mol で抽出しペーパークロマトグラフ法で検すると xylotriase の spot より下方に帯状の呈色が顕れる。

WHISTLER 等の charcoal chromatography を簡素化したクロマト柱を使用しない活性炭-活性アルミナ混合物に依る吸着-溶出法は, glucoxylan の加水分解中間産物の分別に可成り良結果を得たが, ペーパークロマトグラフ法で目的物以外の他の糖の混在を検出来ない程完全に 3 者を分別することは困難のようである。しかしこの操作を 3~4 回繰返す方法に依つて分別能を高めることが出来, それぞれの加水分解中間糖を分別結晶化することが出来た。即ち前記の様にして得られる各 filtrate から ethanol を追出したものについて再び同様な操作を繰返し最後に得られる醗液を減圧濃縮シラップ状とした単一糖液に 2~3 倍容の温乾燥エタノール (微醋酸酸性) を加えて冷室に保てば xylose, xylobiose, xylotriase のそれぞれが結晶する (Fig. 5, 6, 7 参照)。これを濾取, 冷エタノールで洗滌後乾燥し m. p. を測定した結果はそれぞれ 145°, 186°, 204° で, 純粋の xylose, xylobiose, xylotriase と混融するも m. p. の降下は認められなかつた。

摘 要

1. 山吹瀝から冷 5% NaOH 液で抽出される多糖類は, glucose と xylose のモル比が 1:35~36 から成る glucoxylan の 1 種である。
2. Glucoxylan の加水分解中間産物を検索し, その中 xylotriase, xylobiose 及び xylose を結晶状に分離確認した。

(1) 水野, 林: 農化, 28, 921 (1954).

(3) R. L. WHISTLER: *J. Ame. Chem. Soc.*,

(2) R. L. WHISTLER, D. F. DURSO *J. Ame. Chem. Soc.*, 72, 677 (1950).

73, 1389 (1951).

Summary

1. A kind of glucoxylan that consists of one part of glucose and thirty five to thirty six parts of xylan was isolated from the cold 5% NaOH extract of the pith of *Kerria japonica* DC.
2. From the hydrolysates of imperfect hydrolysis of this glucoxylan by 1% H₂SO₄, xylotriase, xylobiose and xylose were isolated in the crystal form.

栄 養 素 組 成 と 体 蛋 白 質 の 代 謝 (第 1 報) 蛋白質含量と Xanthine Oxidase Activity

村松敬一郎, 矢野俊子, 芦田 淳 (名古屋大学農学部食品栄養化学教室)

昭和 29 年 8 月 30 日 受 理

Composition of Nutrients and Metabolism of Tissue Protein. Part 1. Relation
Between the Amounts of Dietary Protein and Xanthine Oxidase Activity.

By Keiichiro MURAMATSU, Toshiko YANO and Kiyoshi ASHIDA (Nagoya University,
Faculty of Agriculture, Laboratory of Food and Nutrition Chemistry)

白鼠のような試験動物を用いる栄養試験に於て, 体重増加による栄養価値の判定は古くから用いられ現在でも尙価値ある方法の一つとされている。一方体内代謝より栄養価値を判定する事も試みられ, 体成分排泄物の分析による方法, 吸入酸素量と排泄炭酸ガス量から発生熱を測る方法も採られてきた。近時は体内酵素の activity を測定する方法もこの目的に利用されつつある。

著者等は体内代謝より栄養素要求を定めようとする目的で, 先ず体内に於ける代謝が酵素作用によつて行われている事実に基づき, 栄養素組成と酵素の activity との関係を検べることにした。

食物組成の中特に蛋白質量の体内諸酵素の activity に及ぼす影響については既に数多くの報告がみられる。LIGHTBODY 等⁽¹⁾ は白鼠につき飼料の蛋白含量を変えた場合の肝臓中の arginase activity を測定し, 低蛋白食によつてその activity の減少することを知り, MILLER^(2,3) は白鼠を飢餓にした場合, 低蛋白食及び無蛋白食を与えたときの肝臓の諸酵素の activity を測定し, catalase, xanthine oxidase, cathepsin 及び arginase 等の減少することを見, 殊に xanthine oxidase において著しいことを認めた。Xanthine oxidase activity と摂取蛋白質量との関係については MILLER の研究の外, MAC QUARRIE 等⁽⁴⁾, WESTERFELD 等^(5,6), BASS

等⁽⁷⁾, WILLIAMS 等⁽⁸⁾, LITWACK 等⁽⁹⁾ 及び WAINIO 等⁽¹⁰⁾ の研究があり, 低蛋白食でこの酵素 activity は著しく減少するか或いは完全に消失する特異的なものであることが明らかにされている。

更に摂取アミノ酸の種類と xanthine oxidase activity の関係についても WILLIAMS 等^(8,11,12) や LITWACK 等⁽¹³⁾ によつて研究され, WILLIAMS, ELVEHJEM は methionine の欠乏食で xanthine oxidase activity の完全に消失することを認め, この酵素 activity を飼料中のアミノ酸の価値判定に利用出来ると述べている。又 MILLER⁽³⁾ は酵素 activity は摂取蛋白質の量と共にその質に関係のあることを記し, LITWACK, ELVEHJEM 等^(13,14,15) は飼料蛋白質の質と liver xanthine oxidase activity の間に相関関係のあることを見出した。即ち各種蛋白質が一定の%に含まれる飼料で飼つた鼠の肝臓の xanthine oxidase activity は蛋白質の栄養としての良否と比例することを認め, 実際にその判定に利用されることを明らかにした。かくして LITWACK, WILLIAMS 等によつて初めて体内酵素の activity が栄養学に利用されるに至つた。

著者等は酵素の activity から飼料蛋白質の適切な摂取量を求める事が出来るのではないかと考え, 核蛋白質の代謝に関係があり, しかも特に飼料蛋白質に鋭敏な xanthine oxidase をここに選び, 摂取蛋白質量との関係を明らかにしようと試みた。

実 験 の 部

蛋白質含量の異なる飼料で一定期間飼つた白鼠の肝臓の xanthine oxidase activity を測定し, 飼料蛋白質量と酵素 activity との相関性を求めた。

供試動物と飼料

生後 2.5 カ月, 体重 180 g 位の Wistar strain の雄白鼠 18 匹を使用した。1 匹宛を

Table 1. Composition of Stock and Experimental Diets.

Ingredient	Stock	Experimental					
		I	II	III	IV	V	VI
Casein ⁽¹⁾	20	0	15	30	40	60	80
Starch ⁽²⁾	70	90	75	60	50	30	10
Oil ⁽³⁾	5	5	5	5	5	5	5
Salts ⁽⁴⁾	4	4	4	4	4	4	4
Vitamins ⁽⁵⁾	1	1	1	1	1	1	1

(1) Milk casein (Kishida Chemicals & Co. Ltd.).

(2) Corn starch.

(3) Cotton seed oil.

(4) Salts IV. HEGSTED et al., *J. Biol. Chem.*, 138, 459 (1941).

(5) Vitamin Starch. Contained following mg of vitamin to 1 kg of diet :
thiamine HCl 10, riboflavin 10, pyridoxine 20, calcium pantothenate 30, niacin 25, choline chloride 1000, menadione 4, inositol 100, biotin 0.4, folic acid 2.

Each animal was received two drops of cod liver oil per week.

1 つの飼育籠に入れ, casein 20% を含む基礎飼料を 7 日間与えてから 3 匹宛を 1 群として蛋白質含量の異なる実験飼料で 18 日間飼育した。実験飼料は casein 0, 15, 30, 40, 60 及び 80% を含む 6 種類のものでこれらの組成を基礎飼料の組成と共に Table 1 に示した。飼料はこれにはほぼ同量の水を加えて捏り, 澱粉が糊化する程度に軽く加熱したものを毎日水と共に充分量与えた。実験飼料を与えはじめてから毎日その消費量を測り, 3 日毎に体重を測定し, 飼育後 18 日目に各区白鼠の肝臓の xanthine oxidase activity を測定した。

Xanthine oxidase activity の測定 肝臓中の xanthine oxidase activity を測定する方法としては Warburg の検圧計を用い xanthine の酸化に消費さ

れる酸素量を求める AXELROD, ELVEHJEM⁽¹⁶⁾ の方法, endogenous respiration 中の xanthine oxidase を pteridylaldehyde で抑えて測定するこれの改良法⁽¹⁷⁾, Thunberg 管を用い methylen blue の脱色時を測定する方法⁽¹⁸⁾, 及び xanthine の尿酸への酸化により 290 mμ に於ける吸収の増加する事実を利用し spectrophotometer で定量する方法⁽¹⁹⁾ 等があるが, 最近 LITWACK 等⁽²⁰⁾ は未反応の xanthine を比色法で測定し良好な結果を得ている。

著者等は先ず AXELROD, ELVEHJEM の検圧法を検討したが基質 xanthine を加える前に 40 分間振つて endogenous respiration を或る程度消散させる彼等の方法は, RICHERT 等⁽²¹⁾ も認めたように酵素 activity の低い homogenate の場合には尙不充分であり, 著者等は更に少く共 30~40 分空振りする必要のあることを知つた。又これに関連して基質 xanthine の濃度も同時に問題で, activity の低い homogenate を用いた時には AXELROD 等が適当だとした 0.0075 mM/flask の xanthine 濃度でさえ往往それによる阻害の現われることを知り, 0.0038 mM/flask の xanthine 量を使用するのが適切であることを認めた。

この条件で予め肝臓の外, 腎臓, 脾臓, 胃, 小腸, 肺臓, 心臓等の種種な器官及び筋肉等の homogenate につき酵素 activity を測つてみたが, 肝臓以外の組織では全く定量されないか或は極めて微弱な activity を示すに過ぎなかつたので専ら肝臓の activity のみを対照にして実験を行つた。

尙検圧法と平行的に LITWACK 等の方法を参考にして比色法による定量を併せ実施したが次に両法につき実験条件の概略を記す

i) 検圧法: 鼠を殺後、直ちに肝臓を摘出し附着する血液を濾紙で吸取り、全量を計量後その 1 部を秤取りし、これに 0.039 M, pH 7.4 の phosphate buffer の冷溶液 5 倍量を加え、homogenizer にかけ、ガーゼで濾した homogenate 1.7 cc を Warburg flask の主室にとり、側室に 0.0125 M の xanthine 溶液* 0.3 cc, 副室に 20% KOH 溶液 0.2 cc を入れ濾紙片を挿入し、37° で 80 分間 incubate 後基質 xanthine と homogenate を合し、20 分毎に 60 分間酸素の吸収量を測定した。側室に 0.05 N NaOH 溶液をとつたものを対象として homogenate の endogenous respiration による酸素消費量を測定し、前者からこの値を差引き実際に xanthine の酸化に要した酸素量を求めた。定量は全て duplicate に行い、肝臓 (wet) 1 g が 1 時間に消費する酸素量 (μ l) を以て、その unit activity とした。

ii) 比色法: 前記の homogenate 1.7 cc を Warburg flask の主室に、0.025 M の xanthine 0.3 cc を側室に入れ、37° で 80 分間 incubate 後、両液を合し更に 60 分間振盪作用させてから直ちにその 1 cc を採つて、40% タングステン酸曹達溶液 1 cc, 蒸溜水 5 cc, 及び 2 N H_2SO_4 1 cc を含む溶液に加えて全液を 10 cc に満し、沈澱した蛋白質を遠心分離して除き、この上澄液 1 cc に FOLIN phenol 試薬⁽²²⁾ (水で 1:1 に稀釈したもの) 5 cc, 飽和炭酸曹達溶液 5 cc を加えて発色させ、670 m μ の filter を用い光電光度計 (日立製 EPO-A 型) で比色定量した。xanthine の代りに 0.05 N NaOH 溶液を加えたものを対照として同時に測定し、本試験の値から差引き残存する xanthine 量を求め、これかれ消費 xanthine の mg 量を計算した。1 mole の xanthine の allantoin への酸化には 1 mole の酸素が消費されるので、ここでは消費した xanthine 量に相当する酸素量 (μ l) を求め、検圧法で得られた値と直接に比較した。標準曲線は xanthine の 9.5~95 γ 範囲にとつて作つたが、吸光度と xanthine 濃度とは直線関係をなした。

実験結果及び考察

飼料蛋白質と体重との関係を Fig. 1 に、蛋白質量と xanthine oxidase activity との相関性を Fig. 2 に示し、Table 2 にこれらの結果を総括し、検圧法と比色法によつて得られた酵素 activity の値を比較的に掲げ且つ各区間の有意性 (t-test の結果) を記した。

Fig. 1. Change of Average Body Weight of Rats on Diets containing Varying Amounts of Protein.

Fig. 2. Effect of Levels of Dietary Protein on Liver Xanthine Oxidase Activity

Curve I = Unit activity

Curve II = Total activity/ $W^{0.75}$

Unit activity was expressed as μ l of oxygen uptake at 37° due to added substrate (0.0038 mM Xanthine/flask) per hour per gram of wet liver. The substrate was tipped in after preincubation of 80 minutes.

Curve II was expressed as total activity μ l O_2 /hr./wet total liver g. at 37° related to metabolic mass ($W^{0.75}$).

蛋白質量と体重の変化 無蛋白食 (casein 0%区) の鼠は体重の維持が出来ず減少の一途を辿つたが、casein 15%区以上のものでは蛋白質量が増しても体重の増加に大した変化はみられず、casein 30% から 60% 区では

* L. Light 製のものをを用い、0.05 N NaOH に加温溶解せるもの

Table 2. Protein Levels and Liver Xanthine Oxidase Activity

No.	Diets Casein %	No. of rats	Body weight at operation g.	Change of initial body weight %	Average food con- sumption g/rat/day	Liver weight g	Xanthine oxidase activity				
							Unit activity O ₂ μl/hr./g liver	Diff.	Total acti- vity O ₂ μl/ hr/total liver g	Total activity/ W ^{0.75}	Diff.
I.	0	3	185±28 ^a	-18.7±1.0	20	5.8±0.2	b. — ^d		—	—	
							c. —		—	—	
II.	15	3	316±26	28.2±9.4	28	13.0±1.1	b. 183±18		238±22	154±8	
							c. 178±17		230±50	149±12	
							227±39	(III—II)			(III—II)
III.	30	3	289±13	22.1±2.0	26	11.1±2.8	b. 44*		254±66	167±42	13*
							c. 250±4	72**	277±48	181±17	32**
							216±13	(IV—II)			(IV—II)
IV.	40	3	279±33	19.9±9.2	25	11.2±2.0	b. 33*		243±28	159±25	5*
							c. 257±19	79**	302±42	197±20	48**
							244±26	(V—II)			(V—II)
V	60	3	283±28	23.0±7.8	23	12.0±1.9	b. 61**		296±65	194±47	40*
							c. 269±28	91**	306±73	199±30	50**
							234±21	(VI—II)			(VI—II)
VI.	80	3	260±4	11.7±1.4	23	11.7±1.2	b. 51**		272±39	179±30	25*
							c. 253±37	75**	273±36	195±38	46**

a. Standard deviation

b. Data by manometric method.

c. Data by colorimetric method.

d. "zero" level.

t-test { * = not significant (P ≥ 0.05)
** = significant (P = 0.05)

ほぼ一定の増加率を示したが、これ以上高蛋白食を与えた場合 (80%区) には増加率に於てやや劣る傾向を示した (15%区に対し危険率 5% 有意差あり), 又飼料の消費量も大体, 体重の増加に平行的にその増減がみられた。

蛋白質量と Xanthine Oxidase Activity Fig. 2 は xanthine oxidase の unit activity の平均値と, 肝臓全量に対する total activity を metabolic mass ($W^{0.75}$: w は体重) で除した平均値を飼料蛋白質含量に対して各 plot して得た curve であるが, 体の代謝量は体重に比例せず, 体表面積及び metabolic mass に比例するという事実から後者の値は体の全代謝量に対する酵素 activity の変化を表わしているものと見做される。

Fig. 2 で明らかなように飼料蛋白質含量によつて xanthine oxidase の activity は非常に影響を受け, 特に無蛋白食ではその activity は検圧法でも比色法に於ても定量にからず, 全く肝臓から消失することが認められた。そして酵素 activity は蛋白質含量が増すにつれ大となるが casein 30% 位のところでほぼ一定し, それ以上の蛋白食を与えても殆ど activity の値は変動を示さないことがわかつた。Unit activity についてみると検圧法で得られた値では casein 15% と 30% 区間に於て有意差は無かつたが, 比色法での値では両者間に有意の差 (危険率 1%) のあることが認められた。しかし 30% 以上の区間では全く有意差はみられなかつた。次に metabolic mass に対する値 (Total activity $W^{0.75}$) に於ては比色法で 15% と 30% 区間に有意差 (危険率 5%) がみられたのみで, 0% 区を除けば unit activity の場合と同様殆ど変化を示さなかつた。

WILLIAMS 等⁽¹²⁾ は 6% の低蛋白食で, BASS 等⁽⁷⁾ は 8% の casein level で xanthine oxidase activity が正常値の 1/10 位に減少することを観察し, MILLER⁽³⁾ は 6% の casein 食でこの酵素 activity の激減することに注目し, LITWACK 等⁽⁹⁾ は 48% 時間無蛋白食を与えただけで酵素 activity は 24% 程減少, 5 日間で殆ど定量されないほどになることを, 又 MEICKLEHAM 等⁽²³⁾ は無蛋白食或は 8% の casein 食で肝臓の蛋白質が減少したとき酵素 activity は全く消滅することを報告している。更に LITWACK 等⁽¹⁴⁾ は casein 量を変えた場合の xanthine oxidase activity を測定して蛋白質量の増加に伴いその activity の増すことを報じているが casein 30% 以上のものについては実験していない。以上の研究の外にもこれに類した報告が幾つか発表されているが, 従来の大半の研究は標準食と低蛋白食並びに無蛋白食間について酵素 activity を比較測定しているものが殆どで深く検討された報告に接しない。

著者等は無蛋白食から高蛋白食に亘つて種々な割合に飼料中の蛋白含量を変えて, これと xanthine oxidase activity との関係を検べた結果, 多くの今迄の研究発表にみられるように無蛋白食で完全に該酵素 activity は除かれ定量にからなくなることを確かめ, 更に酵素 activity は飼料蛋白質含量が多くなるにつれ大となり, ついには一定の level に達し, それ以上蛋白量を増しても顕著な変化を示さず, この level に達する点が大体 casein 含量の 30% 附近にあることを明白にした。

肝臓の蛋白質量が飼料蛋白質に敏感なことは ADDIS⁽²⁴⁾ をはじめ古くから多くの研究者に認められており, CAMPBELL 等⁽²⁵⁾ によつて飼料蛋白質の質の測定に应用されている程であるが, 肝臓の xanthine oxidase activity は肝蛋白質量より更に飼料蛋白質に鋭敏で, 肝蛋白質の消耗に先立つてその activity の減少のみられる事実が示されている⁽⁹⁾. これらの事柄と著者等の実験結果からして少く共 xanthine oxidase activity の一定の level を維持するだけの蛋白質量を摂取する必要があるのではないかと推定される.

終りに御援助を頂いた当科生物化学教室の諸氏, 白鼠の飼育及び解剖の指導を頂いた当学部畜産科の近藤, 保田両助教授に深謝いたします. 尚飼料の分与を受けた日本配合飼料, 吉原製油並びに日本食品の各会社に御礼申し上げます.

(本報告は昭和 29 年 4 月, 日本農芸化学会大会で発表したものの 1 部である)

(1) H.D. LIGHTBODY et al. <i>J. Biol. Chem.</i> , 129, 71 (1939).	(14) G. LITWACK et al. : <i>J. Nutrition</i> , 47, 299 (1953).
(2) L.L. MILLER : <i>J. Biol. Chem.</i> , 172, 113 (1948).	(15) G. LITWACK et al. : <i>J. Nutrition</i> , 49, 579 (1958).
(3) L.L. MILLER : <i>J. Biol. Chem.</i> , 186, 253 (1950).	(16) A.E. AXELROD, C.A. ELVEHJEM : <i>J. Biol. Chem.</i> , 140, 725 (1941).
(4) E.B. MACQUARRIE et al. <i>Science</i> , 101, 493 (1945).	(17) J.C. VAN METER et al. <i>J. Biol. Chem.</i> , 187, 91 (1950).
(5) W.W. WESTERFELD et al. : <i>Proc. Soc. Exp. Biol. Med.</i> , 71, 181 (1949).	(18) F.H. FIGGE et al. : <i>Cancer Res.</i> , 1, 779 (1941).
(6) W.W. WESTERFELD et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 184, 163 (1950).	(19) H.M. CALKER et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 167, 429 (1947).
(7) A.D. BASS et al. : <i>Proc. Soc. Exp. Biol. Med.</i> , 73, 687 (1950).	(20) G. LITWACK et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 200, 303 (1953).
(8) J.N. WILLIAMS et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 181, 559 (1949).	(21) D.A. RICHERT et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 181, 255 (1949).
(9) G. LITWACK et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 187, 605 (1950).	(22) O. FOLIN, V. CIOCALTEU : <i>J. Biol. Chem.</i> , 73, 628 (1927).
(10) W.W. WAINIO et al. : <i>J. Nutrition</i> , 49, 386 (1949).	(23) V. MEIKLEHAM et al. <i>J. Biol. Chem.</i> , 192, 651 (1951).
(11) J.N. WILLIAMS et al. : <i>Proc. Soc. Exp. Biol. Med.</i> , 72, 386 (1949).	(24) T. ADDIS et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 115, 111, 1117 (1936); 116, 343 (1936).
(12) J.N. WILLIAMS et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 183, 539 (1950).	(25) R.M. CAMPBELL et al. : <i>J. Physiol.</i> , 107, 383 (1948).
(13) G. LITWACK et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 201, 261 (1953).	

Summary

Relation between the amounts of dietary protein and enzyme activity was examined by using albino rats. Casein fed as the source of protein at levels of 0, 15, 30, 40, 60 and 80 per cent in the diet for eighteen days. Liver xanthine oxidase which is considered to be related with the metabolism of nucleoprotein was chosen for the enzyme of this experiment.

The enzyme activity was measured by a modification of manometric method of AXELROD-ELVEHJEM and colorimetric method of LITWACK et al. A correlation has been found between these methods.

The results showed that the enzyme response was very sensitive to changes in the content of protein in diets and depleted to "zero" levels at the protein free ration (Table 2).

From the values of enzyme activity which was plotted against the level of dietary protein (casein) fed, we found that xanthine oxidase activity was increased according to the amount of protein, but no change took place in greater amount than about 30 per cent protein in diet (Fig. 2).

The authors suggested that feeding of dietary protein which maintained the stationary level of xanthine oxidase activity was required.