皮組織の成分及び鞣性の変化に関する研究 (第 11 報)*

脱毛皮の性質に及ぼす膵臓中の蛋白分解酵素の影響

佐 藤 泰*, 中 村 良** (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 34 年 2 月 11 日 受 理

I. 緒 言

皮革製造のベーティング工程で蛋白分解酵素が石灰脱毛皮の諸成分に対し作用する状態については前報⁽¹⁾に報告した通りであるが、その実験結果から考察しても、各蛋白質成分の選択消化が困難であることは明かである。

従ってベーティングの総合効果については経験的にも試験研究的にも種々の知見が報告されているが、個々の蛋白質成分の消化溶出が脱毛皮の性質に及ぼす影響については実験も困難であり基礎的な報告もない。

脱毛皮に存在する蛋白質成分のうちエラスチンは存在する量が少いの皮組織の性質に大きな影響をもっていることが経験的に知られているし、コラーゲンは革となる主成分蛋白質であるから、これが一部の消化をうけると皮組織の性質に影響を及ぼすことも充分考えられる。またベーティングにおいては量の多少にかかわらず、2成分が消化をうけるものと考えられるし、2成分が全く化学的結合なしに互に無関係に皮中に存在し互に無関係に消化をうけることも断言できない。

前報⁽¹⁾において膵臓中の蛋白分解酵素をエラスチンの消化力を異にする2区分に分別できること及びそれらの作用について述べた。よって著者等はこの2区分の酵素を皮組織に作用させて、エラスチン或いはコラーゲンの消化量の異なる皮を調製し、それらの消化量がタンニン酸吸着に及ぼす影響について実験考察した。次にその結果を報告する。

II. 実験の方法及び結果

1. 実験方法

a) 原料皮 : ザーネン種山羊の乾皮及び白色在来種家兔の生皮を用いた。

b) 試料の調製 : 山羊乾皮を水で軟化し、10% NaCl 溶液で 20 時間洗って後水洗し、その後は既報の方法⁽²⁾によって脱毛脱灰し、風乾しエーテルで脱脂して 5×40 mm の大きさにきって混合し試料Aとする。

家兎生皮も同様の処理をして試料Bとする。

c) 豚膵臓より蛋白分解酵素区分の分別調製 : 前報⁽¹⁾記載の如くして豚膵臓抽出液から硫酸 0.2~0.4 飽和で塩析する部分を P・F 1 とし、残液より硫酸 0.7 飽和で塩析する部分を P・F 2 とする。これらの酵素区分の使用に当っては混在する硫酸が溶液の pH に及ぼす影響を避けるため、前報⁽¹⁾に記載したように酵素溶液を微アルカリ性で通気してアムモニアを除いてから使用した。なお両酵素区分の標準効力としては Michaelis-Fuld-Gross 法⁽³⁾による効力を測定して参考とした。

d) 蛋白分解酵素による試料の処理法 :

〔エラスチン消化の影響についての実験の場合〕 試料Aを 1g (風乾物) ずつとり pH 8.0 の Michaelis 緩衝液 50 cc ずつを加え充分吸水せしめる。これに 200 mg/5 cc の P・F 1 溶液 5 cc ずつ、或いはこれと基準効力の等しい 161 mg/5 cc の P・F 2 溶液を 5 cc ずつ、或いは加熱によって失活させた酵素溶液 5 cc ずつを加え、P・F 1 処理区、P・F 2 処理区及び無処理区の 3 区にわけて処理をする。酵素処理区はいずれも試料を 16 組にわけ、対照区は試料を 8 組にわけ。

これらを 38° で消化せしめ、所定時間毎に各処理区より 2 組ずつ合計 4 組を、対照区より 1 組をとり出し、試料を充分水洗し、各処理区における 1 組の試料は残存するエラスチンの定量用とし、他の 1 組の試料はタンニン酸吸着量測定用とする(処理法 A とする)。

* Studies on the Change of the Composition and the Tanning Properties of Skin Tissue. Part XI. On the Influence of Proteolytic Enzymes in Pancreas on the Properties of Unhaired Skin. By Yasushi SATO and Ryo NAKAMURA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

** 現在、名古屋大学農学部農芸化学科

〔コラーゲンの部分的消化の影響についての実験の場合〕 試料Bを1gずつ14組とり、pH 5.9のMcIlvalin緩衝液 50 cc を加えて充分吸水せしめる。これに 100 mg/5 cc の P・F 2 溶液 5 cc を、或いはこの溶液を5分間煮沸して酵素を失活せしめた溶液 5 cc を加え、処理区 14 組及び対照区 14 組を調製する。

消化は 38° で行い、所定時間毎に各区より2組ずつとり出し、試料を充分水洗して消化溶出物を除去し、各区の1組の処理試料はタンニン酸吸着量測定用とし、他の1組は結合水定量用とする(処理法Bとする)。

e) 消化処理溶液の分析： 消化溶液の1部をとり既報⁽¹⁾の条件で塩酸加水分解し、加水分解液についてその中のオキシプロリン量及びアミノ態窒素量を定量する。試料について同様の分析を行い、採取試料量及び試料の分析結果(第1表)から得られる採取試料中の全オキシプロリン量或いは全アミノ態窒素量に対する前記の消化溶出各量の百分率を計算する。

〔アミノ態窒素の定量法〕 Van Slyke の方法による。

〔オキシプロリンの定量法〕 Neuman 及び Logan の方法⁽⁴⁾によって行う。標準曲線、回収率及び緩衝液の影響などは前報⁽¹⁾に記載した通りである。

f) 処理試料の性質試験法： 酵素処理した試料についてはいずれもタンニン酸吸着量の測定を行い、実験の目的に応じてエラスチンの定量或いは結合水の定量を行う。

〔タンニン酸吸着量の測定〕 既報の方法⁽⁵⁾による。但し酵素処理した試料においても、タンニン酸溶液量と採取処理試料量との比は同じにし、試料中の全窒素に 5.62 を乗じた値(皮蛋白量)の1gに対する吸着量を算出し、溶液と試料の比の完全に一致しないものは既報の補正表⁽⁵⁾により補正した。

〔エラスチン定量法〕 既法の方法⁽⁶⁾による。エラスチン消化率は試料乾物量に対するエラスチン消化量の百分率として表示する。

〔結合水の定量法〕 既報の方法^(7,8)による。結合水量の表示は処理試料の全窒素に 5.62 を乗じた値の1に対する結合水の比をもってする。

第1表 各試料の成分

成分	水分	乾物中における百分率		
		エラスチン%	アミノ態窒素%	オキシプロリン%
試料 A	22.3	2.0	11.4	12.9
試料 B	18.3	0.4	11.8	14.0

第2表 エラスチン以外の試料蛋白質の成分

成分	アミノ態窒素%	オキシプロリン%
試料 A	11.5	13.1
試料 B	11.8	14.1

第3表 酵素の基準効力

P・F 1	P・F 2
34.0	42.1

第4表 pH 8 におけるコラーゲン消化率の経時的変化

消化時間	コラーゲン消化率(%)		酸解アミノ態窒素溶出率(%)	
	P・F 1 処理区	P・F 2 処理区	P・F 1 処理区	P・F 2 処理区
0	0	0	0	0
0.5	0	0.1	—	—
1	1.9	1.9	10.5	1.1
2	3.0	3.0	12.1	1.1
3	4.0	4.2	12.1	1.1
5	5.5	4.7	17.9	8.3
7	6.1	5.5	20.9	13.8

2. 実験結果

a) 試料の分析結果： 各試料について本実験に必要な成分を分析した結果は第1表に示した通りである。また第1表の分析値及び前報に記載したエラスチンの分析値を用い、エラスチン以外の試料中の蛋白質に由来する各成分を計算した結果は第2表に示した通りである。

b) 酵素の標準効力： 第3表に示した通りである。

c) P・F 1 による消化作用(pH 8)及びその影響： P・F 2 による消化も比較対照のために行った。実験方法は処理法Aによる。所定時間毎にとりだした消化処理溶液の分析結果について酵素処理区の各値から無処理対照区の育験値、処理区の0時間の値及び消化したエラスチンに由来する計算値をさしひき、採取試料量、第1表の分析値及び第2表の計算値から計算した試料中のエラスチン以外の部分の全オキシプロリン量及びアミノ態窒素量に対するそれらの百分率、すなわち酵素のみによるエラスチン以外の皮蛋白質の消化率(これらをそれぞれコラーゲン消化率および酸解アミノ態窒素溶出率とする)を計算したのが第4表である。

また所定時間毎の処理試料のエラスチン含量の変化及びタンニン酸吸着量の変化は第5表に示す通りである。

d) P・F 2 による消化作用(pH 5.9)及びその影響： 実験方法は処理法Bによる。所定時間毎にとりだした消化処理溶液の分析結果については、P・F 2 による pH 5.9 における消化ではエラスチンは全く消化されないから、酵素処理区の各値から無処理対照区の育験値及び処理区の0時間の値をさしひき、採取試料

第 5 表 エラスチン消化率とタンニン酸吸着量との経時的变化

消化 時間	無処理対照区		P・F 1 処理区		P・F 2 処理区	
	試料のエラ スチン含量 (%)	タンニン酸 吸着量 (g/g)	試料のエラ スチン含量 (%)	タンニン酸 吸着量 (g/g)	試料のエラ スチン含量 (%)	タンニン酸 吸着量 (g/g)
0	2.0(0)	0.89	2.0(0)	0.89	2.0(0)	0.89
0.5	2.0(0)	0.90	0.9(58)	0.85	2.0(0)	0.87
1	2.0(0)	0.89	0.5(78)	—	1.9(3.8)	0.86
2	2.0(0)	0.88	0.6(73)	0.81	1.9(5.8)	—
3	2.0(0)	0.87	0.4(86)	—	1.8(12)	0.85
5	2.0(0)	0.88	0.4(86)	0.81	1.5(28)	0.83
7	2.0(0)	0.90	0 (100)	0.80	1.2(40)	0.80

注 () 内はエラスチン消化率を表わす。

量, 第 1 表の分析値及び第 2 表の計算値から計算した試料中のエラスチン以外の部分の全オキシプロリン量及びアミノ態窒素量に対するそれらの百分率, すなわち酵素のみによるエラスチン以外の皮蛋

第 6 表 pH 5.9 におけるコラーゲン消化率の経時的变化

消化 時間	コラーゲン 消化率(%)	酸解アミノ態窒素 溶出率(%)
0	0	0
0.5	0	1.6
1	0.09	1.2
2	0.17	2.8
3	0.90	7.1
5	1.57	10.8
7	1.91	14.5

白質の消化率 (これらをそれぞれコラーゲン消化率及び酸解アミノ態窒素溶出率とする) を計算したのが第 6 表である。

また所定時間毎の処理試料のタンニン酸吸着量及び結合水量の変化は第 7 表に示す通りである。

III. 考 察

1. pH 8 における脱毛皮成分の各酵素区分による消化量の变化 第 4 表によれば消化時間 3 時間目までの両酵素区分によるコラーゲンの消化率は殆んど同じであり, それ以後では両酵素による消化率に 0.6~0.8% の差が生ずるが著るしい差は認められ

ない。

エラスチンの消化量は第 5 表に示される如く P・F 1 によれば 30 分後に存在量の 58% を消化して皮中の含量は 2.0% から 0.9% に減少し, 3 時間後には消化量は 86% となり, 7 時間後には 100% 消化するに至る。P・F 2 によれば 3 時間後までは殆んど変化なく, 7 時間後に漸く 40% を消化するに過ぎない。

エラスチン以外の蛋白質成分の消化に由来する酸解アミノ態窒素量は P・F 1 による処理区の方が多く, P・F 2 による処理区との差は 1~5 時間の消化では 10

第 7 表 結合水量とタンニン酸吸着量との経時的变化

消化 時間	無処理対照区		P・F 2 処理区	
	結合水量	タンニン酸 吸着量 (g/g)	結合水量	タンニン酸 吸着量 (g/g)
0	0.191	0.80	0.191	0.81
0.5	—	0.79	—	0.85
1	0.222	0.79	0.227	0.85
2	0.219	0.81	0.226	0.85
3	0.219	0.83	0.193	0.80
5	0.202	0.86	0.253	0.82
7	0.206	0.90	0.227	0.87

~11% であり 7 時間後に約 7% となる。このエラスチン以外の成分は主としてコラーゲンであるが, その他に極めて僅かながら他の蛋白質が存在することは否定できない。しかしこの様な蛋白質が存在するとしても, 両酵素の基準効力は等しくこの様な蛋白質の消化率は両酵素において等しい筈である。従って P・F 1 処理によって消化溶液に含まれる酸解アミノ態窒素量が多くなるのは P・F 1 処理によってエラスチンが消化された結果*と考えなければならない。この事は P・F 2 処理 7 時間後にエラスチンが 40% 消化される時に, 酸解アミノ態窒素量の差が約 7% に減少することから考えて可能性があるものと考えられる。

これらを要するに両酵素によるコラーゲン消化率は殆んど同じであるが, P・F 1 によって試料中のエラスチン含量は少くなり, 同時にエラスチンに関係ある組織構造がこわされてゆく可能性が認められる。

2. エラスチン消化がタンニン酸吸着量に及ぼす影響 第 4 表及び第 5 表によれば P・F 1 によりコラーゲンは殆ど消化をうけずエラスチンが 58% 消化をうけるとタンニン酸吸着量は 0.85 g まで減少し, エラスチンが 73% 消化され皮中のエラスチンが 0.6% になるとタンニン酸吸着量は 0.89 g から 0.81 g まで減少する。それ以上エラスチンの消化が進んでも殆ど変化しない。P・F 2 によればエラスチンが 12% 消化をうけるまでは, 無処理対照区のタンニン酸吸着量の変化と大差はないが, エラスチンが 40% 消化され, コラーゲンも約 5% 消化され, また酸解アミノ態窒素溶出率が約 14% となるに至ればタンニン酸吸着量は 0.80 g まで減少するに至

* エラスチンの消化溶出物を構成するアミノ態窒素を指すのでなく, 例えばエラスチンが他の成分と化学的な結合をしており, この結合の切断のために生ずる特異的溶出などを指す。

る。よって皮のエラスチンを酵素によって消化すると、コラーゲン消化の如何にかかわらず皮のタンニン酸吸着量を減少すると言える。

3. pH 5.9 における脱毛皮成分の P・F 2 による消化量の変化 pH 5.9 において P・F 2 はエラスチンを全く消化しない。試料中のコラーゲンの消化率は第 6 表に示される如く、消化時間の経過に従ってほぼ直線的にコラーゲンを消化し、7 時間後には 1.9% を消化するに至る。

消化溶出物のアミノ態窒素の定量によれば、エラスチン以外の試料中の酸解アミノ態窒素の溶出率は消化時間の経過に従って増加し、7 時間後には 14.5% となる。これを第 4 表の pH 8 における P・F 2 の消化作用の実験結果と対照すると用いた酵素量が第 4 表の場合は 161 mg であり、第 6 表の場合は 100 mg であり、前者の場合は P・F 2 の至適 pH で消化を行い、後者の場合はそれより消化率の低い pH で消化を行ったものである。しかしながら消化溶出物の酸解アミノ態窒素の定量値によれば、両者の溶出率は大きく異なる。これは P・F 2 による消化が単一の酵素の作用でないこと、および前に記載した如くエラスチン消化酵素の示す特殊消化作用を含むものであると考えられる。但しこの場合には前記の如くエラスチンは消化溶出されない。

これらを要するに pH 5.9 において脱毛皮を P・F 2 で消化すればエラスチンは消化されず、コラーゲンが部分的に消化し、エラスチン以外の試料中のアミノ態窒素を減少する。

4. コラーゲンの消化がタンニン酸吸着量に及ぼす影響 第 6 表および第 7 表に示される如く、コラーゲンの消化率が 0.2% に達するまではタンニン酸吸着量が多くなるが、結合水量は殆んど変化しない。コラーゲン消化率が約 1% に達し、酸解アミノ態窒素溶出率も増加し始めるとタンニン酸吸着量はもとの量まで減少し、その後は対照区と同じく経時的に増加するが吸着量は対照区より常に少い。この場合には結合水量は対照区より多くなる。

消化の初期にタンニン酸吸着量が増加するのは試料中の微量夾雑成分の消化によるもので、皮蛋白質の基本構造には殆んど変化がないものと考えられる。消化溶出物中の酸解アミノ態窒素が増加するときは皮蛋白質の基本構造に変化を生じ、そのためにタンニン酸吸着量も結合水量も減少するが、それ以上消化が進み、コラーゲン消化率が 1.9% に達するまでは、消化による変化はないものと考えられる。

IV. 要 約

2 部分に分別した蹄臓中の蛋白分解酵素を用い、エラスチン或いはコラーゲンの消化量の異なる皮を調製し、それらの消化量がタンニン酸吸着量に及ぼす影響について実験し次の結果を得た。

(1) コラーゲン消化の如何にかかわらず、エラスチンが消化されるとタンニン酸吸着量を減少する。エラスチン消化率が約 70% になるか、或いは約 40% であっても同時に消化をうけるコラーゲンの消化率が約 5% になると、タンニン酸吸着量は約 10% 減少してはほぼ最低に達する。このとき酸解アミノ態窒素溶出率が著しい。

(2) コラーゲンだけが約 2% 消化をうける過程においては、はじめ 0.2% 消化をうけるまではタンニン酸吸着量が僅かに増加するが、それ以上消化をうけるともとの吸着量まで減少する。結合水の変化からみると、このはじめの変化は皮蛋白質の基本構造の変化と考えられないが吸着量が減少する場合は皮蛋白質の構造変化によるものと思われる。

本実験を遂行するにあたり終始御懇篤なる御指導と御鞭撻をいただきました恩師佐々木林治郎先生に厚く御礼申し上げます。

なお本研究は昭和 30 年 10 月、日本畜産学会において講演発表したものの一部である。

(1) 佐々木林治郎, 佐藤 泰 : 皮技協誌, 5, 32 (1959).

(2) 佐々木林治郎, 佐藤 泰 : 本誌, 28, 510 (1954).

(3) 第 6 改正日本薬局法註解, 南江堂, p. 428 (1958).

(4) R. E. Neuman, M. A. Logan : *J. Biol.*

Chem., 184, 299 (1950).

(5) 佐藤 泰 : 日畜会報, 29, 144 (1958).

(6) 佐藤 泰 : 日畜会報, 26, 183 (1955).

(7) 佐々木林治郎, 佐藤 泰 : 皮技協誌, 4, 16 (1958).

(8) 佐藤 泰, 加香芳孝 : 日畜会報, 29, 222 (1958).