Glycylglycine Dipeptidase に対する

金属イオンの影響—Ⅷ.*

幽門垂並びにそのグリセリン抽出液中の
無機成分について

斗 ケ 沢 宜 久

(岩手大学農学部)

Effects of Metal Ions on the Glycylglycine Dipeptidase—Ⅷ.
Inorganic Component of Pyloric Caeca and their Glycerine Extracts
Yoshihisa TOGASAWA

In the present investigation the author made an attempt to make clear the presence of GG-dipeptidase activating inorganic ions such as Co^{++} , Mn^{++} and Mg^{++} in the pyloric caeca of several fishes, tunny, bonito, and yellow-tail as well as in their glycerine extractives.

As shown in Tables 2, 3 and 4, whereas Co^{++} and Mn^{++} were not detected, the presence of Mg^{++} was verified, its amount being calculated as 30-50 mg % for fresh pyloric caeca. It seems that about 70 % of the Mg^{++} is transferred to the glycerine extractives.

従来魚類幽門垂の酵素化学的研究は多数報告されているに拘らず無機成分に就いての研究は極めて少ない¹⁾。

著者は既報の如く魚類(マグロ、カツオ、ブリ)幽門垂 glycylglycine (GG) dipeptidase が Co^{++} , Mn^{++} により賦活される以外に特異的に Mg^{++} によつても賦活される事実を発見した^{2,3)}。 Co^{++} による賦活機構に関しては SMITH^{4,5)} と同様 enzyme- Co^{++} -substrate 配位化合物の形成によるものと推定し、又 Mn^{++} による場合も恐らく同一機構によるものと推定した⁶⁾。然し此の酵素試料は結晶として分離されたものではなく、組織のグリセリン抽出液であるから酵素と共にグリセリン液中に移行してくる金属イオンの影響も考慮する必要がある。従つて著者は幽門垂 GG-dipeptidase に対し賦活的に作用する Co^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} が幽門垂中に含有されているか否かを知る目的でマグロ、カツオ、ブリ幽門垂中の灰分について定性並びに定量分析を行い、之等が酵素液調製間に同液中に移行する際の量的変化を追求した。

実 験 の 部

1. 試 料

マグロ *Thunnus orientalis* TEMMINCK et SCHLEGELカツオ *Katsuwonus pelamis* LINNÉブリ *Seriola quinqueradiata* TEMMINCK et SCHLEGEL

2. 試料の調製

1) 幽門垂の分析試料

定性分析試料としては幽門垂の外皮膜を除去後、ホモゲナイザーで磨砕均一化し、其の一定量を取り初め 100°C の乾燥器で乾燥後少量の濃硝酸を滴下しゆるやかに加熱、約 500~600°C で灰化する。之を 0.3 N HCl に溶解したものをを用いた。

又定量用としては上記磨砕幽門垂の一定量を夫々の項に記した方法により調製した。

1957 年 8 月 28 日受理

* 昭和 30 年 4 月本報の一部を日本水産学会で講演

2) グリセリン抽出酵素液の分析試料

定性用として上記磨砕幽門垂の一定量に5倍量のグリセリン（グリセリン 1：蒸溜水 1）を加えて良く攪拌、一昼夜放置後ガーゼと脱脂綿で濾過、此の粗グリセリン抽出酵素液を2分し其の1部はそのまま、他の1部は硅藻土の薄膜を作った濾紙で濾過して得た酵素液を始め夫々砂皿上で蒸発乾固し、後序々に加熱炭化せしめ少量の濃硝酸を滴下、約 500~600°C で灰化する。之を 0.3 N HCl に溶解したものをを用いた。

又定量用としてはグリセリン抽出液の硅藻土濾液の一定量を取り夫々の項に記した方法により調製し定量を行つた。

3. 幽門垂並びに其のグリセリン抽出酵素液中の灰分含量

マグロ、カツオ、ブリの幽門垂をホモゲナイザーで磨砕均一化し、其の一定量を取り水分並びに灰分を測定、別に一定量の磨砕幽門垂から上記方法により調製した酵素液を灰化し夫々幽門垂から酵素液中に移行する灰分量の測定を行つた。

Table 1. Ash concentration in pyloric caeca and in their glycerine extract.

	Percentage of fresh matter				Ratio		
	Moisture	Ash in pyloric caeca	Ash in enzyme solution				
			A	B	pyloric caeca	A	B
Tunny	78.15	1.35	1.21	0.84	100	89.62	62.22
Bonito	75.48	1.52	1.29	1.14	100	84.86	75.00
Yellow-tail	78.64	1.10	1.08	0.75	100	98.18	68.18

A.....Glycerine extract of pyloric caeca.

B.....Celite filtrate of A.

結果は Table 1 の如くで幽門垂新鮮物中の灰分含量はマグロ 1.35%，カツオ 1.52%，ブリ 1.10% で、乾物に換算して 5~6 % 前後であり、之から調製した粗グリセリン抽出酵素液は尚乳濁状態を呈し、数日間放置するも沈降清澄液とならず、遠心分離による分離も不可能で尚相当の組織を混入しており此の酵素液に移行する灰分量は 80~90 % 前後でブリの場合は 98.18 % も移行する。

又此の粗グリセリン抽出液を硅藻土の薄膜を作った濾紙で濾過して得た酵素液は酵素力に変化なく而も蛋白態窒素がマグロの場合約 1/2.6 に減少した透明な液体で⁷⁾、一般に此の調整法による酵素液に移行する灰分は組織中の 60~75 % に相当する。

従つて酵素液調製に当り大部分の幽門垂中の灰分が酵素液中に移行するものと見做し得る為、酵素液から更に酵素反応系に及ぼす無機質の影響は充分考慮されねばならない問題である。

4. 幽門垂並びに其のグリセリン抽出液灰分中の無機成分

上の実験から特異的な金属イオンにより影響される peptidase の研究を行う場合組織から酵素液中に移行する金属イオンの種類並びに量的関係を考慮せねばならなく、幽門垂から得られた上記試料を常法により 5 族まで定性分析を行つた。結果は Table 2 の如くである。

即ち陽イオンとしてマグロ、カツオ、ブリ幽門垂中に検出された元素は Al, Zn, Fe, Ca, Mg, Na, K の 7 元素で、何れも酵素液中への移行が認められた。従つて GG-dipeptidase の賦活に關与する Co^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} の中 Co^{++} , Mn^{++} は検出されず、 Mg^{++} のみが検出されたが、カツオ幽門垂中に Co^{++} の痕跡を認めている研究者¹⁾もあり、更に精密を期し幽門垂並びに硅藻土濾過酵素液の灰分を発光スペクトルによる元素組成の検索に供した。此の際の発光条件は断続弧光法で、日本電興株式会社製カーボンを使用し、電極間隔 3 mm, スリットの開き 0.005 mm で島津 QF-60 型石英分光分析器を使用した。結果次の如きスペクトル写真を示した。

即ち検出された金属元素は Cu, Al, Zn, Fe, Ca, Mg, Na, K で、Si, P 等の非金属元素も検出され化学分析の結果と同様 Co, Mn は検出し得なかつた。

5. 無機成分の定量分析

定性分析により検出された各元素の定量分析を行い幽門垂から酵素液(粗グリセリン抽出液の硅藻土濾液)

Table 2. Metallic ion found in pyloric caeca and in their glycerine extract.

Group no.	Cation	Turmy			Bonito			Yellow-tail		
		pyloric caeca	A	B	pyloric caeca	A	B	pyloric caeca	A	B
1	Ag ⁺ , Hg ₂ ⁺⁺ , Pb ⁺⁺	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	Pb ⁺⁺ , Bi ⁺⁺⁺ , Cu ⁺⁺ , Cd ⁺⁺ , Hg ⁺⁺	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	As ⁺⁺⁺ (As ⁺⁺⁺⁺⁺), Sb ⁺⁺⁺ (Sb ⁺⁺⁺⁺⁺), Sn ⁺⁺ (Sn ⁺⁺⁺⁺)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	Al ⁺⁺⁺ , Zn ⁺⁺ , Fe ⁺⁺	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Cr ⁺⁺⁺ , Mn ⁺⁺	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ni ⁺ , Co ⁺⁺	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Ba ⁺⁺ , Sr ⁺⁺	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	Na ⁺ , K ⁺	+	+	+	+	+	+	+	+	+

A.....Glycerine extract of pyloric caeca.

B.....Celite filtrate of A.

中に移行する元素の割合を算出した。尚分析法は次の如く行つた。

1) Al, Fe, Zn の定量: 磨砕幽門垂の一定量をケルダールフラスコにとり conc HNO₃ を滴下しながら液が透明になるまで加熱分解し, 稀釈して実験に供した。

又酵素液は其の一定量を坩堝に入れ砂皿上で加熱しながら蒸発乾固せしめ, 灰化後 dil HNO₃ に溶かし実験に供した。

先づ磷酸除去の目的で蒸発乾固し conc HNO₃ を加え数回蒸発乾固を繰り返して完全に硝酸塩に変え, 之に conc HNO₃ 5 cc 加えて溶解せしめ 1 g の Sn を少量づつ加えながら加熱, 不溶解性の磷酸錫 (H₂SnO₃)_m · (P₂O₅)_n の形で除去し過剰の Sn は H₂S を通じ SnS₂ として除去した。此の濾液は NH₄Cl の存在下に NH₄OH を加え水酸化物とし, 更に H₂S を通じて硫化物として沈澱せしめ, 沈澱は HCl に液解し NH₄OH を加えて Fe と Al を水酸化物として再沈澱せしめ濾過した。濾液中の Zn は微酸性に於て H₂S を通じて硫化物として沈澱せしめた後 HNO₃ に溶解し灼熱して ZnO として秤量した。

又 Fe と Al の水酸化物は坩堝に移し灼熱して酸化物の含量として秤量後 conc HNO₃ に溶かし, 一度蒸発乾固後 0.5 N HNO₃ に溶かして一定量とし, チオシヤン酸法により発色せしめ 480 mμ に於ける吸光度を BECKMAN spectrophotometer で測定, 予め作製した検量線から Fe を定量した。尚 Al は Fe, Al の含量から Fe 量を差引き算出した。

2) Ca, Mg の定量: 試料は定性分析の場合と同一要領で調製したものをを用い, キレート滴定法により Ca, Mg を定量した。

3) Na, K の定量: 定性分析と同一要領で調製した試料を LANGE の Flame photometer で測定し予め作製した検量線から Na, K の量を求めた。

各幽門垂並びにそれから調製した酵素液中の含有元素量は Table 3 に示す如くであり, 其の各々の酵素液中への移行率を算出した結果は Table 4 の如くである。

結果幽門垂中には K, Na の含量多く新鮮物中 K は 250~320 mg%, Na 180~190 mg%, 次いで Ca 40~60 mg%, Mg 30~50 mg% で, Al は 20~30 mg%, Zn 並びに Fe は遙かに少ない。今之等各金属元素の同酵素液中へ移行する割合を見るにマグロ, カツオ, ブリ何れの場合も類似傾向を示し, Al が割合に多く 63~80% 以上も移行し, 次いで Na, K 及び Fe 等で, Mg の移行率も多く其の約 60~70% 以上も移行するが Ca は少なく 40~45% 前後に過ぎず, Zn は 50~60% 程度である。

即ち幽門垂 GG-dipeptidase の賦活に関与する Co⁺⁺, Mn⁺⁺, Mg⁺⁺ の中 Co⁺⁺, Mn⁺⁺ は本酵素液中には全く含有されず, 一方 Mg⁺⁺ が幽門垂新鮮物中約 30~50 mg% も含有され而も酵素液調製に当り其の 60~70% も移行する事実から Mg⁺⁺ による賦活機構は前報⁶⁾ の結果と合せ考慮し Co⁺⁺, Mn⁺⁺ とは全く趣を異にした機構により賦活するものと考えられる。

Photographs of spectra

1. Pyloric caeca of tunny
2. Enzyme solution from the caeca of tunny.
3. Pyloric caeca of bonito.
4. Enzyme solution from the caeca of bonito.
5. Pyloric caeca of yellow-tail.
6. Enzyme solution from the caeca of yellow-tail.

Table 3. Metallic elements found in pyloric caeca and in their glycerine extract.

Element	Tunny		Bonito		Yellow-tail	
	mg % in fresh pyloric caeca	mg % in enzyme soln from 100g pyloric caeca	mg % in fresh pyloric caeca	mg % in enzyme soln from 100g pyloric caeca	mg % in fresh pyloric caeca	mg % in enzyme soln from 100g pyloric caeca
Al	21.8	18.2	27.4	22.1	29.6	18.8
Zn	7.5	4.0	9.5	5.8	12.9	7.0
Fe	3.6	2.7	4.5	3.2	3.5	2.6
Ca	42.9	16.8	63.8	25.4	41.8	18.6
Mg	32.6	23.2	47.9	33.7	34.7	21.7
Na	189.8	142.8	181.3	143.7	180.5	136.5
K	277.6	189.6	321.2	235.1	259.2	167.2

Table 4. Percentages of metallic elements removed from pyloric caeca into glycerine extract.

Element	Tunny	Bonito	Yellow-tail
Al	83.5	80.7	63.5
Zn	53.3	61.1	54.3
Fe	75.0	71.1	74.3
Ca	39.2	39.8	44.5
Mg	71.2	70.4	62.5
Na	75.2	79.3	75.6
K	68.3	73.2	64.5

要 約

マグロ、カツオ、ブリ幽門垂中に GG-dipeptidase 作用を賦活する Co^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} が含有されているか否かを確認する目的で金属イオンの検索を行った結果、 Co^{++} , Mn^{++} は認められず、 Mg^{++} の 30~50 mg % (新鮮物に対し) を検出し、而も酵素液調製に当其の 60~70% が同液中に移行する事実を認めた。

終りに臨み発光分光分析の測定に関し援助を与えられた岩手県警察本部相馬重信技師に厚く感謝の意を表する。

文 献

- 1) 堀口, 柏田, 柿本: 本誌, **18**, 279 (1953).
- 2) 斗ヶ沢, 勝又: 岩手大農報告, **2**, 66 (1954).
- 3) 斗ヶ沢, 勝又: 本誌, **21**, 1070 (1956).
- 4) E. L. SMITH: *J. Biol. Chem.*, **173**, 553, 571 (1948).
- 5) E. L. SMITH: *J. Biol. Chem.*, **176**, 9, 21 (1948).
- 6) 斗ヶ沢, 勝又: 本誌, **23**, 625 (1958).
- 7) 斗ヶ沢, 勝又: 本誌, **23**, 163 (1957).