテナーゼ（ペプシン）膵臓の場合 pH 9.0 附近に至適 pH をもつアルカリ性プロテナーゼ（トリプシン），腎臓の場合 pH 1.7 附近に至適 pH をもつ酸性プロテナーゼ（カテブシン-D）を追試確認した。

特に興味深いのは小腸粘膜の場合，pH 1.7 附近に至適 pH をもつ酸性プロテナーゼと pH 9.0 附近に至適 pH をもつアルカリ性プロテナーゼが存在することである。著者等の用いた小腸粘膜は胃の下部約 50 cm の部分であるためこれらの両プロテナーゼは一つは胃粘膜起源のプロテナーゼであろうと考えられる。

ロイシンアミノペプチダーゼに関しては4つの臓器から抽出した酵素力を比較検討した結果，腎臓の場合最も強い活性を示し小腸粘膜，膵臓，胃粘膜の順序で活性は

低下した。特に興味深いことは胃粘膜において L-Leu-ucyl- $\beta$ -naphthylamide に対する活性を検出し該酵素が  $Mg^{++}$ ， $Mn^{++}$ ，および  $Co^{++}$  により活性が促進されることを見出した。以下これらの結果について報告する。

### II 実験方法

#### (1) 試 料

屠殺直後の豚の胃粘膜，小腸粘膜，腎臓および膵臓を用いた。

#### (2) 酵素液の調製

①豚胃粘膜：胃を切り開き内壁を氷冷水を用いて軽く洗い，スライドグラスで粘膜をはぎとり，これに冷 M / 15 磷酸緩衝液（pH 7.0）を粘膜重量の 10 倍量加えて，ミキサーで処理後，磨砕液を遠心分離（10,000 r. p. m.，15 分間，0℃）を行い，その上澄液を粗酵素液として用いた。

②豚小腸粘膜：胃の末端部より約 50 cm の小腸の部分を取り，切り開いて氷冷水で軽く水洗し，内壁粘膜をスライドグラスではぎとり，ピーカーに集めてこれに冷 M / 15 磷酸緩衝液（pH 7.0）を粘膜重量の 3 倍量加えてミキサーで処理後，磨砕物を遠心分離（10,000 r. p. m.，15 分間，0℃）してその上澄液を用いた。

③豚腎臓：腎臓の脂肪組織を取り除き，残りの部分を細かく切り試料重量と等量の M / 15 磷酸緩衝液を加えてミキサー処理後，磨砕液を遠心分離（10,000 r. p. m.，15 分間，0℃）した上澄液を用いた。

④豚膵臓：膵臓に附着した脂肪部分を取り除き，冷水で軽く水洗して細かく切り試料重量と等量の M / 15 磷酸緩衝液を加えてミキサーで処理後，磨砕液を直ちに遠心分離（10,000 r. p. m.，15 分間，0℃）を行いその上澄液を用いた。

#### (3) 基質緩衝液の調製

\* 福島県立会津短期大学

①プロテナーゼの場合

基質：ハンマーステンのミルクカゼイン（メルク社製）および卵アルブミン（半井化学製）を用いたが、主として前者を用いて実験を行った。基質の濃度は1.0%とし、緩衝液は主としてM/15 磷酸緩衝液を用いたが必要に応じて醋酸ナトリウム・塩酸液、Tris-HCl緩衝液、炭酸ナトリウム・重炭酸ナトリウム緩衝液を用いた。緩衝液の終濃度は0.1Mになるように基質緩衝液を調製した。

②ロイシンアミノペプチダーゼの場合

基質： $L$ -Leucyl- $\beta$ -Naphthylamide·HClを $10^{-4}$ Mになるよう水で溶解して使用した。緩衝液は0.1M-Tris-HCl 緩衝液pH8.0を使用した。

(4) 酵素活性の測定法並びに酵素活性の表示法

①プロテナーゼの場合

Anson 法を主体とする萩原の考案した Casein Folin 呈色B法を若干改良した測定法を用いた。

測定法：反応用と対照用の2本の試験管を用意して、それぞれに基質緩衝液1mlを分注し、40℃の恒温水槽中に5分間保った後、反応用の基質緩衝液に酵素液をよく混合する。混合した時から正確に30分間恒温水槽中に保って消化させた後、蛋白質沈殿試薬<sup>3)</sup>2mlを加えてよく混合し、再び40℃の恒温水槽に30分間保ち、蛋白質沈殿試薬による沈殿の生成が完了すれば遠心分離（3000 r. p. m., 15分間）して上澄液を用いる。一方対照用の基質緩衝液と酵素液は混合せずにそのまま同時保った後、蛋白質沈殿試薬2mlを酵素液に加えてからよく混合して反応用試験管と同じく処理する。

上記の上澄液2mlを内容約20mlの試験管に分取し、0.55M  $Na_2CO_3$  5ml次に $\frac{1}{3}$ Folin 試薬1ml宛を添加後直ちに振盪する。その後同時に30℃の恒温水槽につけて30分間放置して660nmの波長で吸光度を測定する。

酵素活性表示法：クロシンを用いて標準曲線をえがきこれより吸光度当りのクロシン含量を求める。

すなわち、吸光度当りのクロシン含量  $32 \gamma/ml$ である、30分間反応時の係数は

$$32 \gamma \times \frac{4 \times \frac{8}{2}}{30 \times 181.19} \times \frac{1}{0.5} = \frac{512}{2717.85}$$

測定された吸光度  $\times 0.19 \times$  希釈倍率  $\times \frac{30}{\text{反応時間}}$   
= 酵素単位/ml

②  $L$ -Leucyl- $\beta$ -naphthylamide 水解酵素の場合

松谷<sup>5)</sup>の方法を改良した児玉<sup>6)</sup>の方法にしたがった。

すなわち、反応用試験管を用意して、基質0.1mlと緩衝

液を0.4mlずつ分注し、40℃の恒温水槽中に5分間保った後、基質緩衝液に酵素液0.1mlをよく混合し、ただちに0.2mlの反応液を取り出し他の試験管に前以って0.2N HCl 0.2mlに加え反応を停止させる。各々の反応停止液にp-DACA溶液2.5mlを加えて10~15分間室温放置後、540nmの吸光度を測定する。

酵素活性表示法： $\beta$ -naphthylamineを用いて標準曲線をえがき、その吸光度1当りの $\beta$ -naphthylamineは23.5 $\mu g/ml$ となる。

従って測定吸光度  $\times \frac{23.5}{143.18} = \mu mole/ml$  となり生成された $\beta$ -naphthylamineの生成量に相当する。

そこで測定された吸光度  $\times 0.96 \times$  希釈倍率  $\times \frac{1}{\text{反応時間(分)}} = \mu mole/ml$  of Enzyme

なお、酵素蛋白質の測定はLowry<sup>7)</sup>の方法により行った。

すなわち、Bovine serum albumin(SIGMA社製)の標準曲線より吸光度当りの蛋白質含量を求める。その計算は、

測定された吸光度  $\times 300 \times$  希釈倍率 =  $\mu g/ml$

比活性の計算：

$$\text{比活性} = \frac{\text{Unit/ml}}{\text{mg/ml}} = \frac{\text{Unit}}{\text{mg}}$$

(5) 酵素に対する各種試薬の影響に関する試験法

①試薬

i Diisopropyl fluorophosphate (DFP)

添加量はすべて $10^{-3}$ Mまたは $10^{-4}$ Mの終濃度になるように行った。

DFPはイソプロパノールに溶解してM/100 DFPを調製した。

ii p-Chloromercuri benzoic acid(PCMB)  
N/10 NaOHで溶解しpH7になるようM/100 PCMBを調製した。

iii Mono iodo acetic acid(MIA)

iiと同じ方法でM/100 MIAを調製した。

iv Sodium lauryl sulfate(SLS)

とくにpH調製をすることなくM/100 SLSを調製した。

v Ethylene diamine tetraacetate (EDTA)

N/10 NaOHでpH7に調製した。 $\frac{M}{100}$  EDTAを調製した。

vi  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $ZnCl_2$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

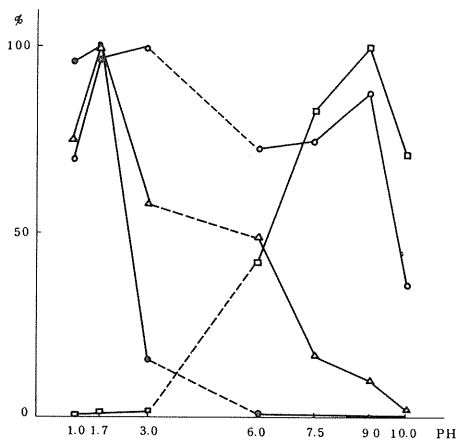
いずれもM/100溶液を調製して使用した。

金属イオンの影響を試験する場合は, 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 0.39 ml に金属イオンを 0.01 ml を加えて, これに酵素液を 0.1 ml を添加した後常法により試験を行った。

### III 実験結果と考察

#### (1) プロテナーゼの場合

豚の臓器のミルクカゼイン水解酵素の pH 別活性曲線をもとめた。



第 1 図 豚の臓器のミルクカゼイン水解酵素の pH 別活性曲線

- : 胃粘膜
- : 小腸粘膜
- △-△-△: 腎臓
- : 膵臓
- : 基質の等電点の関係で測定しない

各 pH 別最高数値を 100 とした場合

測定条件: ミルクカゼイン濃度 1% (反応混液中濃度 0.5%) を含む 0.1 M 緩衝液, 40°C, 30 分間消化

第 1 図によると胃粘膜では至適 pH 1.7 をもつ酸性プロテナーゼ (ペプシン), 膵臓では pH 9.0 に至適 pH をもつアルカリ性プロテナーゼ (トリプシン), 腎臓では pH 1.7 付近に至適 pH をもつ酸性プロテナーゼ (カテプシン D) を認めた。特に小腸粘膜の場合には pH 1.7 ~ 3.0 付近に至適 pH をもつ酸性プロテナーゼと pH 9.0 付近に至適 pH をもつアルカリ性プロテナーゼが存在することは興味ある事実である。これらのうちの一つは当然膵臓から分泌された trypsin と考えられる。他の

一つは胃粘膜より分泌されたプロテナーゼであろうと推察される。

このプロテナーゼによるミルクカゼインと卵アルブミンの水解活性を比較した結果は第 I 表に示した。

第 I 表 豚の各臓器のプロテナーゼによるミルクカゼインと卵アルブミンの水解活性の比較

酵素	基質	作用 pH	Unit/mg	活性比 (%) <sup>※</sup>
胃粘膜	ミルクカゼイン	1.7	2.74	100
	卵アルブミン	#	0.10	4
小腸粘膜	ミルクカゼイン	9.0	0.09	100
	卵アルブミン	#	0.01	6
腎臓	ミルクカゼイン	1.7	0.10	100
	卵アルブミン	#	0.01	10
膵臓	ミルクカゼイン	9.0	10.90	100
	卵アルブミン	#	0.05	0.5

基質濃度: 1%

緩衝液: pH 1.7 0.1 M Na Acetate-HCl  
pH 9.0 0.1 M Tris-HCl

40°C, 30 分間消化

※活性比はミルクカゼインの水解初速度を 100 とした。

ミルクカゼインは理想的蛋白質である卵のアルブミンより容易に水解され, 水解度の比は 100/0.5 ~ 10 であった。この結果は基質として用いた蛋白質の純度にもよるが, 卵アルブミンの場合特に変性の程度により消化分解に著しい差があることがすでに報告されているが, この実験では native 卵アルブミンのために特に水解され難いものと考えられる。

第 II 表 豚の臓器のプロテナーゼ活性におよぼす各種試薬の影響

酵素 pH	残 存 活 性 (%)				
	胃粘膜	小腸	膵臓	腎臓	膵臓
試薬	1.7	3.0	9.0	1.7	9.0
none	100	100	100	100	100
PCMB	71	46	62	56	94
MIA	92	66	84	70	86
SLS	96	74	85	63	16
EDTA	87	105	87	95	64
DFP	94	104	75	94	32

各種試薬の添加量： $10^{-3}M \sim 10^{-4}M$ の最終濃度になるようにし、10分間 incubate した後、酵素活性を測定 40℃、30分間消化

略号：PCMB:p-Chloromercuri benzoic acid  
 MIA:Monoiodo acetic acid  
 SLS:Sodium Laurylsulfate  
 EDTA:Ethylene diamine tetraacetate  
 DFP:Diisopropylfluoro phosphate

第II表は各臓器のプロテナーゼ活性におよぼす2,3の試薬の影響について調べた結果である。

この表から膵臓のプロテナーゼ活性がDFPにより顕著な阻害を示したことから、膵臓に含まれる代表的プロテナーゼであるトリプシンの性質をよく一致することが判った。

またSLSが膵臓プロテナーゼを著しく阻害した結果を得たが、その他の試薬の影響については顕著な差は見出されなかった。

(2) L-Leucyl-β-naphthylamide水解酵素の場合

第III表 豚の各臓器の L-Leucyl-β-Naphthylamide 水解活性

酵 素	活 性 (Unit/ml)	酵素蛋白量 (mg/ml)	比 活 性
胃 膜	0.016	2.844	0.006
小腸粘膜	1.416	19.800	0.072
腎 臓	5.952	40.500	0.147
膵 臓	0.840	44.400	0.019

基質濃度： $10^{-4}M$   
 緩衝液：0.1M Tris-HCl, pH8.0  
 40℃消化

第III表は各臓器から抽出した粗酵素液を用い、Leucyl-β-naphthylamide を基質とした場合の水解活性を調べた結果である。この結果から Leucyl-β-naphthylamide に対する活性は腎臓において最も強く次いで小腸粘膜、膵臓、胃粘膜の順序であった。

いわゆるロイシンアミノペプチダーゼは腎臓、小腸粘膜、膵臓等に存在することはすでに多数の報告があるが、胃粘膜では現在まで検出された報告はない。

第III表から明らかなように胃粘膜のLNAに対する酵素活性は微弱ながら存在することを発見し、しかもこの酵素が第IV表で示したように $Mn^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Co^{++}$ により活性が促進されることを見出した。

第IV表 豚の各臓器の L-Leucyl-β-naphthylamide 水解活性におよぼす各種金属イオンの影響

酵 素 金属イオン	相 対 活 性 (%)			
	胃 粘 膜	小腸粘膜	腎 臓	膵 臓
none	100	100	100	100
$MnCl_2$	147	91	88	90
$MgCl_2$	147	95	91	96
$CoCl_2$	147	115	113	109
$ZnCl_2$	47	8	10	16
$CaCl_2$	33	88	84	95

基質濃度： $10^{-4}M$   
 緩衝液：0.1M Tris-HCl, pH8.0  
 40℃消化

胃粘膜に存在する本酵素の詳細な性質については今後検討すべき興味ある問題であろう。

本研究の遂行にあたり助言をいただいた赤塚尹巳教授ならびに実験に協力された児玉治氏に対し感謝の意を表します。

文 献

- 1) Patterson, E. K. Hsiao, S. H., and Keppel, A., J. Biol. Chem., 238, 3611 (1963)
- 2) Anson, M. L., J. Gen. Physiol., 22, 79 (1938)
- 3) Hagihara, B., Matsubara, H., Nakai, M., and Okunuki, K., J. Biochem., 45, 185 (1958)
- 4) 赤堀四郎編, 酵素研究法第2巻, 242頁(1951)
- 5) Matutani, M., Takehisa, M., Hukanami, R., Shimatsu, A. and Kikukawa, A. : Rinshokensa, 11, 92 (1967)
- 6) Kodama, O., Sugawara, K. and Ouchi, T. : Scientific Reports of the Faculty of Agriculture Ibaraki University, 20, 31 (1972)
- 7) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Randall, R. T., J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

### Summary

This study has described a comparative investigation of the properties and specificities of proteinases and peptidase in swine stomach mucosa, intestinal mucosa, pancreas and kidney.

From the results of these experiments, acid proteinase (pepsin) from stomach mucosa, alkaline proteinase (trypsin) from pancreas, acid proteinase (cathepsin-D) in kidney and trypsin and pepsin like enzyme in intestinal mucosa were confirmed.

Among two intestinal proteinases which are able to hydrolyze milk casein, an alkaline proteinase, is due to pancreas, and another acid proteinase will be due to stomach mucosa.

L-Leucyl- $\beta$ -naphthylamide hydrolase was confirmed in swine stomach mucosa, intestinal mucosa, pancreas and kidney. The hydrolase from stomach mucosa was found for the first time in this experiment and the activity of this enzyme was accelerated by the addition of  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  and  $Co^{++}$ .