

12

組織内磷酸酵素によるコカルボキシラーゼの分解に就て (遊離型ビタミン B₁ 定量上の注意事項)

藤田 秋治 土肥 圭三郎 河内 省一

(北里研究所生化学室)

さきに我々はビタミン B₁ の遊離型とエステル型とを定量する方法を螢光法¹⁾と比色法²⁾とに就て詳細に發表したが、その後研究を進めて行くうち遊離型定量の操作の途中、組織磨碎の間に動植物組織中に含まれてゐる磷酸酵素の作用が現はれて、エステル型のビタミン B₁、即ちコカルボキシラーゼが可なり分解して遊離型となる事が判つた。即ち新鮮組織を用ゐる實驗では、その遊離型の正しい値を求める爲には磷酸酵素をまづ不活性化した後磨碎、浸出等の操作を行ふ必要ある事が明となつた。この點は從來この方面の研究者の誰も注意してゐない事であるから、この際特に注意を喚起して置きたいと思ふ。

それにはまづ測定せんとする組織、例へば動物の場合ならば致死後、直ちに組織を取出して速かに秤量した後、すぐに 80° の水中に投じ 15 分間 80° に加熱した後冷却し、ピンセットで組織を取出し乳鉢で磨碎し(適當量の海砂又は硬質硝子砂を加へて)、1*N* HCl の適當量(通常秤量組織量の 1/10 に相當する量)を加へ、これに上述の浸出液を定量的に加へ、更に水を加へて組織の一定稀釋浮游液を造り、時々振盪しながら 80° 水浴中に更に 15 分加熱する。以下の操作は既に報告した我々の遊離型定量の方式に従へばよい。もし可檢組織が大きい場合は、鋭利な刀で約 1 cm³ 位の大きさにきつて 80° の熱湯中に投ずればよい。磷酸酵素を不活性化させるには 80°、10 分では不足で 15 分以上であれば 30 分でも差支なく、70° 或はそれ以下の温度では 20 分加熱しても不活性化は十分に行はれない。

1) 藤田, 淺利, 土肥, 日本醫學. 3244, 8, 1941; 3246, 12, 1941; *J. Bioch.* 33, 339, 359, 1941.

2) 藤田, 松川, 日本醫學. 3251, 5, 1941; *J. Bioch.* 33, 335, 1941.

ビタミン B₁ は酸性では割合安定であるが、鹼性では容易に変化するものであるから、組織内のビタミン B₁ は 80°, 15 分加熱の操作で一部分壊れる事はないかといふ疑が起るが、血液溶血液に一定量のビタミン B₁ を先に加へて 80°, 15 分加熱しても、また加熱の後に一定量のビタミン B₁ を加へて測定しても、B₁ の検出値は同一であつたから、中性に近い條件でも上述の條件で B₁ の壊れる事のない事が判つた (表 2)。またグルタチオンの場合には血液に加へて加熱すると、グルタチオンが酸化型に変ずる事が見られたが (沼田³⁾)、ビタミン B₁ ではかゝる関係は見られなかつた。組織内磷酸酵素の作用は組織を磨碎する時には極めて著明に作用を現はすが、組織その儘の時はこれにくらべると比較的その影響は少い。この関係は植物組織に於けるアスコルビン酸酸化酵素が組織を磨碎する時に極めて著明にアスコルビン酸を酸化して、デヒドロアスコルビン酸とするが、無傷の儘では比較的その作用が少いのとよく似てゐる。コカルボキシラーゼを分解する磷酸酵素は動物組織のみならず、植物組織にも広く分布してゐるから加熱せずに、充分磨碎してトルオールを加へ、一夜孵卵器に入れて置くと多くの新鮮組織ではタカヂアスターゼを加へて (此中に含まれて居るタカ磷酸酵素が作用) 一夜孵卵器に入れた時と同様の總ビタミン B₁ 値を與へるものである。ただ動物組織のうち、人乳のみはこれ迄の處一度も磷酸酵素 (コカルボキシラーゼを分解する) の存在を證明しなかつた。

タカヂアスターゼを用ひて總ビタミン B₁ 値を求めるには、組織磷酸酵素を豫め不活性化してもしなくても結果は多くの場合變りはなかつた。

表 1

處 置	肝臓内ビタミンB ₁ 量 (γ%)
(1)	24
(2)	60
(3)	78
(4)	114
(5)	133

以上述べたものゝうち著明な實驗例の二三を次に示す。

實驗 1 白鼠肝臓の實驗. (1) 致死後直ちに肝臓をとり秤量, 80° の水 10cc 中に投じ, 80°, 15 分加熱, 冷却, 0.1n HCl を肝臓と同量加へ磨碎, 水を加へて 10) 倍液とする. 80°, 15 分加熱の後方式の如く

處置. (2) 肝臓に適當量の HCl を加へ室温 (31°) 12 分の後磨碎. 以下 1. に同じ.

3) J. Bioch. 31, 35, 1940.

(3) に同じ、但し室温 20 分放置。(4) 同上、室温 27 分放置。(5) 同上、室温 35 分放置。成績は表 1 に示す。

實驗 2 家兎血液の實驗。(1) 蓆酸鹽添加家兎血液(心臟穿刺による) 5.00 cc をとり、水を加へて 50 cc とする。この溶血液 10 cc に同容の水を加へる。80°, 15 分加熱の後冷却、トルオール添加, 38°, 24 時間放置の後測定。(2) 上の溶血液を

表 2

處 置	ビタミン B ₁ 検出値 (γ)	添加量 (γ)	80°, 15 分加熱後冷却直ちに測定。(3) 上の溶血液を 80°, 15 分加熱, 冷却後 0.5γ の B ₁ を加へて測定。(4) 上の溶血液に 0.5γ の B ₁ を加へた後 80°, 15 分加熱, 冷却の後測定。成績は表 2 に示す。
(1)	0.023	—	
(2)	0.023	—	
(3)	0.492	0.469	
(4)	0.492	0.469	

實驗 3 家兎血液の實驗。(1) 血液 1.00 cc を直ちに 80° の水 19 cc に加へる。80°, 15 分加熱の後 1n HCl 0.1 cc を加へ混和, 更に 80°, 15 分加熱の後冷却方式の如く測定。(2) 血液 1.00 cc に 1n HCl 0.1 cc 添加, 水 19.0 cc 添加, 混和, 80°,

表 3

處 置	血液中ビタミン B ₁ 量(γ%)	備 考
(1)	2.4	遊離型眞値
(2)	6.0	舊方式による遊離型値
(3)	6.0	—
(4)	6.0	—
(5)	17.4	室温 30 分にて全部遊離型となる
(6)	16.8	—
(7)	16.8	タカヂアスターゼなくとも總量を示す
(8)	16.6	總ビタミン B ₁ 値
(9)	16.8	"

15 分加熱以下同じ。(3) 血液 1.00 cc + 水 19.0 cc 混和, 1n HCl 0.1 cc 混和, 80°, 15 分加熱以下同じ。(4) 血液 1.00 cc + 水 19.0 cc 室温(23°) 15 分放置の後 1n HCl 0.1 cc 加, 80°, 15 分加熱以下同じ。(5) 4 に同じ, 但し室温 30 分。(6) 4 に同じ, 但し室温 60 分。(7) 血液 1.00 cc + 1n HCl 0.1 cc + 水 19.0 cc, Toluol 添加, 38°, 1 夜放置, 以下方式の如く測定。(8) 1 の濾液にタカヂアスターゼを用ゐる總ビタミン B₁ 測定。(9) 2 の濾液につき 8 と同様。成績は表 3 に示す。

[詳細は J. Biochem. に發表する]

(受附: 昭和 16 年 11 月 18 日)