

日本

生理学

雑誌

JOURNAL OF THE PHYSIOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN

27巻 5号 1965

原 著

- 魚住光郎：キサンチン酸化酵素系の分光分析および電子スピン共鳴による研究………243
椎名宏：腸壁内神経細胞のアセチルコリン生成にはたす役割について………270
河村洋二郎・足立明：化学調味料に対する反応を利用した Taste Receptor Unit
の解析………279

地 方 小 学 会 報

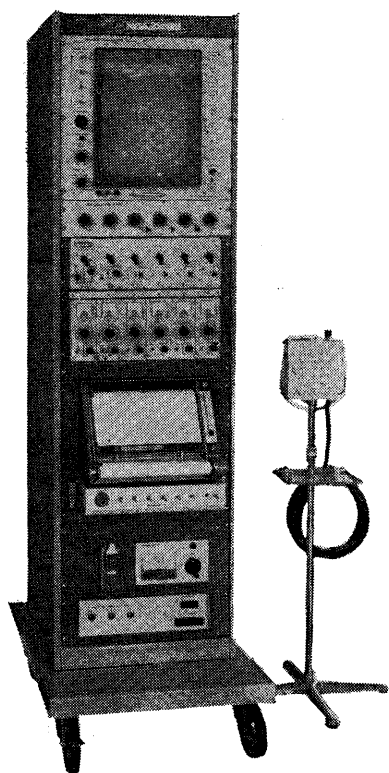
- 第31回近畿生理学談話会（つづき）………285

短 報

- 会報：日本生理学会常任幹事会議事要録………288
日本生理学会昭和39年度決算報告………289
日本生理学会昭和40年度予算………290
編集後記………290

日本生理誌
J. Physiol. Soc. Japan

日本生理学会



基礎医学の研究に

最高水準のエレクトロニクスを！

ポリグラフ PG-602形

脳	波
心電	図
筋電	図
血	圧
呼吸	流
呼吸	量
気管	内
精神	電
呼吸	現
指	象
尖	曲
脈	線
波	
単位	
細胞	
電	
位	
心	
音	
酸	
素	
飽	
和	
度	
温	

主要製品

脳波計 脳波分析装置 筋電計 ポリグラフ ベッドモニター ハートスコープ フィジオグラフ 医用テレメータ オシログラフ各種



三栄測器株式会社

東京都新宿区柏木1-95 Tel (363) 8251代

LABORATORY



ANIMALS

実験動物

マウス, ラット

ウサギ, モルモット

ハムスター, その他

CLEA 固型飼料

CA-1 マウス, ラット繁殖用

CE-2 マウス, ラット飼育用

CR-1 ウサギ, モルモット飼育用

犬用 (ビタワン)

ケージ其他器具の御用命に応じます。

北山商店

京都市南区吉祥院西ノ庄向田町43

電話 京都 (37) 6 9 5 3

キサンチン酸化酵素系の分光分析および

電子スピン共鳴による研究 577.158

Photoabsorption- und ESR-spektrometrische Untersuchung
über Xanthin Oxydase

魚 住 光 郎 (Uozumi-Mitsuro) *

Xanthin Oxydase wird aus Kuhmilch mit höher Ausbeute isoliert und gereinigt. In dem Reinigungsprozesse ist das Kalziumphosphatgel nutzbar, dass bei bestimmter Kondition die Xanthin Oxydase stark absorbiert. Diese Methode ist etwas vorteilhafter als die Methode von Avis et al. Diese und jene Xanthin Oxydase sind chemisch und physikalisch gleich.

Das Differenzabsorptionspektrum zwischen oxydierte und reduzierte Xanthin Oxydase ist mit das Absorptionspektrum der FAD nicht geeinigt. Diese Uneinheit ist daran gegründet, dass die Xanthin Oxydase zwei chromphorische Gruppe hat ; ersteist FAD und zweite ist Molybdänkomplex, und jede entfärbt sich bei der Reduktion. Die FAD reduziert sich sobald als das Substrat aerobisch an die Xanthin Oxydase Lösung zugesetzt wird, und FAD ist weniger oxydabel als die reduzierte Form von Molybdänkomplex. Dagegen oxydiert sich das reduzierte Molybdän leicht in Gegenwart von Luft.

Diese zwei photometrische Veränderungen sind mit der Veränderung von Elektron-Spin-Resonanz (ESR) Absorption vergleicht, es ist versichert, dass die zweite chromphorische Gruppe Molybdänkomplex ist.

Es folgt nämlich daraus, dass die FAD der Xanthin Oxydase als Dehydrogenase wirkt und das Molybdän als Oxydase.

Die Eisenkomplex der Xanthin Oxydase ist nicht so stark chromphorisch, aber photometrische Analyse von der Reduktion der Xanthin Oxydase zeigt, dass der Übergang des Elektrons von der aktiven Enzyme zur Nicht-Aktiven durch Eisen vermittelt wird.

Um die Schnellreaktion zu beobachten, die verschiedenen Massnahmen für ESR-Messmethode sind versucht. Im flüssigen Zustand wird die ESR-Absorption in kurzer Zeit gemessen, aber diese Methode ist nicht so günstig für unseres Experiment, weil das Enzym Konzentration und die Sensibilität des ESR-Apparates nicht genyng sind. Dieser Nachteil wird damit ersetzt, dass man bei der niedrigen Temperatur messt. Nach dieser Methode kann man Spektrometried der ESR und Photoabsorption nicht gleichzeitig versuchen, aber wegen der hohen Widerscheinbarkeit ist diese Methode günstiger als Gleichzeitig-Messmethode bei der normalen Temperatur.

1. 緒 言

キサンチン酸化酵素については De Renzo¹⁾の秀れた綜説がある. 生体組織によってヒポキサンチンが尿酸にまで酸化されることを見出したのは Horbaczewski (1882) であり, この酸化を触媒する酵素に Xanthin Oxydase と名づけたのは Burrian (1905) であるという.

Schardinger はアルデヒドに働いてメチレン・ブラウを還元褪色させる酵素の存在をみとめた (1902).

Hopkins ら²⁾ は新鮮な乳汁にヒポキサンチンおよびキサンチンの酸化を触媒する酵素の存在を指摘した. Dixon ら³⁾ ついで Booth ら⁴⁾ はアルデヒドを酸化する酵素はまたプリン塩基をも酸化し, これらは同一の酵素であることを明らかにした.

Ball⁵⁾ と Green ら⁶⁾ は独立的にキサンチン酸化酵素は Flavoprotein であることを確めた.

Westerfeld ら⁷⁾ はネズミの肝臓内キサンチン

* 大阪大学医学部第1生理学教室

Physiologisches Laboratorium der Medizinischen Fakultät der Universität Osaka

[昭和40年2月12日受付]

酸化酵素の含有量を正常に保つためには飼料にモリブデンの不可欠なことを指摘していた。その後4年して De Renzo ら⁸⁾, Green ら⁹⁾, Richter ら¹⁰⁾および Totter ら¹¹⁾はモリブデンがキサンチン酸化酵素の一要素であることを明かにした。こうして、この酵素は Metalloflavoprotein であることが明確になった。

その翌年, R. Westerfeld¹²⁾によって、この酵素のもう一つの要素として非ヘムの鉄が加えられた。

1955年に Avis, Bergel, Bray¹³⁾によってこの酵素は乳汁から抽出、純化、そして結晶化された。

しかし、この酵素を構成している作用簇としての FAD, そして Mo と Fe の含有量は抽出試材としての臓器の種類あるいは精製手続きの違いによって諸家の成績が必ずしも一致しない。たとえば FAD: Mo: Fe なる比として、2:1:8 (Richter, Westerfeld 1954 乳), 2:1.4:8 (Avis, Bergel, Bray 1955 乳), 1:1:4 (Kielley 1955 肝臓), 1:1:8 (Remy, Richter, Doisy, Wells 1955 肝臓) のように一定でない。

モリブデンの酵素作用への関与については1956年頃までは明確でなかった¹⁴⁾。1945年に Zavoiski によって電子スピン共鳴吸収法が与えられた。その後、装置の改良されるにつれて、常磁性金属イオンあるいは遊離基の測定が可能になり、化学反応の追跡に対する有力な一つの武器となった。

Metalloflavoprotein とくにキサンチン酸化酵素に関しては Bray, Petterson and Ehrenberg¹⁵⁾によって酵素の還元に伴って遊離 FADH および Mo^{+5} のシグナルが検出された。このとき鉄にも原子価の変動があることが明らかにされた。しかし、反応の時間的経過に伴う、各要素の態度の上におも幾多の解明すべき疑問を残している。電子伝達系としてのキサンチン酸化酵素系は Bray ら¹⁶⁾が指摘しているように甚だ複雑である。

著者はこの間の消息を更に明瞭にする目的を以て、まず、この酵素の精製と純化結晶化を行

い、ついで、この酵素反応を分光分析的に追いついて、用いる酵素の性格を再確認した上で、電子スピン共鳴法によって、この酵素の電子伝達系統を確かめようとした。その間、抽出純化法の改良、純化酵素の物理的性質、分光学的新知見、電子伝達の可能なる新しい経路を知り得た。本論文はそれらの報告である。

Ⅱ. キサンチン酸化酵素の純化結晶化法の改良とその物理的性質

A. まえおき

乳汁のキサンチン酸化酵素は Ball⁵⁾, Corran ら⁶⁾によってかなり高純度に精製されていた。これをはじめて結晶化することに成功したのは Avis ら¹³⁾である。Avis らの精製方法はかなり複雑であるほか、その収量が非常に悪いという欠点をもっている。そのため通常、実験にはその精製の中間段階の標品を用いるに止まることが多かった。その後この方法に多くの改良が加えられた¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。

著者らは改良に改良を加え、その結果かなり効率がいよ分離、精製、結晶化法を求めることができた。その主要な改良点は精製の全過程において、キサンチン酸化酵素の燐酸カルシウムゲルに対する吸着能を利用したことにある。また得た純化酵素の物理的性質を測定し、Avis らのものと比較検討した。

B. 試薬とその組成

1. 粗酵素液溶出用溶液

一級燐酸ナトリウム溶液 (0.1 M) 30 l.

2. 燐酸緩衝液

特級または一級、燐酸第一ナトリウムおよび燐酸第二ナトリウムを混合して、0.1 M とし pH を 7.0 に調製する。

3. ピロ燐酸緩衝液

特級ピロ燐酸ナトリウムおよび特級濃塩酸で、0.1 M 液で、pH 8.3 になるよう調製する。

4. 燐酸カルシウムゲル (1)²⁰⁾

一級燐酸第二ナトリウム (0.2 M), 塩化カルシウム (0.3 M) のそれぞれ 16 l を、室温で、両者を 1:1 の容積比で混合する。混合により

酸性に傾むくため、アンモニア水を加えて、pH を 8.3-8.6 に保つ。これに約 30 l の脱イオン水を加え数時間静置したのち、上清をすてる。沈澱した部分は 10-15 l となる。ゲルの水洗は普通は 2-3 回行う。

5. 燐。酸カルシウムゲル (2)

特級燐酸第二ナトリウム (0.2 M), 特級塩化カルシウム (0.3 M), それぞれ 2 l を上述 (4.) の要領で混合し水洗して調製する。

C. 酵素活性の測定

精製を進める途中、たえず酵素活性を指標とした。酵素活性の表現には種々の方法が行われているが、そのうち Avis らの用いた方法がかなり一般的に採用されている。この方法はピロ燐酸緩衝液 (pH 8.3, 0.1 M, 23.5°C) を溶媒とする濃度約 1×10^{-4} M のキサンチンに酵素を添加したとき、生ずる尿酸量を $E_{295 \text{ m}\mu}$ を指標として求め、その 1 分間の変化をもって表わされる。今日では酸素電極法によって、溶液中の酸素の消費速度を測るのが便利であるから、次のように酸素消費量を比色法に換算できるように両者の対応関係を実測した。単位としては Avis の定めた単位 APR (activity protein ratio) で表わすようにした。

次のようにして $\Delta O_2(M)/\Delta t$ と $\Delta E_{295 \text{ m}\mu}/\Delta t$ の換算をした。

$$\Delta O_2(M)/\Delta t = \Delta[\text{キサンチン}](M)/\Delta t$$

$$= \Delta[\text{尿酸}](M)/\Delta t$$

$$\varepsilon_{295 \text{ m}\mu}(\text{キサンチン}) = 0.20 \times 10^4 \quad (19)$$

$$\varepsilon_{295 \text{ m}\mu}(\text{尿酸}) = 1.16 \times 10^4 \quad (\text{pH } 8.3)$$

であるから、

$$\begin{aligned} \Delta E_{295 \text{ m}\mu}/\Delta t &= \Delta[\text{尿酸}](M)/\Delta t \times \varepsilon_{295 \text{ m}\mu}(\text{尿酸}) \\ &\quad - \Delta[\text{キサンチン}](M)/\Delta t \times \varepsilon_{295 \text{ m}\mu}(\text{キサンチン}) \\ &= \Delta O_2(M)/\Delta t \{ \varepsilon_{295 \text{ m}\mu}(\text{尿酸}) - \varepsilon_{295 \text{ m}\mu}(\text{キサンチン}) \} \\ &= 0.96 \times 10^4 \cdot \Delta O_2(M)/\Delta t \end{aligned}$$

表 1 の結果から、これらの実測に用いるこの

Tab 1.

Der Vergleich zwischen verschiedenen Methoden die enzymatische Aktivität zu bestimmen.

Das praktische Vermessen ist mit () gezeichnet, das Wert mit * ist theoretisch berechnet.

	von Sauerstoff-Elektrode		Spektrometrie	
	23.5°C	38.0°C	23.5°C	38.0°C
Xanthin (8.8×10^{-5} M, pH 8.3)	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Xanthin Oxydase	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
$E_{450 \text{ m}\mu}$	17.7	17.7	0.177	0.177
$\Delta O_2(M)/\Delta t(\text{min})$	(1.06×10^{-4})	(2.46×10^{-4})		
$\Delta E_{295 \text{ m}\mu}/\Delta t(\text{min})$	1.02*	2.36*	(0.020)	(0.046)
$\Delta E_{295 \text{ m}\mu}/\Delta t \times (\text{Enz})$	2.99	6.92	2.94	6.75

程度の基質濃度および酵素濃度では、酸素電極法による値と比色法による値は等価とみなしてよいことを知る。

$$\left. \begin{array}{l} \text{反応速度 (38°C)} \\ \text{反応速度 (23.5°C)} \end{array} \right\} \begin{array}{l} = \frac{6.92}{2.99} = 2.32 \text{ (酸素電極法)} \\ = \frac{6.75}{2.94} = 2.30 \text{ (比色法)} \end{array}$$

38°C で大気圧のもとにあるキサンチン溶液あるいは酵素液中に含まれる酸素は 2.0×10^{-4} M/l と見てよいから、溶液中の全酸素を消費するに要する時間を $\tau(\text{min})$ とすると、

$$\Delta O_2(M)/\Delta t(\text{min}) = 2.0 \times 10^{-4} / \tau$$

故に $\Delta E_{295 \text{ m}\mu}/\Delta t(\text{min}) = 2.0 \times 10^{-4} \times 0.96 \times 10^4 / \tau$ Avis らは 23.5°C における $\Delta E_{295 \text{ m}\mu}/\Delta t(\text{min})$ の値を $E_{280 \text{ m}\mu}/\text{ml}$ で表わした溶液に含まれるキサンチン酸化酵素の濃度で除した値を APR と定めている。

従って測定に使用したキサンチン酸化酵素の $E_{280 \text{ m}\mu}/\text{ml}$ を $E_{280 \text{ m}\mu}$ とすると、酸素電極法で求めた場合の APR として次の関係が得られる。

$$\begin{aligned} \text{APR} &= 2.0 \times 10^{-4} \times 0.96 \times 10^4 \times \frac{1}{\tau} \\ &\times \frac{1}{E_{280 \text{ m}\mu} \times \frac{0.05}{2.60}} \times \frac{1}{2.3} = \frac{43.5}{\tau \cdot E_{280 \text{ m}\mu}} \end{aligned}$$

現在わたしらは APR で最高という値を示す酵素を得ている。

酵素活性の表わし方として、Avis らは APR の他に PFR (protein flavine ratio) すなわち酵素の $E_{280 \text{ m}\mu}/E_{450 \text{ m}\mu}$ を用いている。この方法は失活キサンチン酸化酵素を含めような酵素の新しい間は、APR と比例するはずであるか

ら, そのような条件を満たすような場合用いてよ
いだろう.

D. 精製順序

方法は大別して四段階に分けられる.

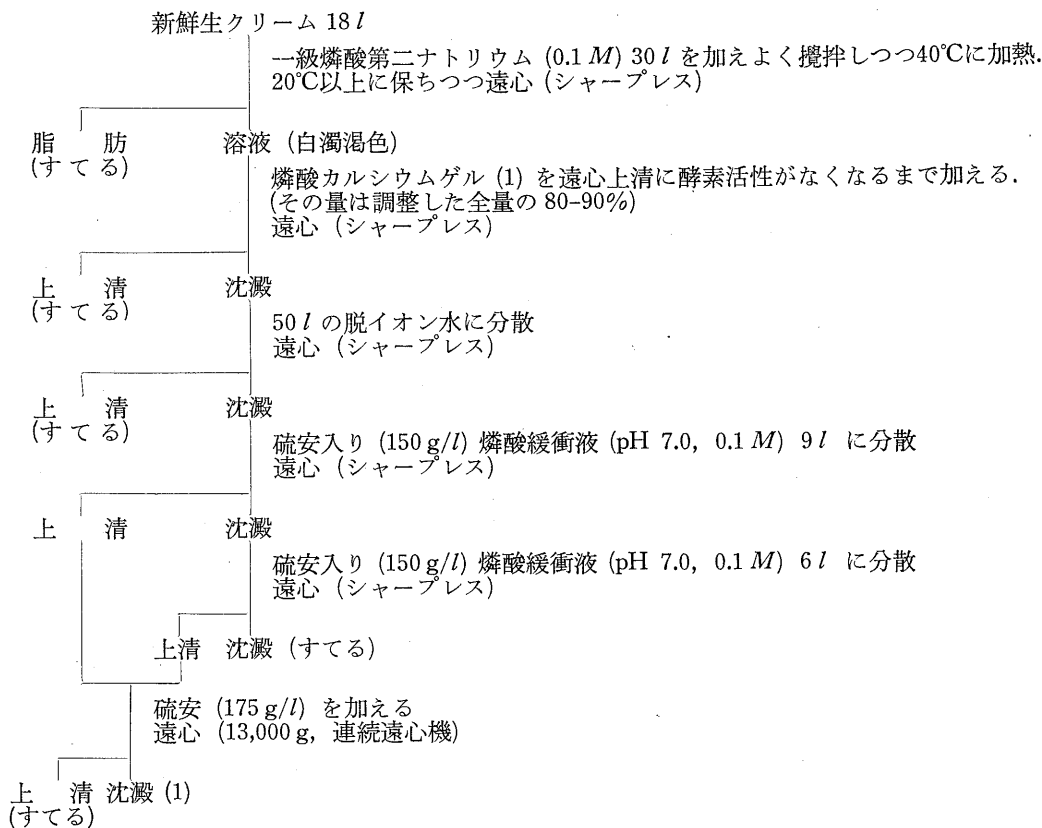
第一段階: 脂肪層からの溶出と脂肪の分離.

第二段階: 燐酸カルシウムゲルによる不純蛋白
よりの分離.

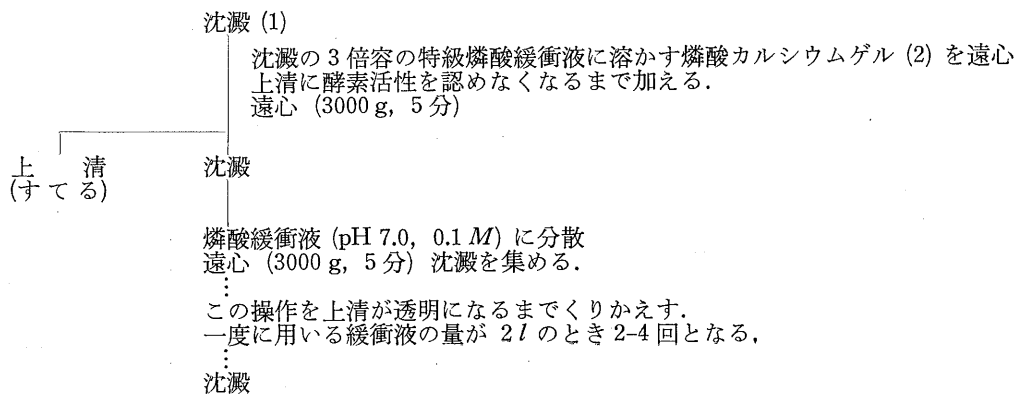
第三段階: 硫安分画による純化.

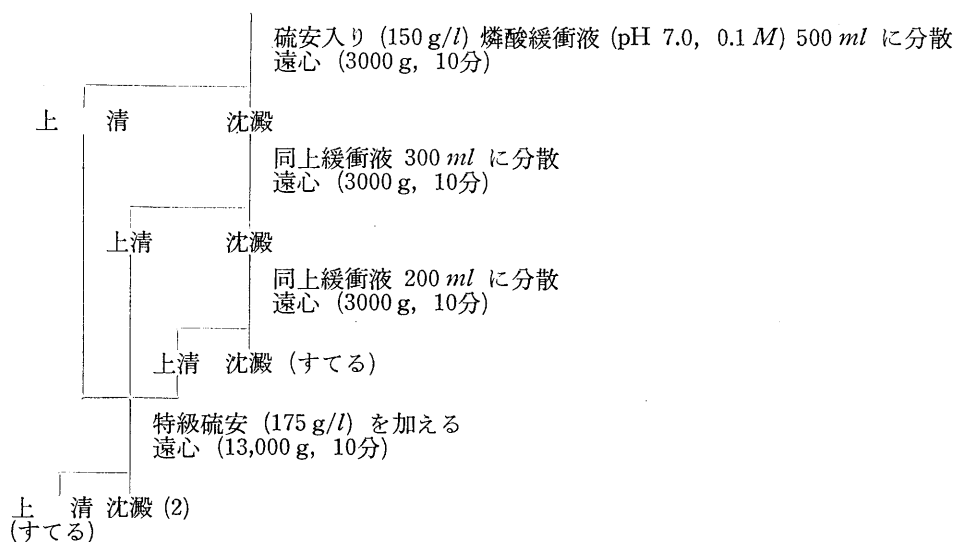
第四段階: 結晶化.

第一段階



第二段階





第三段階

沈澱 (1) または沈澱 (2) を特級ピロ燐酸緩衝液 (pH 8.3, 0.1 M) に溶かし、硫安飽和度 0.20-0.40 の間で 0.05 間隔で硫安分画をする (遠心は 13,000 g, 10分). 主分画は 0.30-0.35 飽和にある. ただし沈澱 (1) を分画する場合は, 第一段階において, 酵素を吸着したゲルの水洗を 2-3 回くりかえす. その分画は表 2 のようになる.

沈澱 (2) を硫安分画によって精製した場合は主分画の PFR は約 5 となるが, 沈澱 (1) の場合表 (2) のようになり, 純度を上げることができない.

第四段階

沈澱 (1) または沈澱 (2) を少量のピロ燐酸緩衝液 (pH 8.3, 0.005 M) に溶かし, ピロ燐酸緩衝液 (pH 8.3, 0.005 M) に対し透析する. 外液を交換して, 24 時間透析の後酵素液を蛋白濃度約 100 mg/ml になるように同緩衝液で調整する. 99% エタノールを加え, その濃度が 7-10% になるようにし, $-5 \sim -8^{\circ}\text{C}$ に保つと, 3-7 日で結晶が析出する.

各段階における酵素比活性 (APR, PFR) および生クリームに含まれる量を 100 として収率を示すと表 3 のようになる.

沈澱 (2) を用いると一度の結晶化によって, APR=15 の純度の酵素が得られるが, 沈澱 (1)

Tab 2.

Die Fraktionierung der Xanthin Oxydase von Ammoniumsulfat.

Ammoniumsulfat	PFR(E280 mμ/E240 mμ)
15-18 g/100 ml	7.4
18-21 g/100 ml	7.3
21-24 g/100 ml	5.9
24-27 g/100 ml	7.8

を用いた場合は再結晶すれば同純度の標品が得られる.

E. 精製法に対する考察

生クリームを脂肪と溶出液に分けるときの, 高温 (20°C 以上) で行っているが, 低温 (5°C 以下) で遠心すると, 溶出液と分離した脂肪は凝体となっており, 溶出液は前者よりやや透明であり, また脂肪に含まれる水溶液 (酵素液) が少いため収率がよい. しかし前者の方が作業が容易である.

第二段階の操作としてカラムクロマトグラフ法を用いてもよい. その場合は酵素液をあらかじめ特級燐酸緩衝液 (pH 7.0, 0.1 M) で透析しておく. 不純蛋白溶出には同緩衝液を用い, 酵素蛋白の溶出には硫安入り (150 g/l) 特級燐酸緩衝液 (pH 7.0, 0.1 M) を用いる. 燐酸カルシウムゲルは前述の方法で調整したものをを用いると, その粒子が小さいため流量/時間が非常に少なくなるから粒子の粗いハイドロキシアパタ



Abb. 1. Krystall der Xanthin Oxydase.

イト²¹⁾を使うのがよい。

APR 15 のものを得るには、結晶化によっても、あるいは硫酸分画によってもよい。たいていの場合には後者の方法によっている。

酵素活性の測定は尿酸の生成速度、あるいは酸素の消費速度をもつて測っても等価であるが、分光法では濁った試料（例えば生クリームや粗酵素液）では測定ができないのに反し、酸素電極法では濁りに関係なく測定される利点がある。しかし前者では酵素量は後者の約 $\frac{1}{100}$ で

たりる利点もある。

$$\text{附: } \frac{\text{反応速度 (38°C)}}{\text{反応速度 (23.5°C)}} \approx 2.3$$

に Arrhenius の式を適用すると、活性化エネルギー E は、

$$E = R \frac{T_1 T_2}{T_2 - T_1} \ln \frac{k_2}{k_1} \\ = 10.5 \text{ kcal となる。}$$

F. 精製法のまとめ

牛乳キサンチン酸化酵素の燐酸カルシウムゲルに対する吸着能を利用して、比較的簡単に収率よく酵素を精製できる。

Avis の定めた酵素活性は、すなわち 23.5°C におけるキサンチンが尿酸に酸化される速度で表わしたものの (APR) は、38°C での酸素消費速度から求められる。

G. キサンチン酸化酵素の至適 pH と FAD との結合定数

キサンチン酸化酵素の活性を酸素電極法によって測定して、溶液の pH を変えて、その反応

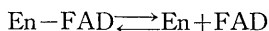
Tab 3.

Die Reinheit und die Ausbeute der Xanthin Oxydase bei jedem Reinigungsprozesse.

	PFR	APR	Ausbeute
Niederschlag (1)	7.7	12	53%
Niederschlag (2)	5.3	14	45%
Hauptfraktion der dritten Stufe (Niederschlag (1) ist gebraucht)	5.9	13	43%
Hauptfraktion der dritten Stufe (Niederschlag (2) ist gebraucht)	5.1	15	40%
Kristallbildung (Niederschlag (2) ist gebraucht)	5.1	15	42%

至適 pH が求められる。

緩衝液としてはピロリン酸緩衝液を用いたが、
 燐酸を用いた場合も同じ結果が得られる。電子
 受容体としてメチレン青を用いた場合も同様の
 結果である。pH 6.0-12.0 の間では FAD を添
 加しても活性に何の影響も及ぼさない。Km=0
 (pH 8.3, 38°C) の成績を考えると、pH 6.0-12.0
 の間では 38°C で Km=0 であり、



の平衡はほとんど左方にかたよっている。

H. キサンチン酸化酵素の構成成分の定量

FAD の定量は、酵素蛋白を変性させ、除蛋
 白した上清の FAD を分光的に又は酵素的に定
 量した。Mo は Perrin²²⁾ 氏法, Fe は Mellon²³⁾
 氏法, によって定量した。

$E_{450 \text{ m}\mu} = 3.100$ の酵素溶液に含まれる FAD,
 Mo, Fe の量はそれぞれ $7.64 \times 10^{-5} \text{ M}$, $6.25 \times$
 10^{-5} M , $3.05 \times 10^{-4} \text{ M}$ である。その比率 FAD:
 Mo:Fe=2:1.64:8.09 となる。この値は Avis
 らの方法で得られたものとよく一致する。

キサンチン酸化酵素 ($E_{280 \text{ m}\mu} = 1.320$, $E_{450 \text{ m}\mu} =$
 0.230) に含まれる N_2 は Kjeldahl 法により測
 定すると 0.161 mg/ml である。

蛋白に含まれる窒素を16%とすると、この酵
 素液は 1.006 mg/ml の蛋白を含む。従って、
 キサンチン酸化酵素溶液の蛋白量は次のように
 求められる。

$$\begin{aligned} \text{蛋白量} &= \frac{1.006}{1.320} \times E_{280 \text{ m}\mu} \\ &= 0.762 \times E_{280 \text{ m}\mu} \end{aligned}$$

$E_{450 \text{ m}\mu} = 1.0$ の酵素液に含まれる FAD の量
 は、 $7.64 \times 10^{-5} \frac{1}{3.10} = 2.46 \times 10^{-5} \text{ M}$ であり、
 最高純度の標品は PFR=5 であるから、この酵
 素溶液では $E_{280 \text{ m}\mu} = 5$ である。蛋白量は $5.0 \times$
 $0.762 = 3.81 \text{ mg/ml}$ となる。従って FAD 1 モ
 ルについて、

$$\frac{3.81}{2.46 \times 10^{-5}} = 1.55 \times 10^5 \text{ g}$$

あとに述べるように、この酵素の分子量は、

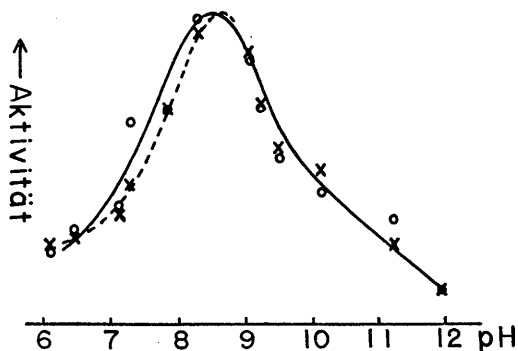


Abb. 2.

Der Einfluss von pH auf enzymatische Reaktionsge-
 schwindigkeit Die Zusammensetzung :

—○—○—	Xanthin Oxydase	0.10 ml
	Puffer (0.1 M, pH 6 12)	2.60 ml
	Xanthin (0.01 M)	0.05 ml
—×—×—	Xanthin Oxydase	0.10 ml
	FAD (1 mg/ml)	0.10 ml
	Puffer (0.1 M, pH 6 12)	2.50 ml
	Xanthin (0.01 M)	0.05 ml

$3.0-3.2 \times 10^5$ であるから、1 分子に FAD を 2
 ケ含むことになる。

I. キサンチン酸化酵素の物理的性質²⁴⁾

超遠心は日立 UCA を用い、超遠心的には単
 一であり $S = 1.0_1 \times 10^{-12}$ である。偏比容はピク
 ノメーターを用い $V_{20} = 0.77$. 粘度は Ostwald
 粘度計で測定し、固有粘度 5.9 である。拡散定
 数は日立電気泳動装置, Neurath 型セルを用い
 て得た。それを解析すると $D_{20w} = 3.40 \times 10^{-7}$ だ
 る。以上の結果から、 $S_{20w} = 1.05 \times 10^{-12}$, 分
 子量 $M = 3.27 \times 10^5$ 。

分子量は FAD の最少単位の考え方からし
 て、 1.55×10^5 の整数倍となっているが、この
 成績から 3.27×10^5 となっている。Avis の
 酵素で $3.0-3.2 \times 10^5$ という成績と同じであ
 る。

以上、得た定数を列挙すると表 4 のようにな
 る。

この流体力学的性質は Avis の成績とよく一
 致している。

Ⅲ. キサンチン酸化 酵素系の分光分 析による研究

A. まえおき

キサンチン酸化酵素の可視
部吸収スペクトルには、含ま

れる酸化型 FAD に由来する $450\text{ m}\mu$ の極大吸収が見られる。ところが酸化型と還元型の差のスペクトルは似ているが、完全には遊離の FAD のそれとは一致しない⁽⁶⁾⁽²⁵⁾。また Corran によるとキサンチン酸化酵素の $450\text{ m}\mu$ 光の吸収の強度は含まれている FAD の量に比較して約 2.9 倍であるから FAD 以外にも発色群があるとし、この発色群も酵素に含まれている Mo と関係づけようとしたけれど結論は得られなかった。Handler⁽²⁶⁾ らはキサンチン酸化酵素の吸収スペクトルと、それに含まれる FAD と当量の遊離 FAD の示す吸収スペクトルとの差スペクトルを求めた。それによると、これは $470\text{ m}\mu$ に吸収の極大をもち、 $420\text{ m}\mu$ に肩をもっている。そして FAD および Fe, Mo を含む他の蛋白、FAD と Fe を含むもの、非ヘム Fe を含むものの等の実測を基にして、キサンチン酸化酵素の FAD 以外の発色群は非ヘム鉄蛋白であると結論している。久保らは酵素の還元の際におこる可視部吸収スペクトルの変化から FAD とそれ以外の発色群を区別し、Mo によるものであらうという可能性を述べている。

Corran⁽⁶⁾ によるとキサンチン酸化酵素に嫌氣的に基質（キサンチンあるいはアルデヒド）を加えて吸収強度の減少速度を見ると、発色団の一部は速かに還元されるが、他の部分は 38°C で数時間を要するという。そして長時間後の吸収は hydrosulfite で還元したときの吸収スペクトルに一致することを見出している。これに対し Morell⁽²⁷⁾ は急速反応に対応する部分に対して活性酵素、遅速反応に対応する部分に対して不活性酵素と名づけ、還元型活性酵素が酸化型不活性酵素を還元すると解釈した。Bray⁽¹⁵⁾ らは 1 分子の中に FAD 2 ケをもち同時に Mo を

Tab 4.

Physiko-chemische Konstanten der Xanthin Oxydase.

Molargewicht	32×10^4	partielle spezifische Volume	0.77
FAD	2 M/M(Protein)	Eigenviskosität	5.9
Mo	2 M/M(Protein)	Diffusionskonstante	3.40×10^{-7}
Fe	8 M/M(Protein)	Sedimentationskonstante	1.05×10^{-12}
optimaler pH	8.5	Km (pH 6 12)	0

2 ケ含む酵素が最高の酵素活性をもつものと考え、彼のこれまでに得た酵素の最高の活性（活性/ $E_{450\text{ m}\mu} = \text{AFR}$ ）が 82 であり、 $2\text{Mo}/\text{FAD} = 1.4$

であるから真の最高の AFR は $82 \times \frac{2}{1.4} \doteq 117$

として求められると唱えている。しかし一方 Mo は含むが酵素活性をもたないものもあるといっている。結局、彼によるとキサンチン酸化酵素は次の三種の成分比をもつものの混合系であり、活性酵素は (1) だけで (2) および (3) は不活性酵素であるということになる。

- (1) Fe:FAD:Mo=8:2:2 (活性)
- (2) Fe:FAD:Mo=8:2:2 (不活性)
- (3) Fe:FAD:Mo=8:2:0

久保ら⁽³⁸⁾は Morell らのいう活性酵素に対応する可視部吸収スペクトルの変化と、不活性酵素に対応するそれとの間に、可視部吸収スペクトルが変化しない時期が数分-数十分あることを認めている。このように酵素の発色群の変化は二段階に起っているのに対し、基質の変化は一層性に变化しているため、この段のつくのは可視部に吸収スペクトルの変化を起さないような段階物質の還元が酵素内で起っているといっている。

この酵素に結合した FAD は基質の作用で還元されることは分光的に明らかである。Mo が還元されるかどうかについては Mackler⁽²⁵⁾ がその $\text{Mo}^{+6} \rightleftharpoons \text{Mo}^{+5}$ の変化の可能性があるとして述べて以来問題になっていたが、Bray⁽²⁹⁾ らがはじめて Mo^{+5} の出現を電子スピン共鳴吸収から証明した。

Fe については久保ら⁽³⁰⁾はキサンチン酸化酵素の可視部吸収の二段的変化より $\text{Fe}^{+3} \rightleftharpoons \text{Fe}^{+2}$ のおこることを推論した。また電子スピン共鳴

法, 磁化率の測定などから $\text{Fe}^{+3} \rightleftharpoons \text{Fe}^{+2}$ のおこることが証明されている¹⁹⁾³¹⁾³⁸⁾.

ここで起る問題は $\text{FAD} \rightarrow \text{FADH}$ と $\text{Mo}^{+6} \rightarrow \text{Mo}^{+5}$ と $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$ なる素反応が並列するものか, あるいは行列するものか, さらに行列するものとすればその順序はどうかということである. Bray³¹⁾ らは素反応は行列するものであり, その電子伝達経路は次のようであると述べている. すなわち, 基質 $\rightarrow \text{Mo} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{Fe} \rightarrow \text{O}_2$ 果して, Bray³¹⁾ らのいう通りであるか著者はこれを念頭において次のように分光分析による実験を行った.

B. 実験方法

1. キサンチン酸化酵素はさきにのべた方法で調製した. 酵素活性の表現には Avis³²⁾ らの定めた APR, PER 等を用いた.

2. 分光測定には Beckman-DK₂ spektrometer または日立自記分光光度計を用いた.

3. 溶液中の酸素圧の測定には自作の酸素電極を用いた.

4. 嫌気的実測には Thunberg 管に分光セルの附属したものを用い, ロータリー真空ポンプによる排気によって嫌気状態とした.

C. 実験成績

1. キサンチン酸化酵素の酸化型および還元型の可視部吸収スペクトル

嫌気状態でキサンチン酸化酵素にキサンチンを作用させると図3のように可視部の吸光度が減少する.

図3で酸化型の吸収スペクトルを (O) で, 還元型の吸収スペクトルを (R) で示し, その差スペクトルを (D) と記した.

このキサンチン酸化酵素溶液 (酸化型, $E_{450 \text{ m}\mu} = 0.8$) を熱処理または酸処理によって除蛋白して, その溶液の可視部吸収スペクトルを求めると図9の差スペクトル (D) とは形においても吸収強度においても異なっている. すなわち図4の (F) で示してあるがその形は FAD の吸収スペクトルと一致している.

酸化型の吸収スペクトル (O) から, この (F) を差引くと (O)-(F) となり, (O)-(F) と還元型

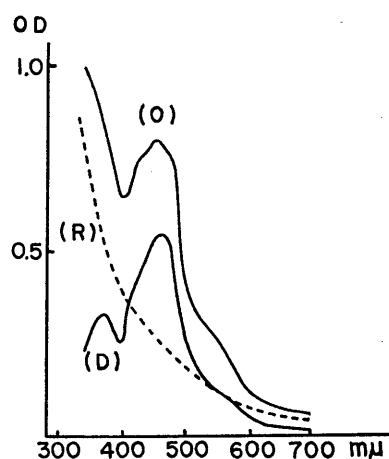


Abb. 3.

Das Absorptionsspektrum der Xanthin Oxydase.

Die Zusammensetzung:

Xanthin Oxydase	2.7 ml
(Pyrophosphat Puffer, pH 8.3, 0.1 M)	
Xanthin	0.3 ml
(0.3 ml)	

Temperatur: 20°C.

(O): oxydierte Form.

(R): reduzierte Form (100 Minuten nach dem anaerobischen Zusatz an Xanthin zur Xanthin Oxydase Lösung).

(D): das Differenzspektrum zwischen Spektrum (O) und (R).

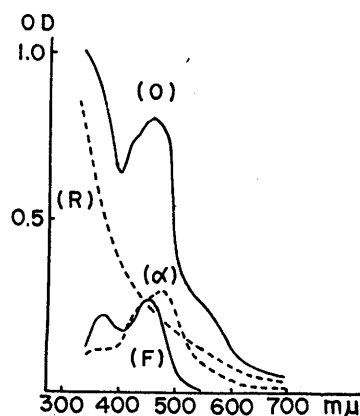


Abb. 4.

(R) との差スペクトルを (α) で示してある. すなわち吸収スペクトル (D) は (F) と (α) の和で表わされる.

2. キサンチン酸化酵素の還元と酸素圧の

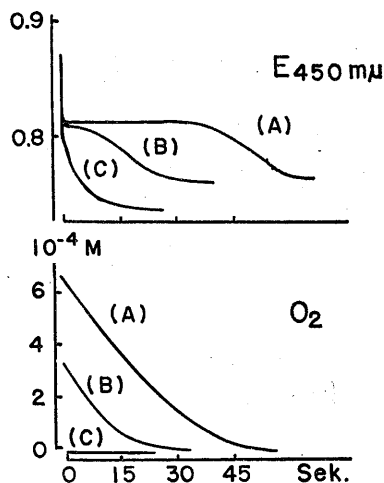


Abb. 5.

Die Veränderung von $E_{450\text{ m}\mu}$ und Sauerstoffdruck in der Xanthin Oxydase Lösung, die aus dem Zusatz des Xanthin darin resultiert (1).

Die Zusammensetzung :

Xanthin Oxydase	2.45 ml
(Citratpuffer, pH 5.5, 0.1 M)	
Hypoxanthin	0.05 ml
(0.02 M)	

Temperatur : 10°C .

Der Sauerstoffdruck ehe das Substrat in die Xanthin Oxydase Lösung hinzugefügt wird.

(A) : $6.52 \times 10^{-4} \text{ M}$

(B) : $3.35 \times 10^{-4} \text{ M}$

(C) : $0 \times 10^{-4} \text{ M}$

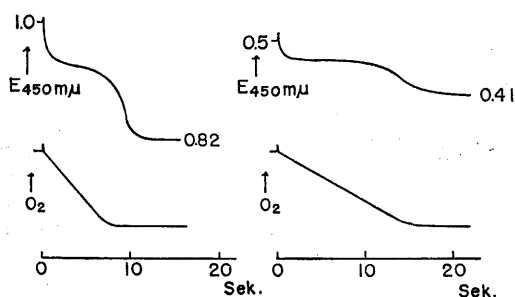


Abb. 6.

Die Veränderung von $E_{450\text{ m}\mu}$ und dem Sauerstoffdruck in der Xanthin Oxydase Lösung, die aus dem Zusatz des Xanthin darin resultiert (2).

Die Zusammenetzung :

Xanthin Oxydase	2.45 ml
(Pyrophosphatpuffer, pH 8.3, 0.1 M)	
Hypoxanthin	0.05 ml
(0.01 M)	

Temperatur : 12°C .

関係

好氣的条件下でキサンチン酸化酵素に基質を作らせると、キサンチン酸化酵素は還元され褪色し、溶液中の酸素は消費されてその濃度は漸次減少する。そのキサンチン酸化酵素の褪色するありさまを $E_{450\text{ m}\mu}$ の変化から観察し、酸素電極法により測定した溶液中の酸素圧の変化と比較した。

実験は三種の酸素圧で行った。酸素液と基質の両液に (A) では酸素ガスを15分間通じたものを、(B) では空気圧のもとで調製されたものを、(C) では酸素を除いた窒素ガスを15分間通じたものを用いた。その液中の酸素圧は酸素電極法で測定した。その値はそれぞれ $6.52 \times 10^{-4} \text{ M}$, $3.35 \times 10^{-4} \text{ M}$, $0 \times 10^{-4} \text{ M}$ 。

3. キサンチン酸化酵素の還元と酵素濃度との関係

キサンチン酸化酵素に好氣的条件下で基質を加えたとき、その基質の酸化される速度および電子受容体である酸素の消費される速度は適当な条件のもとでは酵素の濃度に比例する。これが満足される条件の範囲で酵素濃度を変えて、基質添加により変化する $E_{450\text{ m}\mu}$ と溶液中酸素圧を 2) の場合と同じようにして測定したのが図 6 である。

4. キサンチン酸化酵素の還元と基質濃度の関係

2) ならびに 3) の実験から、好氣条件下でキサンチン酸化酵素溶液にその溶液に含まれる酸素の量に対応する以上の量の基質を加えると $E_{450\text{ m}\mu}$ は二段に変化することが判った。溶存酸素量に対応する量より少量の基質を添加したときの $E_{450\text{ m}\mu}$ の変化を観察した (図 7)。

基質添加後 1 秒以内の $E_{450\text{ m}\mu}$ の変化は基質濃度の如何にかかわらず一定である。 10°C においては溶液に含まれる酸素の量は $3.35 \times 10^{-4} \text{ M}$ であり、これは $\frac{3.35 \times 10^{-4}}{2} = 1.68 \times 10^{-4} \text{ M}$ のヒポキサンチンの量に対応している。このことから酸素消費曲線と $E_{450\text{ m}\mu}$ 曲線の変化をあわせて考察すると $1.33 \times 10^{-4} \text{ M}$ 以下の基質の

濃度では溶液中の基質が酸素により酸化されてしまうと同時に酵素は再酸化され、 $2 \times 10^{-4} M$ の場合は酸素を消費してしまってなおあまりある基質によって酵素が還元されて更に褪色するものといえる。

溶液中の基質あるいは酸素（基質濃度 $2 \times 10^{-4} M$ のとき）を消費するに要する時間でそ

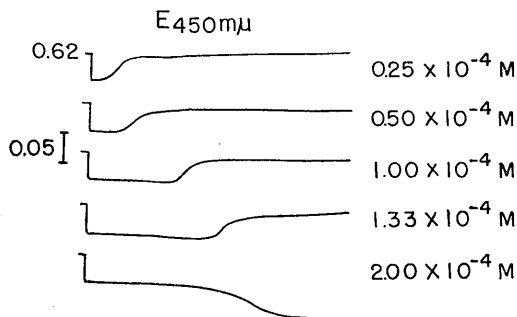


Abb. 7.

Das Verhältniss zwischen Substratkonzentration und die Veränderung von $E_{450 m\mu}$ der Xanthin Oxydase Lösung bei der Reduktion.

Die Zusammensetzung :

Xanthin Oxydase ($E_{450 m\mu} = 0.633$) 2.45 ml
(Pyrophosphatpuffer, pH 8.3, 0.1 M)
Hypoxanthin 0.05 ml
($2.5 \times 10^{-5} M - 2.0 \times 10^{-4} M$)

Temperatur : $10^\circ C$.

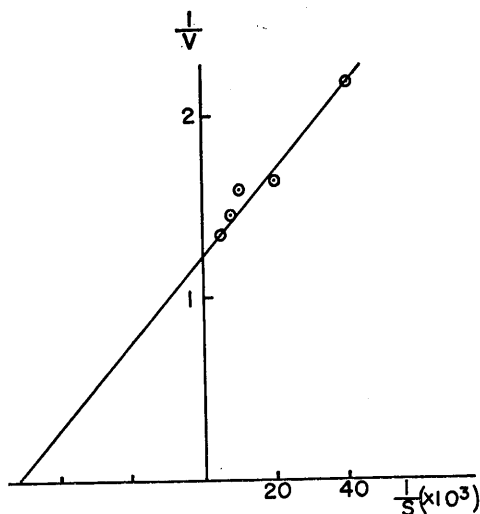


Abb. 8.

Die Bestimmung von K_m zwischen Xanthin Oxydase und Hypoxanthin.

の時間内に消費される基質の量を除した値を反応速度として求め Lineweaver-Burk のプロットをすると図8となる。

図8から計算すると $K_m = 1.9 \times 10^{-5} M$ となる。図には表わさなかったが $38^\circ C$ の場合は $K_m = 8 \times 10^{-5} M$ が得られる。

5. キサンチン酸化酵素の酸化型、中間状態および還元型の差スペクトル

以上の実験から溶液中に酸素の存在するとき、基質を添加すると、酸素圧の充分高いとき褪色する成分と無酸素状態になってはじめて褪色する成分の二種のものより成立っていることが判った。これは $E_{450 m\mu}$ の変化が一時おこらない中間状態により区別される。第一の成分と第二の成分の吸収スペクトルを求める目的で、酵素濃度を小さくして反応速度を遅くし中間状態の存在時間を延長させて、中間状態の吸収スペクトルを得た。図9にキサンチン酸化酵素の酸化型を(O)、還元型を(R)、中間状態を(I)とし、それぞれ差スペクトル(O)-(I)、(I)-(R)を示してある。

(O)-(I) は $450 m\mu$ に吸収の山をもち、(I)-(R)

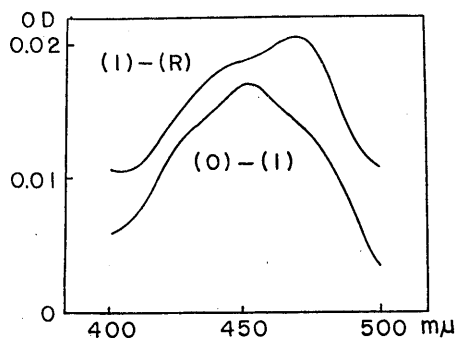


Abb. 9.

Die von der Reduktion begleitete Veränderung des Absorptionsspektrums der Xanthin Oxydase.

Die Zusammensetzung :

Xanthin Oxydase ($E_{450 m\mu} = 0.120$) 2.45 ml
(Pyrophosphatpuffer, pH 8.3, 0.1 M)
Hypoxanthin 0.05 ml
(0.01 M)

Temperatur : $10^\circ C$.

(O)-(I) : Das Differenzspektrum zwischen oxydierte Form und Zwischenform.

(I)-(R) : Das Differenzspektrum zwischen Zwischenform und reduzierte Form.

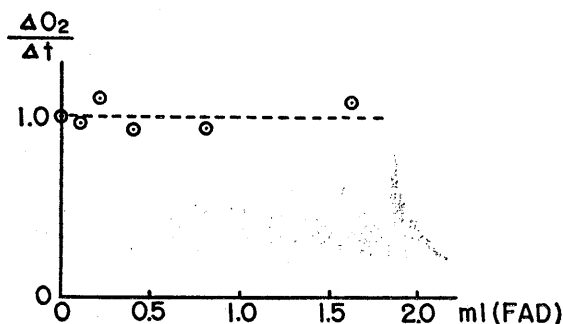


Abb. 10.

Der Einfluss des Zusatzes von FAD auf die enzymatische Aktivität der Xanthin Oxydase.

Die Zusammensetzung :

Xanthin Oxydase	0.1 ml
Xanthin (0.01 M)	0.05 ml
Pyrophosphatpuffer (pH 8.3, 0.1 M)	2.6-1.0 ml
FAD (0.2 mg/ml, pH 8.3)	0-1.6 ml

Temperatur : 38°C.

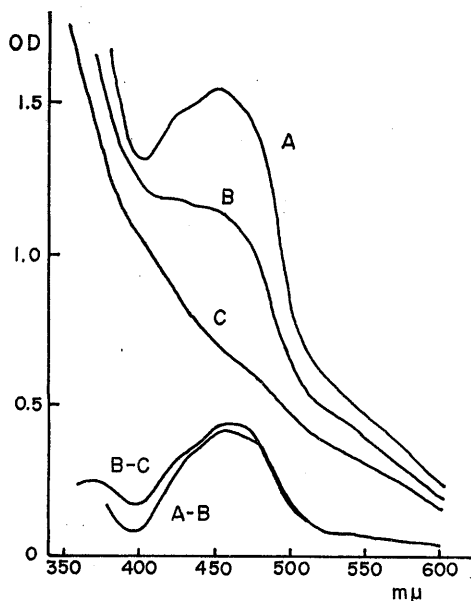


Abb. 11.

Die von der anaerobischen Reduktion begleitete Veränderung des Absorptionsspektrums der Xanthin Oxydase.

Die Zusammensetzung :

Xanthin Oxydase	0.4 ml
Pyrophosphatpuffer (pH 8.3, 0.1 M)	2.3 ml
Adenin (0.01 M)	0.5 ml

(A) : Die oxydierte Form.

(B) : Die Zwischenform.

(C) : Die reduzierte Form.

(A)-(B) : Das Differenzspektrum zwischen (A) und (B).

(B)-(C) : Das Differenzspektrum zwischen (B) und (C).

は 470 mμ に山をもち 430-440 mμ に肩をもっている。(O)-(I) は 500 mμ ではその吸収強度はほとんど零であるが、(I)-(R) は吸収がありこれより長波長側に吸収があることを示している。

6. 酵素活性に対する FAD 添加の影響

キサンチン酸化酵素に含まれる FAD と蛋白との結合の強さをしらべる目的で、酵素活性におよぼす FAD (添加) の効果をしらべた。

FAD を添加しないときの酸素消費速度(酸素電極法によって測定)を 1.0 として表わすと図10のようになる。図のように FAD が $0-1.6 \times 10^{-4} M$ の間ではその添加の効果はない。すなわち、本酵素標品の中に遊離のアポ蛋白を含んでいないこと、そしてそれはまた FAD と酵素蛋白の結合定数が大きいことによると考えられる。今日までに苦心されながらこの酵素のアポ酵素だけを離し得ないことと照応させられる。

7. 蛋白に結合した FAD の嫌氣的還元

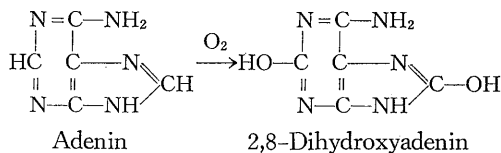
嫌氣的条件でキサンチン酸化酵素に基質あるいは還元剤を作用させると可視部の吸光度は変化する。

図11で (A) は酸化型の吸収スペクトル、(B) は基質混合直後の吸収スペクトル、(C) は 150 分後の吸収スペクトルである。この可視部吸収強度の変化を $E_{450 m\mu}$ で代表させて時間的にしらべると図12のようになる。

図のように $E_{450 m\mu}$ の変化は二段階になり、Morell らのいう rapid reaction と slow reaction の間に吸収スペクトルの変化しない状態 (B) が認められる。

酵素の変化を $E_{450 m\mu}$ でしらべると同時に基質がどのように変化するかしらべた。

アデニンは酵素の作用により、



と変化する. pH 8.3でDihydroxyadenin は $\lambda_{\max}=303 \text{ m}\mu$, $\epsilon_{303 \text{ m}\mu}=1.5 \times 10^4$ であり, Adenin は $\epsilon_{303 \text{ m}\mu}=0$ であることが判っている. 酵素に Adenin を加えたとき $E_{450 \text{ m}\mu}$ と $E_{303 \text{ m}\mu}$ を同時に測定し, その時間的変化を求めた (図13).

$450 \text{ m}\mu$ においては緩衝液に対する吸光度を, $303 \text{ m}\mu$ において一定量の蛋白溶液に対する吸光度を測定した, 前者を $E_{450 \text{ m}\mu}$, 後者を $E_{303 \text{ m}\mu}-C$ と記す.

$t=0$ のとき, $E_{450 \text{ m}\mu}=0.875$,

$E_{303 \text{ m}\mu}-C=0.724$

$t=125(\text{min})$ のとき, $E_{450 \text{ m}\mu}=0.495$,

$E_{303 \text{ m}\mu}-C=1.225$

$\Delta E_{450 \text{ m}\mu}=0.875-0.495=0.380$

$\Delta(E_{303 \text{ m}\mu}-C)=1.225-0.724=0.501$

前述のように $\Delta E_{450 \text{ m}\mu}$ のうちFADに基因する

部分はその $\frac{1}{2}$ である, その値は $\frac{0.380}{2}=0.190$.

FAD の $\epsilon_{450 \text{ m}\mu}=1.1 \times 10^4$ であるから, この変化量は $0.190/1.1 \times 10^4=1.73 \times 10^{-5}$ になる. 従って, この酵素液ではFADは $1.73 \times 10^{-5} M$, Mo は $1.73 \times 10^{-5} M$, Fe は $6.92 \times 10^{-5} M$ 含まれていることになる. 一方 Dihydroxyadenin は $\epsilon_{303 \text{ m}\mu}=1.5 \times 10^4$ であり, $\Delta(E_{303 \text{ m}\mu}-C)=0.501$ から見てその変化量は $0.501/1.5 \times 10^4=3.34 \times 10^{-5} M$ である.

いま $\text{FAD} \rightarrow \text{FADH}_2$, $\text{Mo}^{+6} \rightarrow \text{Mo}^{+4}$, $\text{Ee}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$ の反応が完全に右にづれたとき, その各々の変化によって取入れる電子の数は,

$\text{FAD} : 1.73 \times 10^{-5} \times 2 \times \text{NI}$

$\text{Mo} : 1.73 \times 10^{-5} \times 2 \times \text{NI}$

$\text{Fe} : 6.92 \times 10^{-5} \times \text{NI}$

全体の和は: $13.84 \times 10^{-5} \times \text{NI}$

(ただし, Nはアボガドロ数, l は試料の体積) となる. 一方 Adenin-Dihydroxyadenin の反応によって取り出した電子は, $3.35 \times 10^{-5} \times 4 \times \text{NI}=13.36 \times 10^{-5} \text{NI}$, 基質としてキサンチンを用いた場合,

キサンチン $\rightarrow$ 尿酸

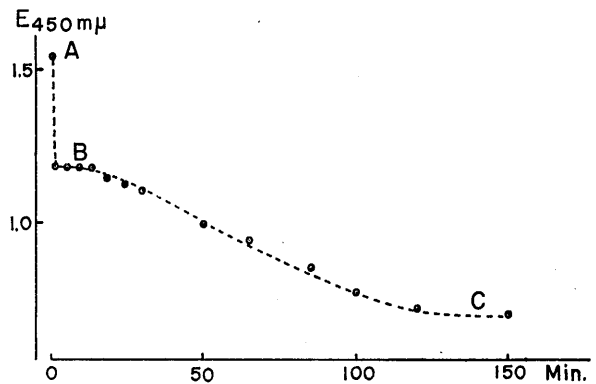


Abb. 12.

Die von der anaerobischen Reduktion begleitete $E_{450 \text{ m}\mu}$ -Veränderung der Xanthin Oxydase Lösung.

Die Zusammensetzung ist eben so gleich wie beim vorigen Bild.

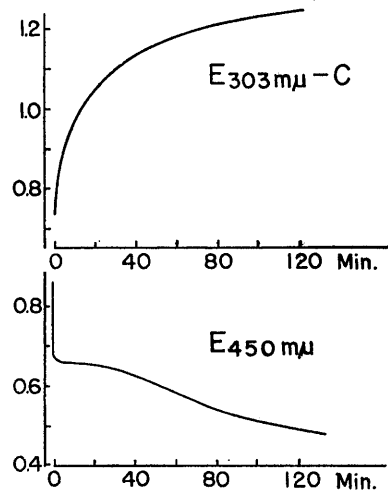


Abb. 13.

Die von der anaerobischen Reduktion begleitete $E_{450 \text{ m}\mu}$ -Veränderung der Xanthin Oxydase Lösung und der Grad der Oxydation von Substrat.

(1)

Die Zusammensetzung :

Xanthin Oxydase	0.4 ml
Pyrophosphatpuffer (pH 8.3, 0.1M)	2.3 ml
Adenin (0.01 M)	0.5 ml

の変化がおこる. 基質の変化を $290 \text{ m}\mu$ 光吸収強度の変化から観測し, $E_{450 \text{ m}\mu}$ の変化と比較したのが図14である.

$t=0$ のときの $E_{290 \text{ m}\mu}$ の値は次のようにして求めた, キサンチン酸化酵素液(主室)の $290 \text{ m}\mu$

の吸収は基質をまぜる前は 1.270 である, これに基質溶液が加わると酵素液は薄まりその吸収

は $1.270 \times \frac{2.8}{3.1} = 1.147$ となる. 一方加わったキサンチンの濃度は $10^{-3} \times \frac{0.3}{3.1} = 9.67 \times 10^{-5} M$ で,

$\epsilon_{290 m\mu} = 1.8 \times 10^3$ であるから, キサンチンによる $E_{290 m\mu}$ への寄与は $9.67 \times 10^{-5} \times 1.8 \times 10^3 = 0.174$ である. この両者の和は $1.147 + 0.174 = 1.321$ で, これが $t=0$ における $E_{290 m\mu}$ である.

$t=0$ のとき $E_{450 m\mu} = 0.270$, $E_{290 m\mu} = 1.321$

$t=60(\text{min})$ のとき $E_{450 m\mu} = 0.150$, $E_{290 m\mu} = 1.545$

$\Delta E_{450 m\mu} = 0.120$

$\Delta E_{290 m\mu} = 0.224$

$\Delta E_{450 m\mu}$ のうち FAD によるものは, その

$\frac{1}{2}$ で, $0.120/2 = 0.060$, すなわち $0.060 \times$

$\frac{1}{1.1 \times 10^4} = 5.45 \times 10^{-6} M$. 従ってこの酵素に

含まれる Mo は $5.45 \times 10^{-6} M$, Fe は $21.80 \times 10^{-6} M$ である.

$FAD \rightarrow FADH_2$, $Mo^{+6} \rightarrow Mo^{+4}$, $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$ の反応が完全に右に進んだとすると, 全体として, 取り入れる電子の数は, 基質として Adenin を用いたときと同様に計算すると $4.36 \times 10^{-5} \times Nl$ となる. 一方基質の変化によって取り出される電子の数は次のように算出される.

pH 7.2 では $\epsilon_{290 m\mu}$ (キサンチン) $= 1.8 \times 10^3$ (32)

$\epsilon_{290 m\mu}$ (尿酸) $= 12.2 \times 10^3$

であり $\Delta E_{290 m\mu} = 0.224$ であるから変化した

キサンチンの量は $0.224 \times \frac{1}{12.2 \times 10^3 - 1.8 \times 10^3} =$

$2.16 \times 10^{-6} M$. 1 分子のキサンチン酸化酵素が尿酸に変わるとき取出される電子の数は $2N$ であるから, この場合 $2.16 \times 10^{-6} \times 2 \times Nl = 4.32 \times 10^{-6} \times Nl$ 個の電子を取り出している.

アデニン, キサンチンで嫌氣的にキサンチン酸化酵素を還元すると, 含まれる FAD, Fe^{+3} , Mo^{+6} は $FADH_2$, Fe^{+2} , Mo^{+4} になると考えられる.

D. 考 察

キサンチン酸化酵素を基質 (嫌気) あるいは還元剤で還元した場合, その酸化型と還元型のスペクトル差は FAD の吸収スペクトルとはかなり異なっている (図 3). その差スペクトルはそれに含まれる FAD と他の発色群に分けられる (図 4). 後者は $470 m\mu$ に吸収の山をもち $430-440 m\mu$ に小さな肩と, $370 m\mu$ と $550 m\mu$ にゆるやかな肩をもっている. これは還元によって褪色し, 酸化によって復色する. 酵素標品が変わっても前者と後者の吸収の形は変わらず, 吸収強度は $450 m\mu$ においてほぼ等しい.

今問題を二つに分けて考える. それは Morell の言った, 速反応について, と遅反応についてである.

まずはじめに速反応について考える.

速反応というのは, 嫌気条件で, プリンまたはアルデヒドを基質として ($NADH$ を基質とした場合は二相性の変化は見られない) 酵素に加えたとき, ただちに变化するものであり, そ

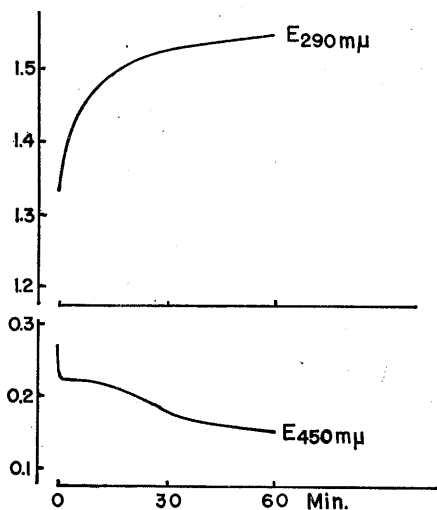


Abb. 14.

Die von der anaerobischen Reduktion begleitete $E_{450 m\mu}$ -Veränderung der Xanthin Oxydase Lösung und der Grad der Oxydation von Substrat.

(2)

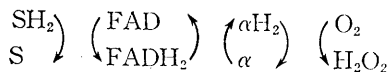
Die Zusammensetzung :

Xanthin Oxydase	0.3 ml
Phosphatpuffer (pH 7.2, 0.1 M)	2.5 ml
Xanthin (0.01 M)	0.3 ml

の吸収スペクトルの変化はキサンチン酸化酵素の $E_{450\text{ m}\mu}$ の約 $\frac{1}{3}$ を占めている (図11, 図12).

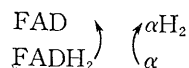
この反応速度は速く、好気的条件下においても、基質の量が溶有酸素に対し充分多ければ、溶液中の酸素を消費してしまつて、速反応による変化はすみやかに起る (図5, 6, 7). この変化に対応した、酸化型と還元型のスペクトル差は嫌気で求められたスペクトル (図11) とほぼ一致する. このことから、この差のスペクトルを FAD によるものと、他の発色群によるものの二種の合成であると予想ができる. 事実、図9, 図4のように二成分に分けることができた. すなわち $450\text{ m}\mu$ に吸収極大をもつものは FAD であり、 $470\text{ m}\mu$ に極大をもち $430\text{--}440\text{ m}\mu$ に肩をもつものは他の発色群である、吸収強度もそれを支持している.

好気条件下で基質を添加したとき、FAD はただちに還元され、その後、酸素が消費される. 溶液に含まれる酸素の量に対応した基質の量より少い量の基質を用いたとき (図7), 初期に FAD は一旦ほぼ完全に還元され、溶液中の基質が消費されると、再び酸化されるという経過をたどる. これは FAD の還元される速度が非常に速く、しかも FADH_2 が酸素に対し反応性に欠けているか、あるいは小であると考えられる. それに反して、他の発色群 (α) はその還元型が酸素に対し、非常に反応性に富むため、酸素の存在する間は $\alpha \rightleftharpoons \alpha\text{H}_2$ の反応で、逆反応 ($\leftarrow$) が優勢であり、反応 (平衡) が左方にかたよった状態を保っていると考えられる. すなわち主として、



の反応によって基質が酸化されている.

Avis の方法で酵素反応速度を測定した際、どの反応が律速段階であるかといえは、



であり、酵素反応速度が酸素圧にほとんど関係しないのも、これで説明される.

Gutfreund³³⁾ はキサンチンを基質として、 $E_{450\text{ m}\mu}$ の変化を測定し、その反応は一次反応であり、好気の場合 $k=10.5\text{ sec}^{-1}$ 、嫌気の場合 32 sec^{-1} (25°C) と求め、酸素圧の低いほど k が大きくなるといっている. これは好気の場合は $\text{FAD} \rightarrow \text{FADH}_2$ の反応の速度定数を求めたことになっているが、嫌気の場合は $\text{FAD} \rightarrow \text{FADH}_2$ と $\alpha \rightarrow \alpha\text{H}_2$ の両反応が合さった見かけ上の速度定数を求めた事になる. 今、彼の成績を FAD と α の二者に区別して、初期の変化を $\text{FAD} \rightarrow \text{FADH}_2$ に、後期の変化を $\alpha \rightarrow \alpha\text{H}_2$ に対応させて考えると.

$$k_{\text{FAD}} = 10.8\text{ sec}^{-1}$$

$$k_{\alpha} = 32\text{ sec}^{-1}$$

となり、 k_{FAD} に関しては好気の場合も嫌気の場合もほぼ等しい速度定数を得られる.

Bray¹⁵⁾ Gutfreund の成績から得られる k_{FAD} を用いて $\Delta E_{295\text{ m}\mu} / \Delta t(\text{APR})$ を算出するとその酵素活性が大きな値を取ると述べているが、それも当然であると思われる.

図5で k_{FAD} は求められないが、 k_{α} は次のようになる.

$$k_{\alpha}(\text{O}_2=0) = 0.26\text{ sec}^{-1}$$

$$k_{\alpha}(\text{O}_2=3.35 \times 10^{-4}\text{ M}) = 0.27\text{ sec}^{-1}$$

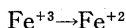
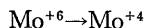
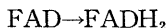
$$k_{\alpha}(\text{O}_2=6.25 \times 10^{-4}\text{ M}) = 0.30\text{ sec}^{-1}$$

この値は三者ともほぼ等しいと考えられる.

第2に遅反応に関係している部分について考える.

遅反応による部分の吸収スペクトルの変化は速反応による部分のそれとほぼ一致している. これについても、速反応の場合と同様に FAD と α の二つの成分に分けて考えるのが妥当である. 酸素の還元に伴う吸収の変化を $E_{450\text{ m}\mu}$ で代表させて、時間的变化をしらべると、図12, 13, 14のように二段階の変化をする. この変化に対応して基質の変化を観察すると (図13, 14) 両者は平行しない. これは酵素蛋白内で FAD, α 以外の非発色群が還元しているためと考えてよい.

酵素に含まれる FAD, Mo, Fe がすべて.



の変化をしたとすると, ちょうど酸化された基質の量に一致するからこの仮定は正しい.

従って, 発色群としては FAD と α があり, この α が Mo かまたは Fe であるということになる.

図13の実験成績を次のように整理する.

$$\Delta E_{303 \text{ m}\mu} - t \text{ のかわりに } \Delta E_{303 \text{ m}\mu} \times$$

$$\frac{4}{\epsilon_{303 \text{ m}\mu}(\text{hydroxyadenine})} - t$$

$$\Delta E_{450 \text{ m}\mu} - t \text{ のかわりに } \Delta E_{450 \text{ m}\mu} \times$$

$$\frac{2}{\epsilon_{450 \text{ m}\mu}(\text{FAD})} - t$$

のプロットをすると図15のようになる.

これは $\alpha \rightarrow \alpha\text{H}_2$ は $\text{Mo}^{+6} \rightarrow \text{Mo}^{+4}$ であり, $450 \text{ m}\mu$ において, $\epsilon_{450 \text{ m}\mu}(\text{Mo}^{+6}) - \epsilon_{450 \text{ m}\mu}(\text{Mo}^{+4}) \div 1.1 \times 10^4$ と仮定して, $E_{450 \text{ m}\mu}$ および $E_{303 \text{ m}\mu}$ を電子あたりに換算したものである. すると (S)-(E) の記号をつけた曲線は $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$ に相当している, その変化量は酵素に含まれる量とちょうど合う.

α を Mo とせず Fe とすれば (E) は $\Delta E_{450 \text{ m}\mu} \times \frac{2}{1.1 \times 10^4}$ のかわりに $\Delta E_{450 \text{ m}\mu} \times \frac{3}{1.1 \times 10^4}$ と

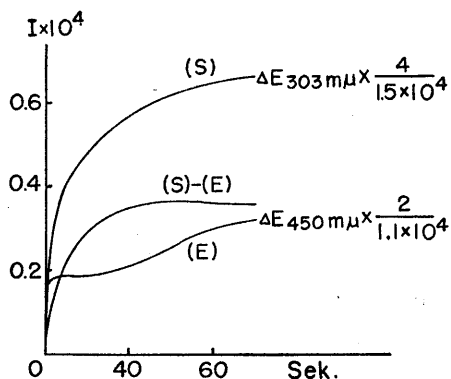


Abb. 15.

Die Analyse der $E_{450 \text{ m}\mu}$ -Veränderung und der Substrat Oxydation, die aus dem anaerobischen Zusatz des Substrates in die Xanthin Oxydase Lösung resultieren.

なる. この場合, (S)-(E) は一度増加して後減少するという経過になる. これは 100 min の点において, Mo^{+6} はすべて Mo^{+4} になっているという事実と反する.

以上のことから, この酵素内における電子伝達は, 嫌気的条件下において.



となっていると推論ができる. Morell の表現による不活性酵素は (FAD-Mo) にあたり, 活性酵素は [FAD-Mo] にあたる. こうすると Bray らの電子伝達経路の想定は上のように改めるべきものである.

E. まとめ

1. キサンチン酸化酵素は基質により還元されて可視部吸光度は減少する.

2. 可視部に吸収をもち, 還元によって褪色するものは, 蛋白に結合した FAD と Mo の化合物である.

3. 基質から電子を受取るはじめの因子は FAD であり, FADH_2 は分子状酸素と反応しにくい. 主として脱水素の働きをしている.

4. Mo^{+6} の化合物は蛋白に結合した状態で $470 \text{ m}\mu$ に吸収の山をもつ. Mo の還元型は酸素との反応性が高く, この部位が酸化酵素の働きを担っているものと考えられる.

5. 活性酵素から, 不活性酵素への電子移動は Fe を介して行われている.

IV. キサンチン酸化酵素の電子スピン共鳴による研究

A. まえおき

液相反応において, 化学変化のごく初期の不安定な物質を, 短い時間で観察しようとする試みが Hartridge³⁴⁾ によってなされてから, 色々の方法があみ出されてきた. その後一般的化学反応のみでなく, 酵素反応の測定にも利用されるようになった³⁵⁾³⁶⁾³⁷⁾. このような速反応の測定には, その材料と測定方法によってその応用の方法が異なってくる. 電子スピン共鳴吸収の

測定には、その材料の状態によって、常温水溶液材料と、凍結（あるいは乾燥粉末）材料がある。溶液の場合は流速を変えずに測定するとき、測定には時間がかかっても、その測定部位における状態は一定である。しかし流速が変化する場合、その測定部位において時間的に変化するため、ある一定の時刻における状態を知るには測定に要する時間を短くする必要がある。キサンチン酸化酵素を材料とする場合は多量が必要とする前者は不可能で、後者の特定の場合であるところの流れを停止して、それ以後の変化を時間的に観測するという方法が主として用いられている。凍結標本の場合は反応は停止しているので、測定には充分時間をかけることができる。しかし反応を限られた時間で停止して、その状態を安定に保つ必要がある。

この速反応測定法によってキサンチン酸化酵素の酵素反応の初期の変化を観察し、キサンチン酸化酵素系における電子伝達の機構を明らかにする目的で実験を行った。

B. 水溶液状態で速い反応の測定法

この方法は常温（0℃以上）で水溶液状態にある試料の吸収を、反応進行中のある一定の時刻に、要求されるだけ短い時間内に測定しようとするものである。ESR 水溶液用偏平セルを用い、これに従来から分光測定によく用いられている stopped flow method を併用すればよい。

1. 測定セル及び混合装置

現在考案されているものに、普通の水溶液セルの上部に混合器を取りつけたものがある。これは反応液の混合部位より、測定部位までの死腔の体積がかなり大きい。そのために、反応開始後短時間の状態を観測するには、かなりの流速が必要となる。ESR 吸収強度の大きいもの、あるいは溶液が水でなくマイクロ波を吸収しないような溶媒のときは、死腔を小さくできる円柱セルを用いても充分測定ができるが、私たちの常用する材料では、感度を高める必要上濃度を上げねばならない、しかし、これには限度があり、測定には偏平セルを用いることが必要となる。

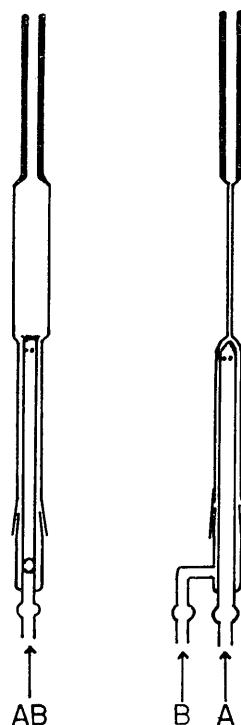


Abb. 16.

ESR-Messgefäß für Schnellreaktion bei der normalen Temperatur Zwei Bilder sind Seitenabrisse des Gefäßes von einer und anderer senkrechten Seite. Zwei Lösungen (A) und (B) werden von jedes Eingang nach oben hinein fließen lassen, dann mischen sich die zwei eins am unteren Ende des platten Messgefäßes und die gemischte Flüssigkeit geht im Gefäßss empor. Vom oberen Ende aus, das Ausgang ist, wird die Flüssigkeit nach ansseu durch das Gummi-Rohr geführt.

死腔の体積を V_0 、流速を v とすると、単位体積の試料が反応開始より（混合部位より）吸収測定（測定部位に達する）までの時間を t とすると、それは $t_0 = V_0/v$ である。

t を小にするには v を大きくする必要がある。等加速度的に流速が零から上昇し、 v に達するまでに流出する液体の容積を V とすると、

$$v = \sqrt{2\alpha V} \quad (\alpha \text{ は加速度})$$

従って V は v^2 に比例し、 v を大きくすると、 V が大きくなる、すなわち材料を多量に必要とする。

私たちの実験に用いる酵素材料は、その量に

において制約をうけるため、死腔の体積を小さくする工夫をする必要がある。このためにまず図16のように、吸収測定部位に近接して、二種の液を混合するようにした。

図16に示されているように、二種の液の混合を完全にするため細い溝状のすき間を通過した後、偏平セルの中を流れるようにした。

死腔の体積は 0.10 ml 、流速（最大流速）は 2.0 ml/sec である。従って $t_0 = \frac{0.10}{2.0} = 0.05 \text{ sec}$

となる。これは吸収測定部位が厳密に一点であると考えてのことである。実際の測定値は死腔の体積を $V_0 \pm \Delta V_0$ として求めねばならぬ。測定値は偏平セルの高さ 1.5 cm の間の平均であるとする、セルの厚さは 0.0261 cm 、巾は 0.900 cm であるから $\Delta V_0 = 0.0261 \times 0.900 \times \frac{1.5}{2} = 0.0176$ (ml) となる。従って、これだけの体積の間を流

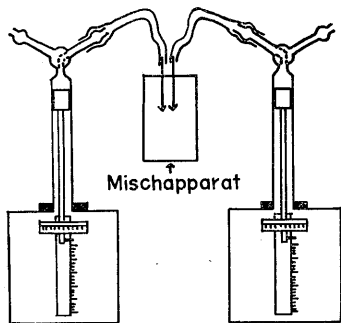


Abb. 17.

Motor für den sogenannten "rapid-flow-method"

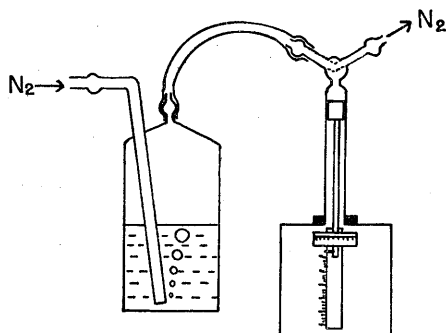


Abb. 18.

Die Methode zur Deoxygenierung für "rapid-flow-method"

れるに要する時間は $0.0176/2.0 = 0.009(\text{sec})$.

結局流れを瞬間的に停止させ、その後 $t \text{ msec}$ の時刻における測定値は $t + 50 \pm 9 \text{ msec}$ の点における値となる。この場合、水の粘度による管路内における流速の不均一ということは考慮していない。 $t=0$ のとき、すなわち $50 \pm 9 \text{ msec}$ というのは反応開始後の測定可能な最短の時間である。

2. 二種の液を流出させる動力源

メトローム製ピストンビューレットを用いた。流速は $0.1\text{--}2.0 \text{ ml/sec}$ の間で連続的に変化できる。シリンダーからセルまでの導管は硬質塩化ビニール管を用いる。

シリンダーの中に両液を嫌気状態に入れると、嫌気での実験ができる。それは次のようにする。

図18のように洗気ビンのガスの出口をシリンダーの一方の口と連絡し、窒素ガスを洗気ビンの入口より通ずると、小気泡となって液の中を通り、シリンダーのもう一方の口より出て、連結されている吸収セルの中を通り外に出る。適当な時間通気すると、洗気ビンの中の溶液は完全に嫌気状態になる。シリンダー内部の酸素は数回（約10回）洗気ビン側より気体を吸引して、出口の方に追い出す操作をくりかえすとぬける。セルの内部は N_2 が流れ、出口への通路となっていて嫌気状態になる。出口よりの酸素ガスの逆流をふせぐため、水銀弁をつけるか、あるいはその先端を緩衝液の中に入れておく。

なお、この窒素ガスは市販のガスを高温還元銅および還元サフラニン溶液に通じて酸素を完全に除去したものを用いる。

系全体が完全に嫌気になると、ガスを止め洗気ビンを倒立させてシリンダーに液を吸入する。内圧が外気圧に対し陰圧になるような操作は極力さける。

3. 磁場固定による ESR 吸収強度の時間的変化の測定

この方法は、分光分析で、一波長に固定して、その波長における光透過度の変化を測定するのと同じ方法である。すなわち ESR 吸収

(微分型)の山の位置に磁場を固定して, stopped flow method により, 反応開始後の吸収強度を時間的に追跡するやり方をする. この場合はある一定の磁場における吸収強度を知るだけである. そのため多波長分光器, あるいは rapid scanning spectrometer が要求されるのと同様の理由により, ESR も二種以上の磁場の位置で, 同時にその吸収を測定する試みをした.

4. 二種の磁場における ESR 吸収の同時的測定および時間的変化

ESR 吸収測定の空洞は図19のように磁場の中におかれていて, その磁場における吸収強度を測定する.

この空洞に外接して図19のようにコイルを固定してこれに電流を通ずると, 外部固定磁場にこのコイルによる磁場が加算される. コイルに通ずる電流を矩形波で与えると, それによって生ずる磁場は矩形で変化する.

ESR 吸収の山が二つあるとき図20のように外部固定磁場を一方の吸収の山の位置に固定し, コイルに通ずる電流の強さを適当にして交換磁場の巾を第二の吸収の山の位置に一致するようにする. 変換の周期は, その変換の巾によって異なるが, キサンチン酸化酵素の実験では, 矩形波の形がくづれないために, 80 cycle とした. 試料は 80 cycle の周期で二種の磁場の中におかれることになる. これに同期して, それぞれの磁場の強さに対する吸収強度をシンク

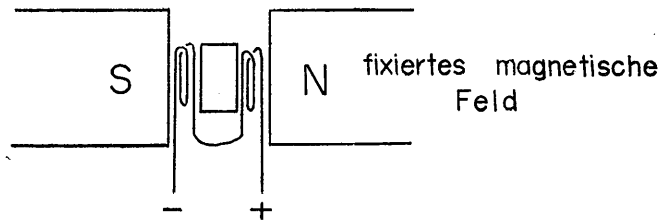


Abb. 19. ESR Absorptionshöhle und beiseitig fixierte Feder

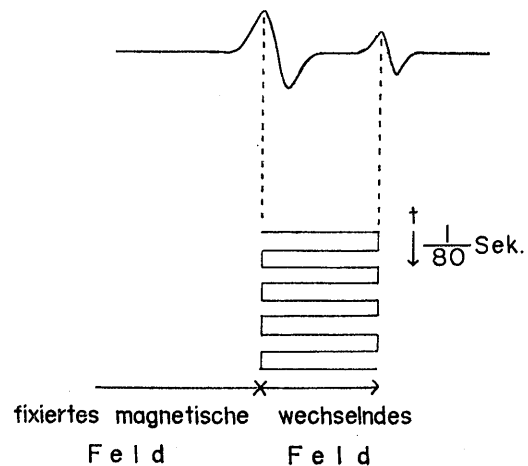


Abb. 20.

Methode das magnetische Feld in der hohen Frequenz zu wechseln

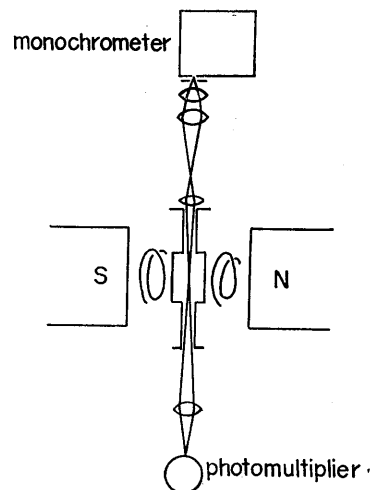


Abb. 21.

Das Stammbild die ESR-Analyse und Photometrie gleichzeitig zu bringen

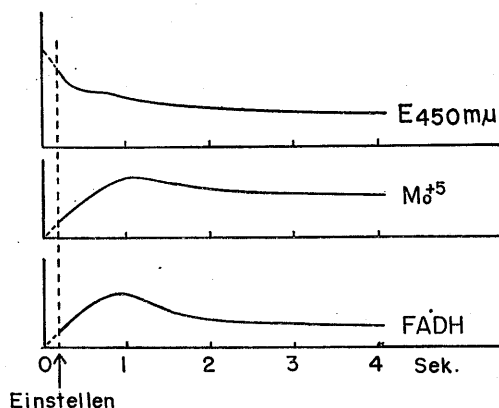


Abb. 22.

Ein Beispiel die ESR-Analyse und Photometrie gleichzeitig zu bringen

Die oxydierte Xanthin Oxydase zeigt keine ESR-Absorption anders als breite Absorption ($\Delta H = 200$ gauss) von Fe^{+3} . Wenn das Substrat in die Xanthin Oxydase Lösung zugefügt wird, erscheinen zwei

Absorptionen von $FADH$ ($g=2.00$) und Mo^{+5} ($g=1.96$). Die Intensität dieser ESR-Absorptionen werden gleichzeitig gemessen, und auch $E450 m\mu$ mit der Methode von Abb. 21. Jede Werte sind relativ.

Die Zusammensetzung :

Xanthin Oxydase	$E450 m\mu = 15$
Hypoxanthin	$8 \times 10 M$
(Pyrophosphatpuffer, pH 8.3, 0.1 M)	

Temperatur : $18^\circ C$

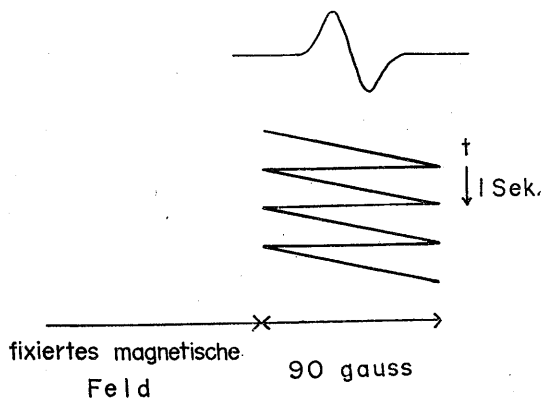


Abb. 23.

Die Methode das magnetische Feld graduell in der hohen Frequenz zu wechseln

ロスコープで記録する。ブラウン管にあらわれた明点を解放シネカメラで撮影すれば、その吸収強度の変化を時間的に連続して記録できる。

この ESR 吸収セルは光路 0.0261 cm の光学セルにもなっているため、この装置で通光できるようにして、光透過度を同時に測定できる。既製の通光性空洞を用いて図21のように光束を通し、その透過度の変化を測定した。

ESR の測定感度は、光吸収測定のそれに対し $\frac{1}{100}$ ぐらいである。光吸収と同じ程度

の感度を得ようとすれば、現在の ESR 測定器では S/N がかなり小さくなる。反応速度が速いものであれば短い時間で測定する必要があり、そのために S/N が小さく、それに反し速度の遅い反応では充分の積分回路を利用できて S/N は良くなる。この方法による実験例を図22に示す。

ESR の S/N をあまり小さくしない配慮から、時定数が、この実験に要求されるものより大きくなるのは止むを得ない。このことから、図22で Mo^{+5} , $FADH$ の吸収の変化は全体を $200\text{--}300 \text{ msec}$ 左方にづらして考えた方がよいと思われる。吸収強度の小さい試料では反応速度の遅いものでないと都合が悪い。ただし S/N を大きくする手段の一つとして磁場変換をせず、磁場固定であれば2-3倍の S/N を得るだろう。

5. 高速磁場掃引法による ESR 吸収の時間的変化の測定

前述の高速磁場変換法で用いた補助コイルに鋸歯状波電流を通ずると、図23に示すように電流の強さの変化中に相当した巾で磁場が直線的に変化する。その周期は変化磁場の大きさによって異なるが、その鋸歯状波の形がくづれぬ程度にしなければならぬ。90 gauss 巾のときは 1 cycle/sec とした。

この方法では連続的磁場変化の1周期に対応して、1回 ESR 吸収の波形を観測できる。

前述の高速磁場変換法が2波長分光器に対応しているのに対し、この高速磁場掃引法は rapid scanning spectrometer にあたっている。吸収の形を或る範囲において、短時間にくりかえし (1 cycle/sec) 測定できるのは大きな利点である。

一方高速磁場変換法のところで述べたと同様の理由により S/N が小さい上に、磁場掃引の追従の問題が加わって観察の周期が長くなる。従って、吸収強度の大きいほど、また反応速度が遅いほど、その利用価値が増大する。

この方法による実験例を図24に示す。

6. 考 察

ESR 水溶液用 偏平セルを用いた場合は分光と同時に測定が可能である。短時間に ESR 吸収を測定する方法 (stopped flow method) は ESR 測定の感度によってかなり制約をうける。材料の量の点で解決されるなら continuous flow method によって測定できるので感度はずっと上げ得る。その中間的やり方、すなわち、流速を連続的に変化させる方法はよいと思われる。

C. 凍結法による速反応 ESR 吸収測定法

前述の常温による方法では感度の点で大きな不利をまねいている。それに反して、凍結法は測定に充分時間をかけることができるのと、低温のために感度はずっとよくなる。

1. 撈拌法

一番単純な方法で、ESR 吸収測定用円柱セル内で、二種の液を重層して、非反応性物質の棒で両液を撈拌して、一定時間後に、液体窒素の中に入れて凍結し反応を停止させる。この場合、二種の液に比重差がなければならぬ。二種の液の中間の比重をもった緩衝液を両者の間に重層するとなおよい。撈拌によって反応が開始せられるが、それによって酸素を消費する

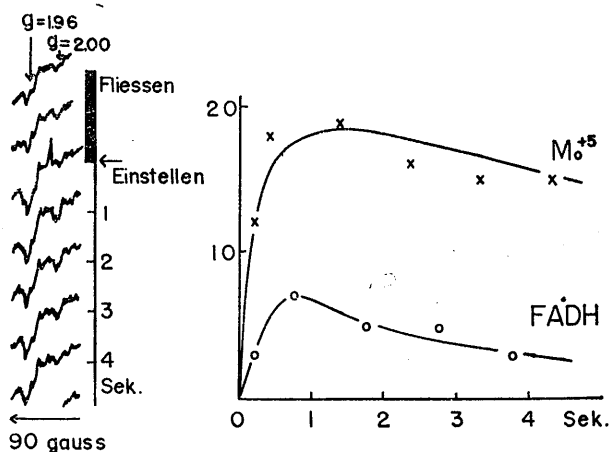


Abb. 24.

Ein Beispiel die ESR-Analyse in kurzer Zeit zu bringen

Die Zusammensetzung : Xanthin Oxydase E450 μM = 15
Hypoxanthin $8 \times 10^{-3} \text{ M}$
(Pyrophosphatpuffer, pH 8.3, 0.1 M)

Temperatur : 18°C

場合であれば、撈拌を完全にすればするほど空気中の酸素にふれさせることになる。この反応開始時刻の不確かさと、酸素の問題を解決したのが次の方法である。

2. rapid flow-流出-凍結法

Bray は二種の液が混合してのち、チューブの中を一定の距離流れるようにし、その混合後の流れる距離によって、反応開始後の時間 (反応停止まで) をきめるようにした。流出口を冷試験管内に入れておくと、混合液が流出すると同時に凍結する、これは氷の粒になるので円柱セルにつめて吸収を測定するというやり方をした。

私たちは、図25のように、二重ガラス管の内管と外管に二種の液を流し、填出する先端の部分で撈拌され、円柱セルの中に反応液がたまっていくようにした。

円柱セルの底に二重管の先端をできるだけ押しつけると、両液は非常にせまいすき間を填出してくるのでよく混合する。10-20 cm ほどの高さまで混合液がたまると、動力源は動かしたまま円筒セルを下方に抜き取る。この抜き取りの時刻が反応開始時刻となる。その後一定時間後

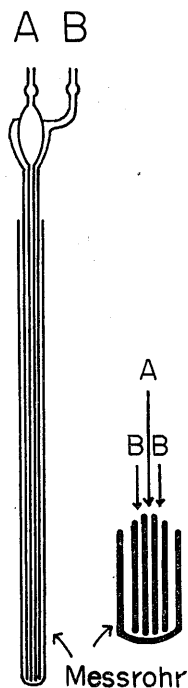


Abb. 25.

Schnell-Flieβn-Gerät (1)

Zwei Lösungen (A) und (B) werden von jedes Eingang hinein fließen lassen, dann mischen sich die zwei eins am Ende des Rohrs und die gemischte Flüssigkeit fließt zwischen dem äußeren Messrohr und dem inneren Flieβenrohr empor. Das Messrohr wird ausgezogen, als die Flüssigkeit darin genügt ist, und nach bestimmter Zeitlang wird das Rohr in den flüssigen Stickstoff eingetauscht.

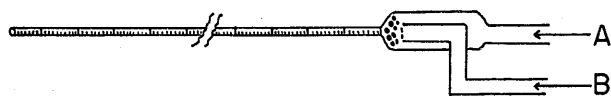


Abb. 26.

Schnell-Flieβn-Gerät (2)

Zwei Lösungen (A) und (B) werden von jedes Eingang hinein fließen lassen, dann fließt die gemischte Lösung in das Messrohr.

Man tauscht das Gerät in den flüssigen Stickstoff, wie die Flüssigkeit fließt. Der Knüppel des Reaktionsproduktes wird in mäßiges Stäbchen gebrochen in dem flüssigen Stickstoff, und man messt jede beim niedrigen Temperatur.

に液体窒素またはドライアイス・アセトンの中にすばやく入れる, その時間が反応停止までの時間となる. このようにした場合, 空気にふれているのは円筒セルにたまった液体のごく上部の方だけだから, 測定部位である円筒セルの底部では酸素の溶け込みの影響は全然ない.

一般に用いられている円筒セルの内径は, 2.5-3.0 mm である. いま, たとえば内径 3 mm のセルを用いたとすると, 流出量は 2 ml/sec であるから, このセルの中に混合液のたまって

いく速度は $\frac{2.0}{\pi(0.15)^2} \approx 29$ (cm/sec). この円筒セルの底部から 1.5cm の高さまでたまるに要する

時間は $\frac{1.5}{29} = 0.052$ sec. 底部より 0.75cm の

ところを中心にして, 吸収を測定するとすれば, t sec で凍結させたなら $t + \frac{0.052}{2} \pm \frac{0.052}{2}$ sec で反応を停止させたことになる.

流出停止後, 凍結までの時間 (反応開始後, 反応停止までの時間) の測定は, 1 sec 以内であれば, 円筒セルを抜き取るときショック音が出るようにし, また液体窒素に入れたとき, 音があるので, この音をテープレコーダーに記録して正確に測れる. また 8 ミリカメラで撮影しても正確に測れる. キサンチン酸化酵素の実験の場合, それまでの正確さを必要としなかったのでストップウォッチを用いた.

3. rapid flow-同時的動力源の停止と凍結

図26のように, 二種の液を混合して細いチューブ (テレックス製) の中を流れるようにする. 一定の速度で流出させたまま, このチューブを水平に保持して, 液体窒素の中に入れる. それと同時に液体窒素に入れたショックで動力源が停止するようにしておく.

チューブの太さの氷柱ができる. この氷柱を液体窒素内で一定間隔に切断すれば, 反応開始後一定時間を

において反応を停止させた試料が得られる。

チューブの内径を 2 mm とすると、流速が 2.0 ml/sec であれば、チューブ内を進む液の

速度は $\frac{2.0}{\pi \times (0.1)^2} = 63.7 \text{ cm/sec}$ となる。

死腔の体積は水溶液セルの場合より小さくできて、その体積を 0.05 ml とすると、 $\frac{0.05}{2} =$

0.025 sec より測定ができる。ただし、測定値は 1.5 cm の長さの平均と考えられるから

$0.025 \pm \frac{1.5}{63.7} \times \frac{1}{2} = 0.025 \pm 0.013 \text{ sec}$ 以後

の時間で 20–30 msec 間隔で測定できる。

この切断した氷柱の試料を ESR 測定用円筒セルに入れ、低温で測定する。

4. 考 察

常温で水溶液セルを用いた方法では分光と同時測定が可能であるのに対し、凍結法では同時測定ができない。しかし凍結法では ESR の感度が非常によい、そのため試料の濃度を淡くして、反応速度を遅くして実験することができ。反応速度が遅ければ、同一の実験条件で、分光測定することが比較的簡単で、その再現性もよい。すなわち分光の実験と、ESR の実験を、同時測定でなくても、同一の実験条件で別々に行ない、それを対応させて、同時測定の実験と同等にあつかえる。stopped flow 法では ESR の感度が悪いことが大きな障碍となっており、後者の方がかえってよい実験精度を得るようなことが少くない。キサンチン酸化酵素の実験はちょうどこの例である。

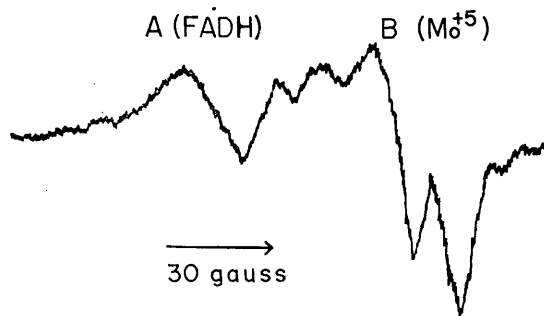
凍結法を 1, 2, 3, と三つの方法をあげたが、そのうち 1 は別として、2, 3, について考えてみる。

2. の場合 $t + 0.026 \pm 0.026 \text{ sec}$

3. の場合 $t + 0.025 \pm 0.013 \text{ sec}$

の時間で反応を停止させることができる。2 の場合、円筒セルの太さを 3 と同じように 2 mm とすると $t + 0.013 \pm 0.013 \text{ sec}$ となり、死腔が小さくなり 3 に比べて有利である。

2 は 3 に比べて操作が簡単である、例えば 3



Mod. : 6 gauss

Abb. 27.

ESR-Absorption, die aus dem Zusatz des Substrates resultiert

Die Zusammensetzung :

Xanthin Oxydase ($E_{450 \text{ m}\mu} = 14$) 0.27 ml

Hypoxanthin 0.03 ml

(Pyrophosphatpuffer, pH 8.3, 0.1 M)

Temperatur : -196°C

では、用意がめんどうであるばかりでなく、液体窒素内でこれを切断するのは、非常にやりにくい作業であるからそのための誤差が生ずる。

2 では 1 本 1 本の試料は別々に作られる、これに対し 3 では、連続的に変化したものを観察できる。しかし理論的には $\pm 13 \text{ msec}$ の誤差は両者とも同じである。2 ではその各時間を写真判定 (或は taperecoder 判定) するならばかなりの精度を期待できる。それゆえ 3 の場合のチューブ内を流れるときの流体力学的に生ずる誤差および切断時に入る誤差を考慮すれば、2 の方が時間軸に対する誤差は少いであろう。2 では実験に応じて、セルの太さを簡単にかえることができる、秒以上の実験になればセルの太さを大きくし、ESR の感度を上げられる。

総合的にみて、便利さの点において 2 の方が利点が多い。

D. キサンチン酸化酵素系の電子スピン共鳴吸収の解析

1. 材料および方法

キサンチン酸化酵素は第一編の要領で抽出し結晶直前まで純化したものを用いた。

ESR 測定には Varian X and EPR spectrometer を用いた。

ESR 吸収の測定は前に述べた短時間の変化測定法によった。

2. 実験結果

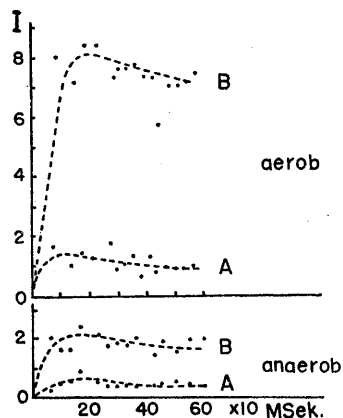


Abb. 28.

Die von der Reduktion begleitete Veränderung der ESR-Absorption der Xanthin Oxydase

Die Zusammensetzung :

Xanthin Oxydase (APR=14.4)

$E_{450\text{ m}\mu} = 10.5$

Hypoxanthin $5.5 \times 10^{-4} M$

(Pyrophosphatpuffer, pH 8.3, 0.1 M)

Reaktionstemperatur : 14°C

Messtemperatur : -196°C

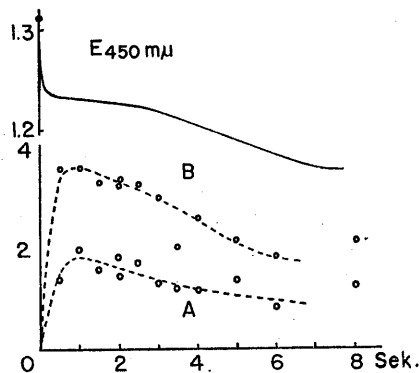


Abb. 29.

Die von der aerobischen Reduktion begleitete Veränderung der ESR-Absorption und $E_{450\text{ m}\mu}$ der Xanthin Oxydase Lösung.

Die Zusammensetzung :

Xanthin Oxydase $E_{450\text{ m}\mu} = 1.30$

Hypoxanthin $2.0 \times 10^{-4} M$

(Pyrophosphatpuffer, pH 8.3, 0.1 M)

Reaktionstemperatur : 18°C

Messtemperatur : 18°C (Photoabsorption)

-196°C (ESR-Absorption)

キサンチン酸化酵素に、基質あるいは還元剤を適当量加えると、酸化型では見られなかった吸収が見られる (図27)。

吸収 (A) は $g=2.00$ で FADH であり, 吸収 (B) は $g=1.96$ で Mo^{+5} である。

a. 還元剤 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) による還元

還元剤で酵素を還元すると、その還元剤の量に応じて、その吸収強度は変化する。たとえば少量の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を酵素液に加えると両吸収 (A), (B) が現われる。多量に加えると両吸収とも消失するが、空気を吹きこんで酸化すると両吸収は出現し、更に酸化を進めると両吸収とも再び消失する。これは



の反応が起り、 FADH と Mo^{+5} のみが ESR 吸収を示し、他の FAD , FADH_2 , Mo^{+6} , Mo^{+4} は吸収を示さないために起る現象と考えられる。

b. 基質による還元 (1)

基質で還元すると、還元の進行に伴って、吸収 (A), (B) の強度が変化する。吸収の時間的な変化を前述の rapid flow 同時的動力源の停止と凍結法によって求めた。好気と嫌気の二種の条件で実験を行った。好気の実験では大気圧低下で調製した試料をそのまま用いた。嫌気の場合は前述のように、酵素液および基質液に窒素ガスを 3-5 時間通じて溶液と全容器の中の酸素を窒素におきかえた。その実験結果を図28に示す。

c. 基質による還元 (2)

キサンチン酸化酵素が還元されると、可視部吸収スペクトルに変化が見られる。この変化と ESR 吸収 (A), (B) の強度の変化を同時に観察する。そのためには、前述のように、常温で ESR 水溶液用吸収セルを用いて、rapid flow のやり方によって、同時測定する方法がある。しかし、この方法では、そこで述べたように現在のところ用いている試料の ESR 感度が低いので、充分満足できるような結果を得られるに到っていない。そこで、flow 凍結法と分光分析を別々に、同一の実験条件で行って、両者を対応

させる方法を取った。この場合、反応速度が速いと、実験誤差が大きくなるので、可能なだけ反応を緩やかにするため、酵素濃度を小さくした。ESR は rapid flow 流出凍結の方法によった。分光は日立自記分光光度計を用いた。結果は図29のようになった。

d. 基質による還元 (3)

溶液に含まれる酸素を消費するには不十分な分量の基質を用いて c と同じ方法で ESR 吸収の変化を測定した。ただし、図30に示すように、分光的方法を用いず酸素電極法により酸素圧を測り、この変化と ESR 吸収の変化を比較した。

e. 基質による還元 (4)

嫌氣的条件で基質により還元した場合の ESR 吸収の変化を長時間にわたって観察した。ESR 吸収セルの Thunberg 管型になったものを用いた。

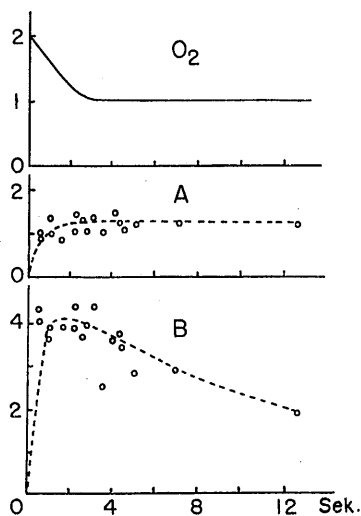


Abb. 30.

Die von der aerobischen Reduktion begleitete Veränderung der ESR-Absorption und des Sauerstoffdrucks der Xanthin Oxydase Lösung

Die Zusammensetzung :

Xanthin Oxydase $E_{450\text{ m}\mu} = 2.6$

Hypoxanthin $2 \times 10^{-4} M$

(Pyrophosphatpuffer, pH 8.3, 0.1 M)

Reaktionstemperatur : 0°C

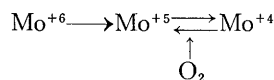
Messtemperatur : 0°C (Sauerstoffdruck)

-196°C (ESR-Absorption)

このように長時間を要する変化は、Morell のいう遅反応に対応したものである。図31で判るように、両吸収は数十分で吸収強度最高に達し、その後は漸次減少する。長時間経過後、酸素にふれさせると、セミキノンの増加と Mo^{+5} のいちじるしい増加がみられる。

3. 考 察

分光的研究から、キサンチン酸化酵素の速反応で、FAD が脱水素酵素の働きを、Mo が酸化酵素の働きを担っているといった。図28で、好気のときは嫌気のときに比べて FADH の吸収強度が大きい。しかし、それにもまして Mo^{+5} の吸収強度は非常に大きい。これは酸素の存在下では、



の反応が起るため、嫌気のときに比べて、 Mo^{+5}

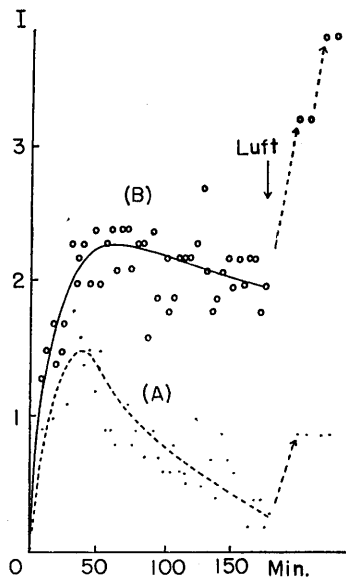


Abb. 31.

Die von der anaerobischen Reduktion begleitete Veränderung der ESR-Absorption der Xanthin Oxydase

Die Zusammensetzung :

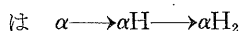
Xanthin Oxydase (PFR = 6.0) $6.5 \cdot 10^{-4} M$

Hypoxanthin $5.0 \times 10^{-3} M$

(Pyrophosphatpuffer, pH 8.3, 0.1 M)

Temperatur : 30°C

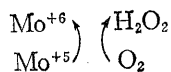
の吸収が大きくなるのだろうと考えられる。この考えは、ちょうど、470 m μ に吸収極大をもつ物質 α が酸素圧が高い間は $\alpha \rightarrow \alpha\text{H}_2$ の反応が起らず、嫌気ではじめて $\alpha \rightarrow \alpha\text{H}_2$ が進行すると考えたのに対応する。すなわち、



と一致する。酸素が存在するとき、 $\text{FAD} \rightarrow \text{FADH}_2$ の反応は進行するが、 $\alpha \rightarrow \alpha\text{H}_2$ は起らないと考えたが、この事実から、初期の速い FAD の還元に伴ってただちに $\alpha \rightarrow \alpha\text{H}$ の変化は進んでおり、しかも可視部吸収スペクトルの上にほとんど変化を示さないとしなければならぬ。

好気で充分量の基質で還元したとき、電子スピン共鳴吸収の $\text{Mo}^{+5} \rightarrow \text{Mo}^{+4}$ の変化と、分光上の $\alpha\text{H} \rightarrow \alpha\text{H}_2$ が平行しており (図29), $\text{Mo}^{+6} \rightarrow \text{Mo}^{+5}$ に相当した可視部吸収スペクトルの変化はない。

溶存酸素に対して不足量の基質を用いたとき (図30), 基質がなくなってしまうと、



の反応によって Mo^{+5} が減少する。

遅反応に相当する時間経過における ESR 吸収の変化は、速反応のときと同じような傾向をもつ変化を示す。模式的に、ESR の変化を速

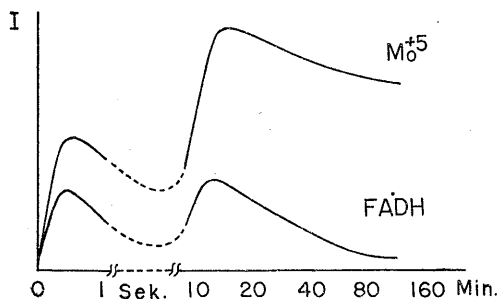


Abb. 32.

Die bildliche Erklärung der ESR-Absorption Veränderung, die aus dem Zusatz des Substrates resultiert

反応と遅反応をあわせて示すと、図32のようになる。

このように Mo^{+5} が FADH と同じように二相性に変化することも、 $\alpha\text{H} \rightarrow \alpha\text{H}_2$ と $\text{Mo}^{+5} \rightarrow \text{Mo}^{+4}$ の同一性を支持している。

嫌気で長時間経って完全還元後、酸素にふれると、 Mo^{+5} の吸収強度が極端に大きくなるのはやはり $\text{Mo}^{+4} \rightarrow \text{Mo}^{+5}$ によるものであろうが、そのときの Mo は、速反応によるものか、遅反応によるものか、どちらが多く効いているのか今のところわからない。

4. まとめ

キサンチン酸化酵素を基質で還元したとき FADH は二相性に現われ、それとほとんど平行して Mo^{+5} も現われる。

Mo の還元型、特に Mo^{+4} は酸素と強く反応する。

$\text{Mo}^{+6} \rightarrow \text{Mo}^{+5}$ の変化は可視部吸収スペクトルにほとんど変化をあたえないが、 $\text{Mo}^{+5} \rightarrow \text{Mo}^{+4}$ の変化は可視部吸収スペクトルに変化を生じる。その差スペクトルは従来キサンチン酸化酵素の FAD 以外の発色群といわれていたものに一致する。これは Mo によるものと考えられる。

V. 総 括

以上3稿を通じて、得た成績を総括すると次のようになる。

酵素の研究において、その推論の正しさを期するには、できるかぎり、酵素の純化を必要とする。とくに物理化学的検査において、それを痛切に感ずる。この意味において、キサンチン酸化酵素の純化法を追試検討した。その結果 Avis らの方法に吸着能の大きい磷酸カルシウムゲルを利用する方法を加えることによって、操作が容易になり、かつ収量は著しく増すことを知った。この標本を用いて得た物理化学的定数は表4にまとめている。

キサンチン酸化酵素の酸化型と還元型との差スペクトルは遊離の FAD のそれと一致しないところが見られる、これを足掛りとして、急速

反応と遅速反応の別, および活性酵素と不活性酵素との別を考慮して, 基質 $\rightarrow$ (FAD, Mo) 活性 $\rightarrow$ Fe $\rightarrow$ (FAD, Mo) 不活性 なる電子伝達経路を認めるべきであると推論した. この際, FAD そのものは分子状態酸素と反応し難く, 脱水素酵素的作用をもつに反し, Mo は酸素と反応し易く, 酸化酵素的作用を示す. 存在する Fe は活性酵素と不活性酵素との電子伝達の仲介を営むものと推論される.

キサントニン酸化酵素は遊離基および常磁性金属を含むため, 電子スピン共鳴吸収法の対象となる. 測定装置の性能上の酵素反応追跡への制限を除くため, 方法の上に種々の考察を加え, それによって, 遊離基 FADH の二相性出現と Mo⁺⁵ の生成の平行を認め, さきにあげたこの酵素の差スペクトルの FAD のそれと異なるのは非ヘム蛋白に結合した Mo による発色の変化によることを推論してよい.

以上を要約すると, キサントニン酸化酵素の脱水素機転を始動するものは FAD であり, 自酸化的役割を果すものは金属モリブデンであり, いわゆる不活性酵素の助酵的作用を営むものは鉄イオンであって, 酵素構成三要素のそれぞれの分担が解析された.

本研究に対し終始御校閲を賜った久保教授に心から感謝致します.

文 献

- 1) De Renzo, E. C. (1965) *Adv. Enzymol.*, **17**, 293
- 2) Morgan, E. J., Stewart, C. P. and Hopkins, F. G. (1922) *Proc. Roy. Soc. (London)*, B **94**, 109
- 3) Dixon, M. and Thurlow, S., (1924) *Biochem. J.*, **18**, 976
- 4) Booth, V. H. (1935) *ibid* **29**, 1732 ; (1938) **32**, 494
- 5) Ball, E. G. (1938) *Science* **88**, 131 ; (1939) *J. biol. Chem.*, **128**, 51
- 6) Corran, H. S., Dewar, J. G., Gordon, A. H. and Green, D. E. (1939) *Biochem. J.*, **33**, 1694
- 7) Westerfeld, W. W. and Richter, D. A. (1949) *Science* **109**, 68
- 8) De Renzo, E. C., Kalēta, E., Heytler, P., Oleson, J. J., Hutchings, B. L. and Williams, J. H. (1953) *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 7531
- 9) Green, D. E. and Beinert, H. (1953) *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 599
- 10) Richter, D. A. and Westerfeld, W. W. (1953) *J. biol. Chem.*, **203**, 915
- 11) Totter, J. R., Burnett, W. T., Monroe, R. A. and Whitney, I. B. (1953) *Science* **118**, 555
- 12) Richter, D. A. and Westerfeld, W. W. (1954) *J. biol. Chem.*, **209**, 179
- 13) Avis, P. G., Bergel, F. and Bray, R. C. (1955) *J. Chem. Soc.*, 1100
- 14) De Renzo, E. C. (1956) *Adv. Enzymol.*, **17**, 308
- 15) Bray, R. C., Petterson, R. and Ehrenberg, A. (1961) *Biochem. J.*, **81**, 178
- 16) Vänngård, T., Bray, R. C. Malmström, B. C. and Petterson, R. (1961) *Free radicals in biological System* ed. by Blois. et al. 209
- 17) 堀内成人 (1958) 阪大医学誌 **10**, (11)
- 18) 久保秀雄・志賀 健・磯本昭夫・魚住光郎・門田健・近藤義郎 (1962) 酵素化学シンポジウム **14**, 37
- 19) Ackerman, E. and Brill, A. S. (1962) *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 397
- 20) Meister, A. (1949) *Biochemical Preparations*, **2**, 18
- 21) Tiselius, A., Hjertén, S. and Levin, Ö. (1965) *Archiv. Biochem. Biophys.* **65**, 132
- 22) Perrin, D. D. (1964) *J. Sci. Tech.*, **27A**, 396
- 23) Fortune, W. B. and Mellon, M. G. (1938) *Ind. Eng. Chem. Anal.*, **10**, 60
- 24) 磯本昭夫 (1962) 日本生理誌, **24** (7), 412
- 25) Mackler, B., Mahler, H. R. and Green, D. E. (1954) *J. Biol. Chem.* **210**, 149
- 26) Handler, H. P., Rajagopalan, K. V. and Aleman, V. (1964) *Federation Proc.* **23**, 30
- 27) Morell, D. B. (1952) *Biochem. J.*, **51**, 657
- 28) 亘 弘・魚住光郎・折田義正・木佐貫章 (1958) 酵素化学シンポジウム **10**, 57
- 29) Bray, R. C., Malmström, B. G. and Vänngård, T. V. (1959) *Biochem. J.* **73**, 193
- 30) 久保秀雄・亘 弘・志賀 健・磯本昭夫・魚住光郎 (1960) 酵素化学シンポジウム **12**, 116
- 31) Bray, R. C., Beinert, H. and Palmer, G. (1963) *Federation Proc.* **22**, 466
- 32) Stimmson, M. M. and Reuter, M. A. (1943) *Am. Chem. Soc.*, **65**, 153
- 33) Gutfreund, H. and Stertevant, J. M. (1959) *Biochem. J.* **73**, 1
- 34) Hartridge, H. and Roughton, J. W. (1923) *Proc. Roy. Soc., A* **104**, 376
- 35) Chance, B. (1951) *Adv. Enzymol.*, **12**, 153
- 36) Theorell, H. and Chance, B. (1951) *Acta Chim. Scand.*, **5**, 1127
- 37) Gutfreund, H. (1955) *Disc. Faraday Soc.*, **20**, 167
- 38) Kubo, H., Shiga, T., Isomoto, A. and Uozumi, M. (1963) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **45**, 219

腸壁内神経細胞のアセチルコリン

生成にはたす役割について 612. 338

The role of intramural ganglion cells taken in the acetylcholine formation

椎 名 宏 (SUINA-Hirosi) *

On dogs provided with three *Thiry-Vella* jejunal loops, normal, denervated and aganglionic loops, the role of intramural ganglion cells taken in the acetylcholine formation was studied. The results of the experiment were summarized as follows :

1) The intramuscular injection of 3 mg/kg acetylcholine or 0.02 mg/kg neostigmine produced the augmentation of the motility of both the normal and denervated loops. And acetylcholine exerted an excitatory action upon the motility of the aganglionic loop, whereas neostigmine produced no effect. These results strongly suggest that the aganglionic loop lacks the main site of production of acetylcholine.

2) The acetylcholine content ($0.51 \mu\text{g/g}$) of the aganglionic loop was remarkably reduced, being as much as about one fifth of, or less than acetylcholine content ($2.41 \mu\text{g/g}$) estimated in the normal loop.

3) The histological examination revealed that in the aganglionic loop no normal ganglion cell was found in either the myenteric or submucous plexus, all cells showing sign of degeneration, although the muscular tissue was left intact.

4) From the results described above it may be concluded that the intramural ganglion cells are mainly responsible for the formation of acetylcholine in regard to the small intestine.

1. 緒 言

自律神経のシナプスには acetylcholine (Ach) が産出され、また副交感神経の末梢から Ach が産出されるということは多くの研究者達 (Bar-soum, Gaddum と Khayyal¹⁾, 1934, Dale と Feldberg⁵⁾⁶⁾, 1934, Feldberg と Gaddum⁸⁾, 1934, Feldberg と Vartiainen⁹⁾, 1934, Perry と Talesnik²²⁾, 1951) によって認められている事実である。腸壁内の神経叢, Auerbach および Meissner 神経叢のうち, 前者には Hukuhara Yamagami 及び Nakayama¹³⁾, 1958. によると, 腸内反射の遠心性 neuron が含まれており副交感神経末梢はこれと接合して融合部を形成しているものと考えられる。したがって副交感神経

が興奮すれば, この融合部に Ach が産出されるであろう。

Dikshit⁷⁾, 1938. はイヌで Auerbach 神経叢中の神経細胞を含む縦走筋とこれを含まない輪走筋の Ach 含有量を比較し, 前者における含有量が後者に比べて6-10倍も多いことから, Ach 産出は大部分神経細胞に由来すると結論し, さらにこのような神経細胞を含む腸片を腸管保生液中におくと Ach の含量が増加する事から, Auerbach 神経叢は間断なく Ach を産出していると言っている。

また Welsh と Hyde²³⁾, 1944. は Auerbach 神経細胞を含む縦走筋と腸管全層の g 当りの Ach 含有量を比較して, 前者は後者の約3倍の Ach 量を含むという。ついで Auerbach 神経叢の小神経節の体積と Ach 含量との関係をしらべた結果から, 壁内神経細胞の数が多いほど Ach 含量が多いと結論している。

最近 Hukuhara, Nakayama および Fukuda¹⁷⁾, (未発表) は神経細胞を含むあるいは含まない筋

* 岡山大学医学部第2生理学教室 (福原武教授)
大学院医学研究科学生 (内科学専攻)
2nd Dept. of Physiol., Okayama Univ. Med.
School (major subject ; internal medicine)

[昭和40年2月12日受付]

片についての研究結果から、Ach の主要なる生産箇所は神経細胞融合部であり、またその細胞の軸索の末端からも Ach がごくわずかではあるが生産されると考えている。

上述の研究結果から腸管内の神経細胞が破壊されるなら、Ach の生産は激減するものと推量される。しかし現在に到るまでこのような推量のもとに行われた研究は見当たらない。

他方われわれの研究室では最近 Hukuhara, Sumi 及び Kotani¹⁴⁾, 1961. は筋を傷害せずに小腸内の神経細胞を選択的に破壊する方法を考案し、ついで Hukuhara, Kotani および Sato¹⁵⁾, 1961. はこの方法を大腸下部に適用し、先天性巨大結腸症の原因である持続的緊張性収縮論を実験的につくることに成功した。さらに最近 Hukuhara, Fukuda および Siina¹⁸⁾, (未発表) は上述の方法を用いて回盲部に、Okamoto, Iwasaki, Ueda および Takeda²¹⁾, 1964. は噴門に痙縮をおこさせた。

そこで著者はこの方法を用いて、腸壁内神経細胞を破壊した腸瘻を作製し、この腸瘻におよぼす Ach あるいは neostigmine の効果を正常腸瘻および神経切断腸瘻におよぼす効果と比較研究し、あわせてこれらの腸片の Ach 含有量を比較検討した。

Ⅱ. 実験方法

A. 腸運動の描記法

3種類の Thiry-Vella 空腸(上部)瘻、すなわち正常腸瘻、すべての外来経路を完全に切断した腸瘻及び Hukuhara ら¹⁴⁾1961の完全貧血法によって腸壁内神経細胞を破壊した腸瘻を具えたイヌを用いた。この手術後4週間を経過して健康を全く回復したので以後1年間にわたり実験をくり返した。なお実験は無麻酔のもとに行われ、1回実験した後はかならず2日間以上の間隔をおいてつぎの実験を行った。実験前動物は18-20時間絶食させておいた。

実験にさいしては、まず Fig. 1 にみられるようにイヌをスチール製の枠にしばりつけ立位で固定し、各腸瘻の口側端からビニール管、V

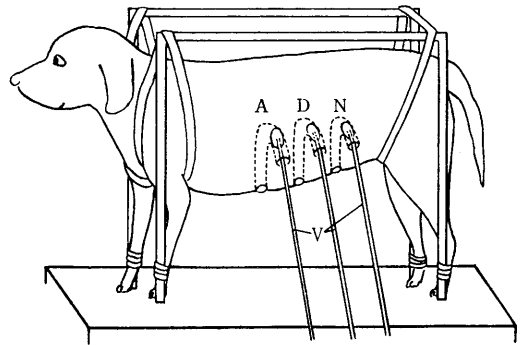


Fig. 1.

Schema showing installation used to set the dog in position.

The dog is bound to the steel frame of the stand, under non-anesthetization. A, D and N respectively indicate the aganglionic, denervated and normal Thiry-Vella jejunal loops, into which the gummi-balloons are inserted, which in turn are connected by means of vinyl tubing, V to the pressure-cording device.

に結びつけた長さ約 3 cm のゴム球を挿入し、ビニール管に結びつけたひもをイヌの胴体に巻きつけ、これでゴム球の移動をふせぐ。なおゴム球とそれに附属のビニール管の内腔は温水(約30°C)で満たされており、内圧は大気圧になっている。

つぎに Fig. 2 に示すように、このビニール管を温水を満した厚ゴム管Bおよび活栓Tを介して注射器S、水マンメーターW および圧受容器(三栄製 strain gauge pressure transducer) St に連結する。ついで注射器からゴム球内に温水を注入する。このさい水マンメーターの目盛を観察することによって腸の弛緩期内圧を約15 cmH₂O に調整し、活栓 a および c を閉じる。これでゴム球-圧受容器系が外気から遮断される。最後に圧受容器を CA-106型万能歪記録増巾器(strain-amplifier)を介して IR-201型 ink-writing oscillograph に連結することによって小腸片の運動(等容積性収縮)にともなう生ずる内圧変動が一定速度で移動する記録紙上に描記される。なお実験終了後には水圧力計をもちいて描記系の感度を毎回検定した。

使用した薬物は acetylcholine (5%塩化アセ

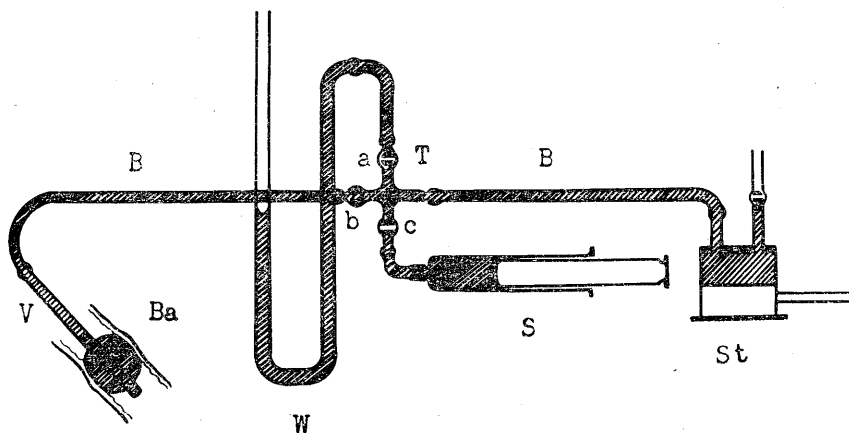


Fig. 2.

Diagram illustrating the arrangement of the pressure-recording device.

W : Water manometer. T : Trifurcated glass tubing. a, b and c : Tap. Ba : Balloon. V : Vinyl tubing. S : Syringe. B : Branch used to connect the tambour to the strain gauge pressure transducer, Tt.

チールコリン, 第一製薬, オビソート) および neostigmine (0.05% メチル硫酸ネオスチグミン, 塩野義製薬, ワゴスチグミン) であり, この薬物を実験動物の後肢の大腿二頭筋 (M. biceps femoris) 内に注射する。

B. 正常腸片および神経細胞破壊腸片における Ach 含有量の生物学的検定

上述の実験とはべつに, 2頭のイヌについて手術後15日を経た壁内神経細胞破壊腸片および腸瘻の作製に用いた空腸部位に近接する正常腸片の Ach 含有量をそれぞれ Chang と Gaddum²⁾, 1933. の方法²⁰⁾を用いて測定した。すなわち 0.03 mg/kg の neostigmine を動物に注射した後直ちに腸片 (約 1 g 見当の量) を剔出し, すばやく 10% 3 塩化酢酸溶液内に入れ, その容器の重量を測ることによって腸片の正確な重量をたしかめる。つぎにこの液中で腸片を鋏で細く切りくだき, ときどき攪拌して冷室に 90-120 分放置する。ついで細切された腸片と 3 塩化酢酸の混合溶液をガラス濾過器で濾過する。この濾過液にエーテルを加え分液漏斗を用いてエーテル可溶成分 (脂肪, 3 塩化酢酸等) をとり除く。この操作を 6-8 回くり返すと, 抽出液の量は約 2 ml になり, その pH は 3.5-4.0 となる。ここでカエ

ルの腹直筋半側標本を作り, これを 18 ml の冷血動物用 Ringer 液を入れた浴槽中につるし, この液に $1:10^{-6}$ の濃度の neostigmine をあらかじめ加えておいた後, 上述の抽出液から約 1 ml をとって, これを浴槽中に加える。このさい抽出液中に Ach があれば腹直筋は収縮する。つぎに浴槽内の液を新たな Ringer 液と交換し, これに種々の濃度の Ach 液をこの腹直筋に作用させ, さきに見たと同様の効果を示す濃度を見出す。これから抽出液全量中に含まれる Ach 量を換算する。なお腹直筋への作用時間は 40 秒と定める。

C. 神経細胞破壊腸片の組織学的検索

なお上述の実験終了後神経細胞破壊腸片の神経細胞の組織像を Feyrter¹²⁾, 1951. の鍍銀法 (Bielschowsky の変法) により検索し, あわせて正常腸片の神経細胞と比較検討した。

Ⅲ. 実験成績

A. 薬物の小腸運動におよぼす効果

1. 薬物投与前の小腸運動

3 種類の腸瘻にはそれぞれ実験当初に 15 cm H_2O の内圧がかけられた。この条件のもとに各腸瘻の運動を観察するに, 正常および神経切断

腸痙では約40秒の周期をもって運動の強い時期と弱い時期とが交代する。運動の強い時期では緊張が多少たかまり周期的収縮の振巾が大きくなり、弱い時期には逆に緊張が低下し収縮振巾が小さくなる。

他方神経細胞破壊腸痙の運動はときには個々の収縮の律動が規則正しく約40秒の周期をもって強弱の時期が交代することもあるが、多くの場合には律動は不規則で強弱の大周期も明瞭でない。また収縮の振巾は他の腸痙に比較して著しく小さい。これは収縮波の発生箇所 (pace-maker region) が1ヶ所ではなく、2ヶ所以上存在するためであり、このような運動の不規則が壁内神経細胞の運動調整作用の脱落に帰因することは Hukuhara, Sumi 及び Kotani¹³⁾, 1961. が述べたことである。彼らによると、腸壁内神経細胞が破壊されるならその腸管の筋緊張は著しく上昇し、2, 3ヶ所に搏動が生じこれからの波がたがいに衝突して複雑な運動状態を呈し、整然と腸の一端から他端へ伝播する波はほとんど認められない。

また Fukuhara, Kotani 及び Sato¹⁶⁾, 1961. は、

Thiry の腸痙を用いての実験結果から、神経細胞破壊腸痙は緊張性収縮におち入っており、腸内圧が低い場合には運動収縮の振巾が著しく小さくなるという。著者の実験によっても同様に神経細胞破壊腸痙の運動収縮の振巾は他の腸痙のそれと比較していちじるしく小さい。すなわち収縮期内圧は神経細胞破壊腸痙で 25.6 ± 4.97 cmH₂O, 正常および神経切断腸痙で 44.1 ± 7.25 cmH₂O であり、弛緩期内圧は各腸痙ともほぼ同値を示し平均 10 cmH₂O である。

2. Ach の小腸運動におよぼす効果

1. において述べた運動が比較的恒常的に描記されているさいに 3 mg/kg の Ach を筋注すると、約1分の潜伏期をもって正常腸痙および神経切断腸痙の運動 (12例) のみならず神経細胞破壊腸痙の運動 (11例) も著明に亢進した (Fig. 3). すなわち弛緩期内圧は増大して正常腸痙および神経切断腸痙では 27.0 ± 5.06 cmH₂O, 神経細胞破壊腸痙では 19.0 ± 3.63 cmH₂O となった。また収縮期内圧は上昇して正常および神経切断腸痙では注射前の約2倍、100 cmH₂O 以上となり、神経細胞破壊腸痙では 39.0 ± 7.98

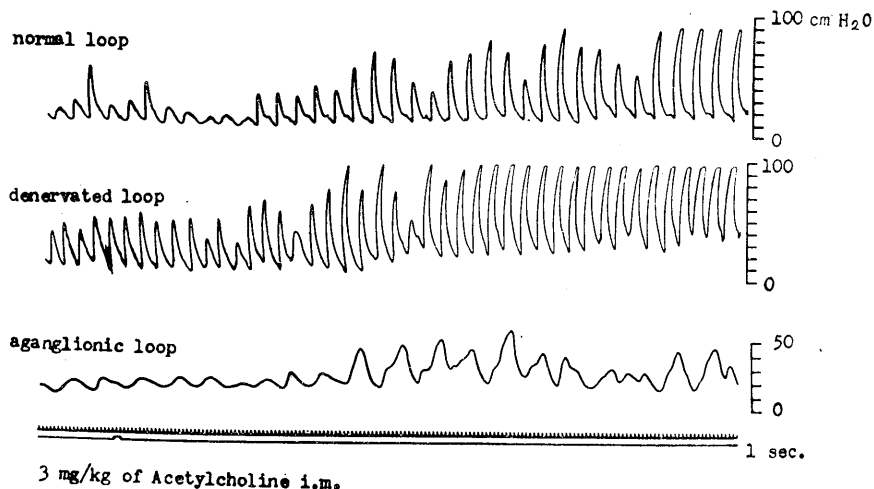


Fig. 3.

The effect of acetylcholine upon motilities of the normal, denervated and aganglionic Thiry-Vella jejunal loops.

Female dog, 8 kg. From above downwards, the curves show the motilities of the normal, denervated and aganglionic loops, respectively. The signal indicates the intramuscular administration of 3 mg/kg of acetylcholine. At the right, calibration curves indicating the intraluminal pressure in cm H₂O. Explanation in the text.

cm H₂O となった。

効果

3. neostigmine の小腸運動におよぼす

Ach の分解酵素である cholinesterase の働き

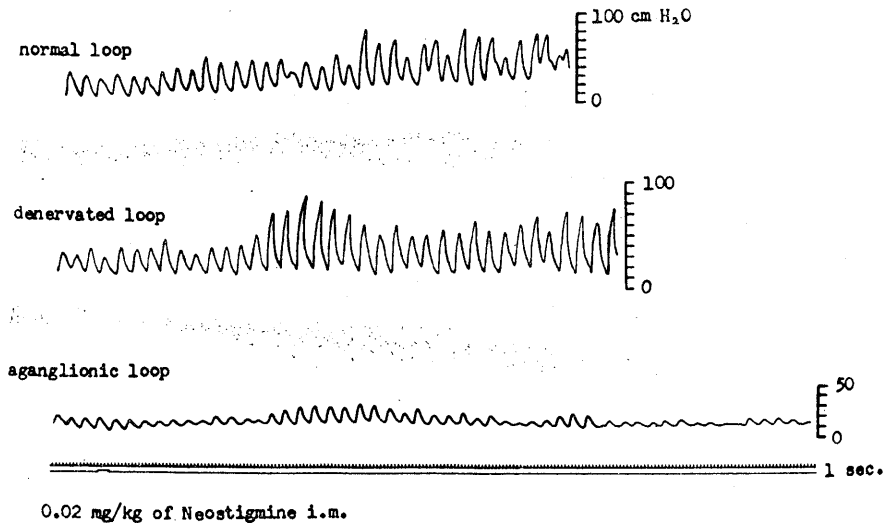


Fig. 4.

The effect of neostigmine upon the motilities of the normal, denervated and aganglionic loops.

The same animal in Fig. 3. From above downwards, the curves show the motilities of the normal, denervated and aganglionic loops, respectively. The signal indicates the intramuscular administration of 0.02 mg/kg of neostigmine.

At the right, calibration curves indicating the intraluminal pressure in cm H₂O. Explanation in the text.

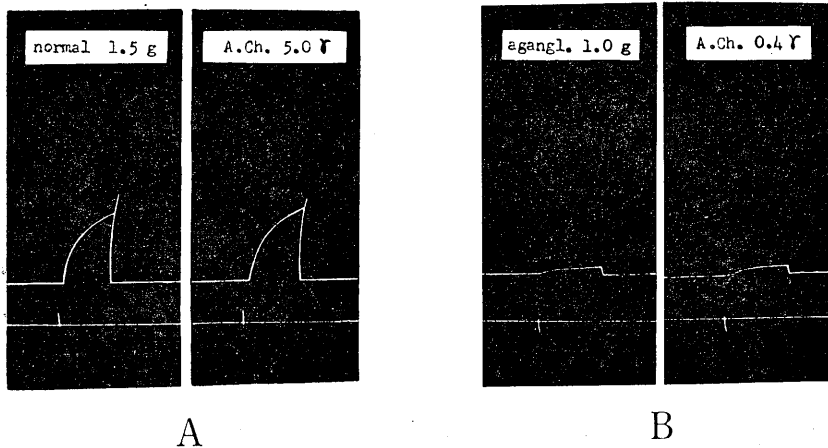


Fig. 5.

The estimation of the acetylcholine content of the normal as well as aganglionic jejunum. Chang and Gaddum's bioassay, eserized rectus muscles of *Rana nigromaculata* being used.

A : The effect of the extract from 1.5 g of dog's normal jejunum corresponds to that of 5.0 μ g of acetylcholine.

B : The effect of the extract from 1.0 g of dog's aganglionic jejunum corresponds to that of 0.4 μ g of acetylcholine.

を抑制する薬物, すなわち neostigmine 0.02 mg/kgを筋注すると, 約1分の潜伏期をもって正常および神経切断腸痙の運動(13例)はともに著しく亢進した. すなわち弛緩期内圧は上昇して 22.3 ± 4.82 cmH₂O となり, 収縮期内圧は増大して 72.8 ± 16.2 cmH₂O となった. 他方神経細胞破壊腸痙の運動(18例)はまれにたかめられた場合もあったが, ほとんどの場合何ら効果が認められなかった (Fig. 4).

少量の neostigmine は cholinesterase の作用を抑制して Ach の蓄積をうながし, その作用を顕著ならしめるはずである. 上述の実験のように神経細胞破壊腸痙に対して neostigmine が何ら作用をおよぼさないということは神経細胞破壊腸痙では Ach の生産箇所が欠除しているということを示唆している. そこで著者はこれを確かめるために次の実験を行った.

B. 正常腸片および神経細胞破壊腸片におけ

Table 1.

The amount of acetylcholine in μ g, extracted from 1 g of the normal as well as aganglionic jejunum. Explanation in the text.

No. of expt.	normal (μ g/g)	aganglionic (μ g/g)
1	1.93	0.40
2	2.40	0.33
3	3.33	0.60
4	2.40	0.30
5	2.30	
6	1.95	
7	2.76	
8	2.20	
9	2.94	
10	2.73	
Mean	2.51	0.41

る Ach 含有量の比較

正常腸片と神経細胞破壊腸片との Ach 含有量を Chang と Gaddum の方法により測定した.

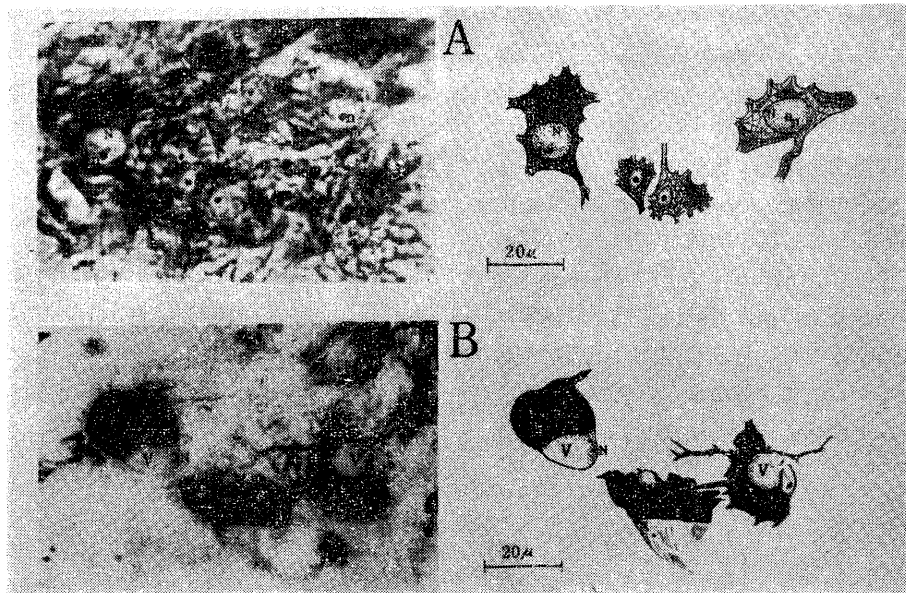


Fig. 6.

The ganglion cells of myenteric plexus of dog's jejunum before and after complete anemia lasting for 4 hours.

Silver staining. Cross section, 10 μ .

A : Normal ganglion cells (control) ; the neurofibrillar structure and nucleus with a nucleolus are seen.

B : Ganglion cells after complete anemia : in each cell, the cytoplasm is vacuolized and the nucleus is crowded forward to one pole.

N : Nucleus. n : Nucleolus. V : Vacuole.

Fig. 5 は Ach 定量の 1 例を示す。すなわち正常腸片 1.5 g の抽出液によるカエル腹直筋収縮は Ach 約 $5.0 \mu\text{g}$ による効果に匹敵する。他方神経細胞破壊腸片 1.0 g の抽出液は微少な効果を示し、Ach 約 $0.4 \mu\text{g}$ による効果にしか匹敵しない。

正常腸片の Ach 含有量の平均は 4 頭のイヌを用い 10 回定量して腸 1 g 当り約 $2.5 \mu\text{g}$ である。Yokoyama²⁵⁾, 1955. はイヌの消化管の全域にわたって Ach 含有量を測定し、小腸上部では腸 1 g 当り $2.41 \mu\text{g}$ の Ach を含むと言っており、著者の測定結果とよく一致する。他方神経細胞破壊腸片の Ach 含有量の平均は 2 頭のイヌを用い 4 回定量して腸 1 g 当り約 $0.4 \mu\text{g}$ であり、正常腸片の含有量と比較すると約 1/5 以下にすぎず著しく少量である (Table 1)。

C. 神経細胞破壊腸片の組織像

Hukuhara¹⁴⁾¹⁵⁾, 1961. はすでに神経細胞破壊腸片における神経細胞の組織学的検索をおこない、この腸片の Auerbach 神経叢中の神経細胞がすべて退行変性におちいっていることを報告している。

著者も鍍銀法を用いて検索するに、彼らと全く同様な結果を得た。Fig. 6 が示すように正常腸片の神経細胞では核が明瞭であるが、神経細胞破壊腸片では Auerbach および Meissner 神経叢中の神経細胞の核は鎌状に萎縮して極端に偏在しており、さらに神経細胞内に大きな空胞が出現している。この組織像から考察するに、神経細胞はその機能を全く消失していると想像される。

IV. 論 議

上述の実験結果より、一方においては組織学的検索によって神経細胞破壊腸瘻の Auerbach および Meissner 神経叢中の神経細胞がすべて退行変性におちいっているが、筋組織には異常が認められないことを確認した。他方においてはこの腸瘻では cholinesterase の働きを抑制し Ach の蓄積をうながす neostigmine がほとんどその効果を現さず、また Ach 含有量が正常腸

瘻のそれと比較して著しく微量であることを確認した。この事実は神経細胞破壊腸片では Ach の生産箇所がほとんど全く消失しているということを物語っている。そしてこの実験からの当然の帰結は腸管における Ach の生産箇所が神経性組織であるということである。

腸管における Ach の生産箇所に関して行われたこれまでの研究成績を通覧批判するとつぎの如くである。

Dikshit⁷⁾, 1938. はイヌで Auerbach 神経叢の神経細胞を含む縦走筋とこれを含まない輪走筋の Ach 含有量を比較し、前者における含有量が後者に比べて 6-10 倍も多いことから、腸壁内神経細胞は Ach の主たる生産箇所であると結論し、さらにこのような神経細胞を含む腸片を腸管保生液中に置いておくと、Ach の含量が増加することから、Auerbach 神経叢は間断なく Ach を生産していると言う。

また Welsh と Hyde²³⁾, 1944. はウサギ及びモルモットの小腸を用いて Auerbach 神経叢の神経細胞を含む漿膜および縦走筋層と腸管全層との Ach 含有量を比較測定し、腸管における Ach 生産は主として壁内神経叢に由来すると結論している。

さらに Dikshit⁷⁾, 1938. は Yanase²⁴⁾, 1907. の実験結果、すなわちモルモットの胎児は妊娠 26 日以前には筋内神経叢が形成されないという事実を考慮に入れて、発生 5 週以前の胎児と 7 週以後の胎児の Ach 含有量を比較し、前者では Ach 生産を全く認めず、後者では Ach 生産を認めている。この事実からも Dikshit は Ach は神経性組織から生産されると言っている。他方 Johnson¹⁹⁾, 1963. はモルモットの剔出腸管に cocaine, procaine あるいは hemicholinium を適用すると、Ach 産出量は 70% 減少して適用前の量の約 30% になり、また腸管を冷却して神経要素の機能を消失させるなら、Ach の産出量は 85% 減少して冷却前の量の約 15% になることから Ach 産出は神経性の組織に由来すると結論している。

このたびの著者の壁内神経細胞破壊腸片を用

いて得られた実験成績は上述の研究者らの見解に対して強力な支持を与えることができよう。

しかるに上述の研究者の成績と反対に, Feldberg と Lin¹⁰⁾, 1949. はウサギの小腸に nicotine, d-tubocurarine あるいは cocaine を適用しても Ach 含量は適用前と全く差異が認められないことから, Ach は非神経性の組織中に生産されると考え, Dikshit の結論を否定している。しかし Dikshit の実験の追試も行わずに彼の成績を否定することは行きすぎである。著者は Dikshit および Johnson の成績の方が Feldberg のものより信頼度がたかいと考える。

Feldberg と Lin¹¹⁾, 1950. はさらに他の実験においてネコおよびイヌの小腸の choline-acetylase 活性 (Ach の合成能力) を測定し, その結果から腸管の Ach 産出は主として粘膜腺組織に由来すると言う。しかし choline-acetylase の大量存在箇所が直ちに Ach の最有力な生産箇所であると断定することは危険であろう。

Chujyo³⁾⁴⁾, 1952, 1953. はモルモットの剔出腸管をガラス棒を挿入することによって横軸方向に伸展しておくと, この腸管の Ach 含有量は増加するが, 重量をかけて縦軸方向に伸展しておいても Ach 含有量の増加を認めなかった。ついで横軸方向に伸展しておきながら, cocaine を適用しても Ach 含有量の増加が適用前と全く同様にみられることから, 横軸方向に伸展したときに Ach の生産が増加する箇所は輪走筋層であろうと推量している。しかるに腸管を縦方向に伸展するさいには粘膜はさほど伸展されないが, 横軸方向に伸展するさいには粘膜は著しく強く伸展されることに注目しなければならない。彼の実験において腸管を横軸方向に伸展すると, その結果として粘膜内反射が誘起されその中枢である壁内神経細胞が刺激され興奮するはずである。そしてこれが Ach 含量の増加をうながす誘因となると考えることができる。この見解に立脚するなら, Chujyo の実験結果は彼の結論とは反対に Ach の生産が神経性の組織に由来するということができよう。

V. 結 論

3 種類の Thiry-Vella 空腸 (上部) 瘻, すなわち正常腸瘻, 腸間膜神経の切断された腸瘻および完全貧血法によって腸壁内神経細胞の破壊された腸瘻を具えたイヌをもちい, 壁内神経細胞の Ach 生産に果す役割を研究した。その結果を要約するとつぎの通りである。

1. Ach を投与すると, 正常腸瘻および神経切断腸瘻の運動だけでなく神経細胞破壊腸瘻の運動も著しくたかめられる。他方 cholinesterase の作用を抑制し Ach の蓄積をうながし, その効果を顕著ならしめる neostigmine を投与すると, 正常腸瘻および神経切断腸瘻の運動はともに著しくたかめられるが, 神経細胞破壊腸瘻の運動に対しては何ら効果が認められない。この事実から, 神経細胞破壊腸瘻では Ach は産出されないということができよう。

2. 正常腸片および神経細胞破壊腸片の Ach 含有量を生物学的定量法によって比較すると, それぞれ腸 1 g 当り約 2.4 μg および 0.5 μg 含まれている。すなわち神経細胞破壊腸片の Ach 含有量は正常腸片のそれと比較して著しく少量であり約 1/5 以下にすぎない。この結果から神経細胞破壊腸片では Ach の生産箇所が欠除していると考えられる。

3. 神経細胞破壊腸片の神経細胞の組織像を鍍銀法により検索し, Auerbach および Meissner 神経叢中の神経細胞がすべて退行変性におちいつていることを確認した。

4. 上述の結果から, 腸管における Ach 生産は主として壁内神経細胞に由来すると結論することができる。

終りに臨み, 終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師福原教授に, 衷心より謝意を表します。併せて中山助教授および教室員諸氏の御指導と御援助に深謝致します。

文 献

- 1) Barsoum, G. S., Gaddum, J. H. and Khayyal, H. A. (1934) The liberation of a cholinester in

- inferior mesenteric ganglion. *J. Physiol.* **82**, 9-10
- 2) Chang, H. C. and Gaddum, J. H. (1933) Choline esters in tissue extracts. *J. Physiol.* **79**, 255-285
 - 3) Chujiyo, N. (1952) Acetylcholine production in passively extended wall of intestine. *Amr. J. Physiol.* **170**, 668-672
 - 4) Chujiyo, N. (1953) Site of acetylcholine production in the wall of intestine. *Amr. J. Physiol.* **174**, 196-198
 - 5) Dale, H. H. and Feldberg, W. (1934) The chemical transmitter of vagus effects to the stomach. *J. Physiol.* **81**, 320-334
 - 6) Dale, H. H. and Feldberg, W. (1934) The chemical transmitter of nerve stimuli to the sweet glands of the cat. *J. Physiol.* **81**, 40-41
 - 7) Dikshit, B. B. (1938) Acetylcholine formation by tissue. *Quart. J. exp. Physiol.* **28**, 243-251
 - 8) Feldberg, W. and Gaddum, J. H. (1934) The chemical transmitter at synapse in a sympathetic ganglion. *J. Physiol.* **81**, 305-319
 - 9) Feldberg, W. and Vartiainen, A. (1934) Further observations on the Physiology and pharmacology of a sympathetic ganglion. *J. Physiol.* **83**, 103-128
 - 10) Feldberg, W. and Lin, R. C. Y. (1949) The effect of cocaine on the acetylcholine output of the intestinal wall. *J. Physiol.* **109**, 475-487
 - 11) Feldberg, W. and Lin, R. C. Y. (1950) Synthesis of acetylcholine in the wall of the digestive tract. *J. Physiol.* **111**, 96-118
 - 12) Feyrter, F. (1951) Über die Pathologie der vegetativen nervösen Peripherie und ihrer ganglionären Regulationsstätten. Wilhelm Maudrich, Wien. S. 173-180
 - 13) Hukuhara, T., Yamagami, M. and Nakayama, S. (1958) On the intestinal intrinsic reflexes. *Jap. J. Physiol.* **8**, 9-20
 - 14) Hukuhara, T., Sumi, T. and Kotani, S. (1961) The role of the ganglion cells in the small intestine taken in the intestinal intrinsic reflex. *Jap. J. Physiol.* **11**, 281-288
 - 15) Hukuhara, T., Kotani, S. and Sato, G. (1961) Effect of destruction of intramural ganglion cells on colon motility: Possible genesis of congenital megacolon. *Jap. J. Physiol.* **11**, 635-640
 - 16) Hukuhara, T., Kotani, S. and Sato, G. (1962) Comparative studies on the motility of the normal, denervated and aganglionic Thiry-loops. *Jap. J. Physiol.* **12**, 348-356
 - 17) Hukuhara, T., Nakayama, S. and Fukuda, H.; unpublished.
 - 18) Hukuhara, T., Fukuda, H. and Siina, H.; unpublished.
 - 19) Johnson, E. S. (1963) The origin of the acetylcholine released spontaneously from the guinea-pig isolated ileum. *Brit. J. Pharmacol.* **21**, 555-568
 - 20) MacIntosh, F. C. and Perry, W. L. M. (1950) Biological estimation of acetylcholine. *Methods in medical research.* **3**, 78-92
 - 21) Okamoto, E., Iwasaki, T., Ueda, T. and Takeda, Y. (1964) Pathogenesis of cardiospasm: Clinical and experimental studies. *Med. J. Osaka Univ.* **14**, 245-274
 - 22) Perry, W. L. M. and Talesnik, J. (1951) The role of acetylcholine in synaptic transmission at parasympathetic ganglia. *J. Physiol.* **119**, 455-469
 - 23) Welsh, J. H. and Hyde, J. E. (1944) Acetylcholine content of the myenteric plexus and resistance to anoxia. *Proc. Soc. exp. Biol.* **55**, 256-257
 - 24) Yanase, J. (1907) Beiträge zur physiologie der peristaltischen Bewegungen des embryonalen Darmes. *Pflügers Arch.* **117**, 345-371
 - 25) Yokoyama, S. et Nitta, Y. (1955) Teneur en acetylcholine des couches musculaires du tractus digestif et organes vaso-cardiaques. *Comp. rend. soci. biol.* **149**, 850-851

化学調味料に対する反応を利用したの

Taste Receptor Unit の解析 612.819.7

Single taste nerve responses to the chemical taste enhancers

河村 洋二郎・足立 明

(KAWAMURA-Yojiro・ADACHI-Akira)*

Response of a single gustatory nerve fiber of the cat to chemical taste enhancers was analysed.

The gustatory nerve fibers in the chorda tympani sensitive to saline solution were used. As the test solutions of chemical taste enhancers, monosodium glutamate (MSG), inosine monophosphate (IMP) and guanine monophosphate (GMP) were used respectively.

Some of the single salt-fibers showed response to all of above described chemical taste enhancers, but some were not to any of them. Further, there are some fibers sensitive to IMP and GMP but not to MSG.

The mixed solution of MSG+IMP or MSG+GMP induced more predominant discharges than their individual single solutions, however, the mixture of the nucleic acid group, that is GMP+IMP, did not induce any enhancement of response comparing with their individual single solutions.

I. 緒 言

著者ら¹⁾は動物の舌表面に 0.2 M 食塩水を滴下した場合特によく反応し impulse を記録できる味覚神経線維 (塩線維) 中のあるものが、化学調味料として広く用いられているグルタミン酸ソーダにも反応することを明らかにした。本論文は、化学調味料の中で化学的構造の明らかで結晶化されている成分が塩線維に誘発する反応を利用し、味覚効果機序を単一味覚神経線維のレベルより分析するとともに、味覚受容の末梢機序について考察を加えたものである。

II. 実験方法

実験には、体重 2-3 kg の麻酔した雌雄成熟猫 6 匹を使用した。食塩溶液を舌表面に投与した場合 impulse を生じる鼓索神経中の単一味覚神経線維を分離し、各種濃度の化学調味料、あ

るいは基本的試験液に対するこの神経線維の反応を記録分析した。味覚神経の impulse 記録法、試験液の適用法など実験方法はすべて前報¹⁾⁻⁴⁾と全く同様である。

なお、基本的試験液としては 0.1 M, 0.5 M, 1.0 M NaCl solution, 0.1 M, 0.5 M, 1.0 M sucrose solution, 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M acetic acid solution, および 0.001 M, 0.005 M, 0.01 M の quinine hydrochloric solution をそれぞれ用いた。また化学調味料としては、0.01 M, 0.05 M および 0.1 M monosodium glutamate (MSG) と 0.001 M, 0.005 M, 0.01 M の inosine monophosphate (IMP) および 0.001 M, 0.005 M, 0.01 M の guanine monophosphate (GMP) を用いた。なお、前記各試験液はすべて約 5 ml 舌前半部中央表面にそそいだ。

III. 実験結果

図 1, 2, 3, 4 にそれぞれ示した如く、反応を測定した単一味覚神経線維は、いずれも前記濃度範囲の sucrose および quinine の溶液には殆んど反応を示さず 0.1-1.0 M の NaCl 溶液に

* 大阪大学歯学部口腔生理学教室

Dept. of Oral Physiol., Dental School, Osaka Univ.

[昭和40年2月12日受付]

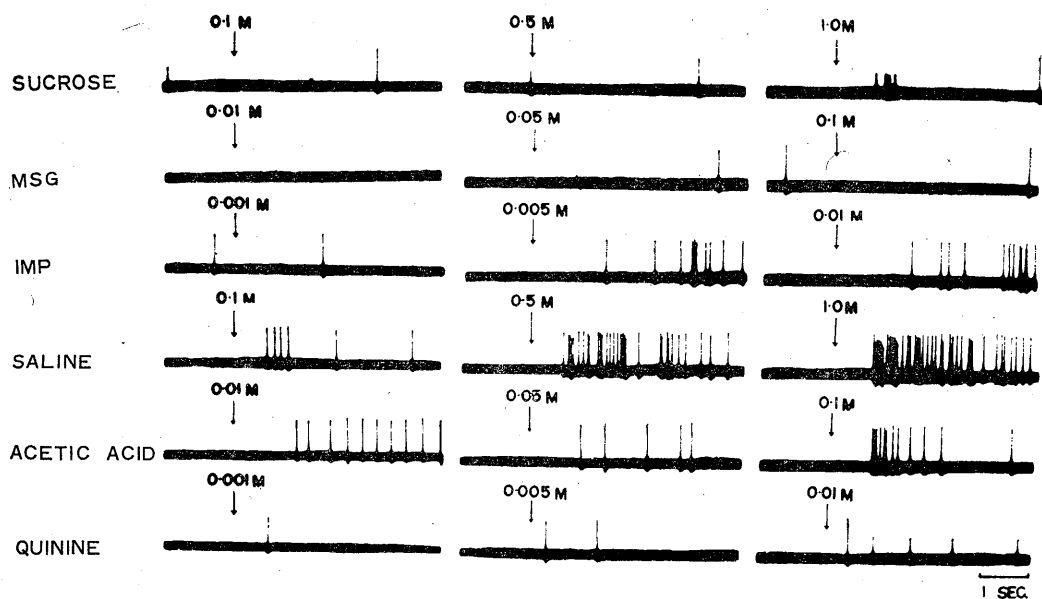


Fig. 1.

Response of the single gustatory salt-fiber sensitive to inosine monophosphate (IMP). This fiber showed obvious response to acetic acid and IMP on the tongue, however, it did not show any distinct responses to MSG, sucrose and quinine solutions. The three strips of record reading from the left illustrate the response with low, medium and high concentration of the test solutions respectively.

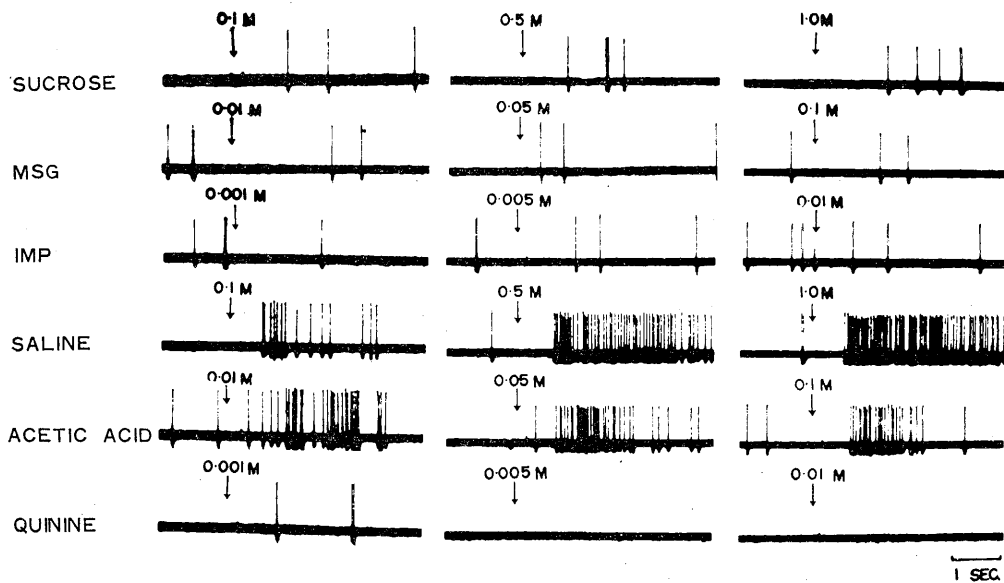


Fig. 2.

Response of the single salt-fiber non-sensitive to chemical taste enhancers. This single taste fiber was sensitive to NaCl and acetic acid, but it was not sensitive to IMP and monosodium glutamate (MSG).

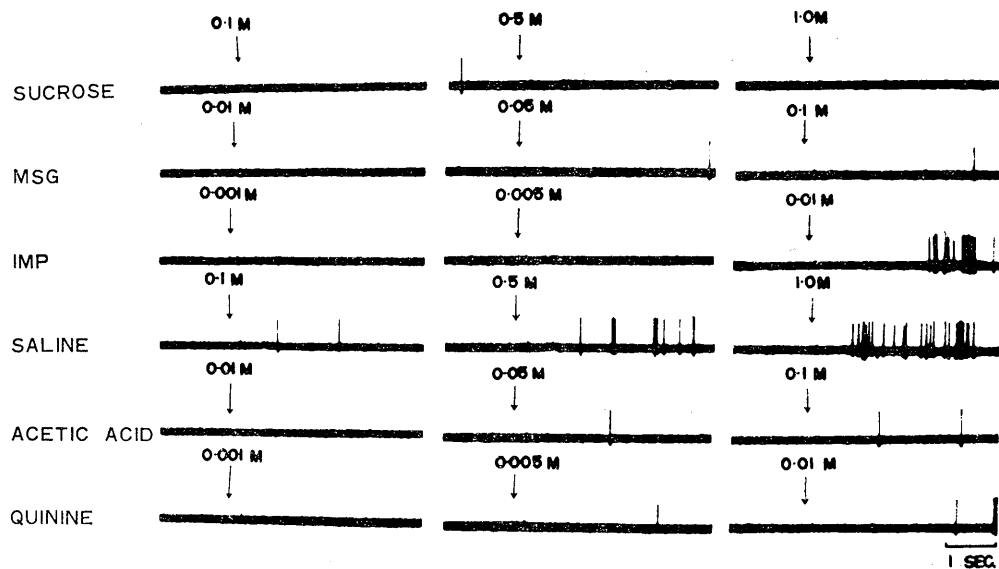


Fig. 3.

Response of the single gustatory salt-fiber sensitive only to saline solution and to IMP.

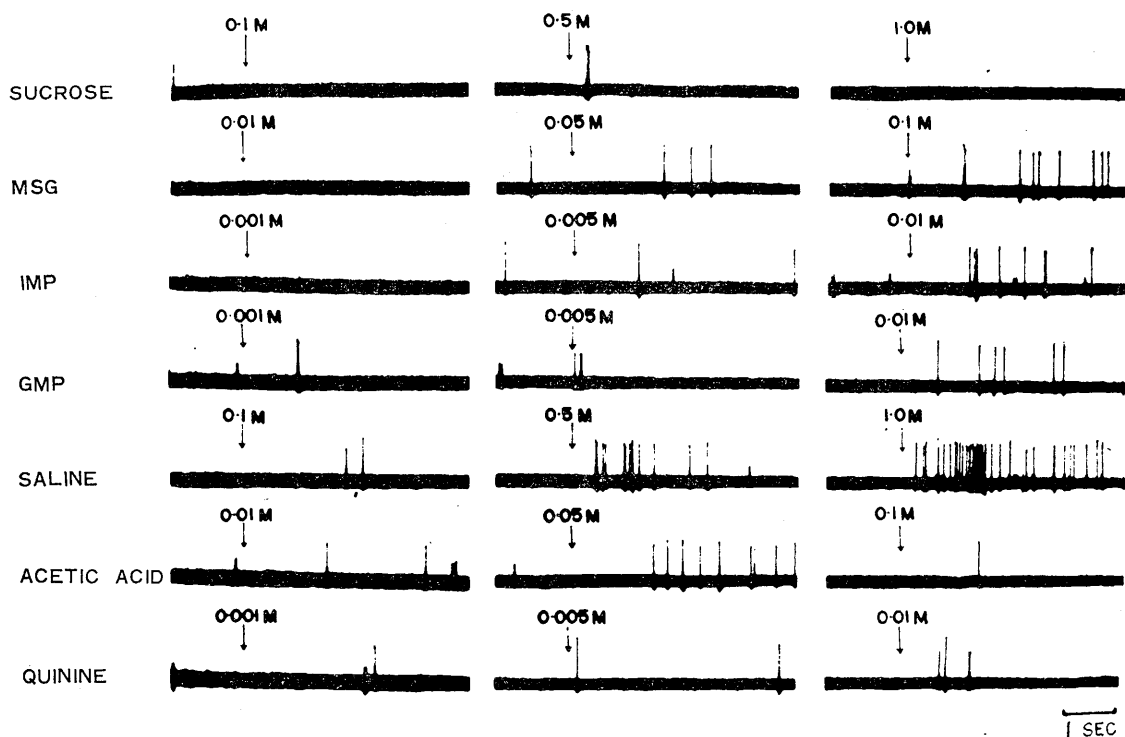


Fig. 4.

Response of the single salt-fiber to chemical taste enhancers.

This salt-fiber well responded to MSG, IMP and guanine monophosphate (GMP), but the latency of the response to such chemical taste enhancers was longer than that of saline solution.

対して必ず反応を示したものである。図1に示した神経線維は、0.1–1.0 M NaCl のみならず 0.01 M, 0.05 M および 0.1 M acetic acid に対しても反応し、特に 0.5 M および 1.0 M NaCl に対しては著明な反応を示した。この線維は MSG (0.01–0.1 M) に対しては反応を示さなかったが、0.005 M および 0.01 M の IMP に対しては反応を示した。しかし IMP に対する反応は NaCl に対するそれに比べると反応潜時が長かった。

図2は図1に示した神経線維と同じく、NaCl および acetic acid のいずれの溶液に対しても反応した味覚神経線維の反応である。この神経線維は MSG (0.01–0.1 M) および IMP (0.001–0.01 M) のいずれに対しても特記すべき反応を誘発しなかった。

図3は NaCl (0.1–1.0 M) に対してのみ反応し、本実験で用いた濃度範囲の他の基本的試験液のいずれに対しても反応しなかった神経線維

についての記録である。この味覚神経線維は 0.01 M の IMP に対して著明な反応を示した。この場合も IMP に対する反応潜時は NaCl に対するそれが約 1 sec であるのに比べて約 2.5 sec で長かった。

図4は、同じく NaCl (0.5–1.0 M) に対して 0.5 sec 以内に著明に反応した味覚神経線維の反応である。この神経線維は acetic acid に対して濃度が 0.05 M の場合にのみ反応を示し、0.01 M あるいは 0.1 M では反応しなかった。この神経線維は 0.05 M および 0.1 M MSG, 0.01 M IMP および 0.01 M GMP のいずれに対しても反応を示した。また、これら化学調味料に対する反応潜時は NaCl に対するそれに比べいずれも約 1 sec 長かった。

図5は、図4に示した味覚神経線維について異種の化学調味料を混合した溶液が如何なる反応を生じさせるかを検討した結果である。0.05 M MSG に 0.005 M IMP を混合した溶液および 0.05 M MSG に 0.005 M GMP を混合した溶液では、単独溶液の場合殆んど反応が認められないのにも拘らず、9–12 spikes/sec の著明な反応が刺激直後に誘発された。しかし、共に核酸質物連関である 0.005 M IMP と 0.005 M GMP とを混合した場合には、それぞれを単独で与えた場合と神経線維に生じる反応は殆んど変わらず、両液を混合しても味覚受容器に対する刺激効果は単独の場合と変化がなかった。

IV. 考 察

本実験では猫の舌表面に食塩水溶液を与えた場合特異的に impulse が記録できる味覚神経線維を実験に選んだ。これは、著者ら²⁾が先に味覚神経中塩線維の一部が化学調味料に対して

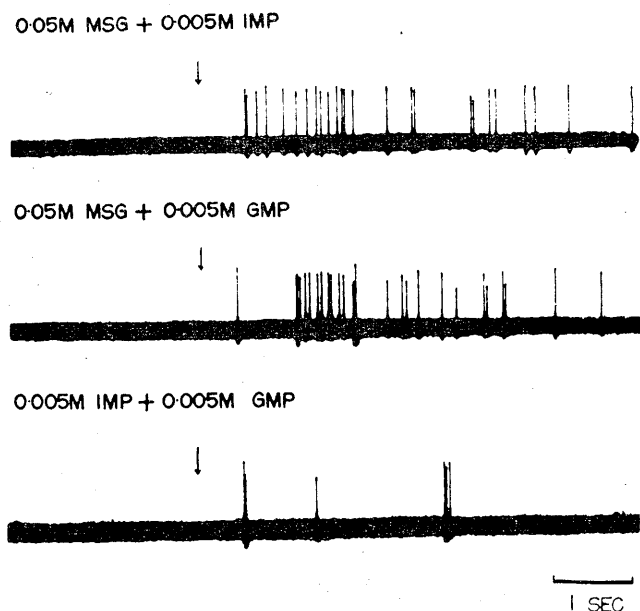


Fig. 5.

Response of a single gustatory salt-fiber in the chorda tympani nerve of the cat to mixed solutions of the taste enhancers. Mixed solutions of MSG and IMP, or MSG and GMP induced distinct marked discharges, however, mixed solution of IMP and GMP induced only lesser responses.

も反応することを明らかにしたからである。

かつて、Beidler⁵⁾は単一味覚神経線維によって支配されている味細胞の一群を taste receptor unit と名づけた。また、de Lorenzo⁶⁾により、直径 0.5–1.0 μ の比較的太い味覚神経線維は、その1本が2つ以上の味細胞とジナップスを形成しているのに対し、直径 0.5 μ 以下の細い味覚神経線維はその1本が一つの味細胞とジナップスを形成していることが明らかにされている。さらに、Kimura and Beidler⁷⁾、Beidler⁸⁾はラッテについての実験から、各種味質溶液に対する各味細胞の感受性はそれぞれ異なること、また1つの味質にしか反応しないような味細胞はなく、いずれの味細胞も複数の味質に反応することを明らかにしている。このことは少なくとも生理的性質の異なった味細胞から receptor unit や味蕾が構成されていることを暗示しているといえよう。

最近、Von Békésy⁹⁾は舌表面の各舌乳頭部を点状に電気刺激することにより、各乳頭がそれぞれ特定の味を誘発することを報告している。これは、一つの舌乳頭に属する味蕾がほぼ同じ性質の味細胞によって構成されていることを推察させる。このように、人の舌を電気刺激して生ずる味の感覚を指標にして得られた Von Békésy の実験結果と、味物質に対する動物の味細胞活動を分析した Beidler らの実験結果とは一見異なった味覚受容機構を暗示しているようである。しかし、両者の実験対象が非常に異なっているのでこれを同列に論じることは無理であり、今日この矛盾を説明するにはなお充分な知見が得られていない。

塩に同じように反応し impulse を生じる味覚神経線維の中に化学調味料にも応じるものと応じないものの存在した本実験結果は、この神経線維が1コの味細胞を支配する場合にはこの味細胞が多くの味質に反応する生理的特性を持っていることになり、一つ以上の味細胞を支配しているとすれば receptor unit を構成する各味細胞の生理的性質にそれぞれ相違のあることを推察させる。そもそも、猫の塩線維の NaCl

に対する閾値濃度は、Zotterman ら¹⁰⁾によれば 0.1 M とされている。これに対し、本実験で使った化学調味料の濃度は、MSG では 0.01–0.1 M、IMP で 0.001–0.01 M であった。いいかえれば、化学調味料溶液に含まれる Na イオンは、塩線維に対しては閾値下濃度であって、反応を誘発しないはずである。このように、IMP は塩線維終末受容器の刺激因子ではあるが、塩線維に生じる反応が食塩の場合に比べ initial burst がなく潜時が長いことが特徴である。この事実も IMP と NaCl は同一 taste receptor unit 中あるいは味蕾中の異なった性質の味細胞を興奮させている可能性を示している。また、図2に示した如く、塩線維の中にも化学調味料に対して反応を示さないものも存在していることなどを考慮すれば、化学調味料に反応する塩線維終末に存在するある種の味覚受容器は単に溶液中の Na イオンに反応するのではなく、陰イオン、あるいは MSG、IMP あるいは GMP そのものにより刺激させられるものといえよう。

Kionka and Strätz¹¹⁾はかつて塩類の味の強さは主として陽イオンによって決定され、その質は陰イオンによって決定されることを報告した。おそらく化学調味料についても、これに含まれる陰イオンが前記味覚反応に重要な役割をはたしていることを十分考慮しなければならない。

塩線維のうち化学調味料に対しても反応するものは、MSG と IMP を混合した溶液および MSG と GMP を混合した溶液に対しそれぞれ単独溶液の場合と比べてはるかに著明に反応した。先に著者ら¹²⁾は MSG と IMP の混合溶液の相乗効果を猫の鼓索神経幹活動の積分曲線から明らかにしたが、前記本実験結果は単一神経線維のレベルで相乗効果がすでに生じていることを示している。

また、官能検査から、MSG と IMP および MSG と GMP の混合により呈味効果が増強されることは一般に認められているが、この場合決して“しおから味”が強くなるのではなく、

あくまで化学調味料としての“うま味”が増強される。従って上記の化学調味料に対して反応を示した塩線維のあるものを介する信号は，“しおから味”よりもむしろ“しおから味”とは関係のない比較的的特異的な信号の伝達に関与していて、大脳味覚領野に賦活的作用を果しているのではなからうか。

以上、これら単一味覚神経に生じる反応態度から考えて、Beidler⁸⁾の述べた如く、各味細胞は基本的四味物質のいずれかにのみ特徴的に応答するような単純なものではなく、各味細胞の興奮機序には、より複雑な因子が関係しており、各味細胞それぞれ生理的特徴があるといえよう。

V. 総 括

猫の鼓索神経中に存在し塩溶液を舌に与えた場合に特徴的に反応する単一味覚神経線維の反応を指標にして、MSG, IMP および GMP を舌表面に与えた場合の反応を分析した。

これら塩線維中には、前記化学調味料いずれにも反応するもの、IMP には反応するが MSG には反応しないもの、IMP, MSG のいずれに対しても反応を示さないものが存在することを認めた。また、IMP に対して反応する塩線維は GMP に対してもほぼ同様に反応した。

アミノ酸である MSG に核酸関連物質である IMP あるいは GMP を混合した溶液を猫の舌表面に滴下した場合、MSG, IMP および

GMP に対して反応を示す塩線維の反応に著明な相乗効果が認められ、味覚受容器のレベルですでに相乗効果が生じていることが明らかになった。これに対し、共に核酸関連物質である IMP と GMP とを混合したものでは神経反応に相乗効果は出現しなかった。

本研究に使用した化学調味料は味の素食品研究室の御好意による。ここに感謝の意を表する。

文 献

- 1) 河村洋二郎・足立 明 (1962) 日本生理誌 **24**, 333
- 2) 足立 明 (1962) 日本生理誌 **24**, 607
- 3) 河村洋二郎・船越正也・足立 明・岡本純一 (1964) 日本生理誌 **26**, 286
- 4) 足立 明・船越正也・笠原泰夫・河村洋二郎 (1964) 日本生理誌 **26**, 306
- 5) Beidler, L. M. (1951) J. Neurophysiol. **16**, 595
- 6) de Lorenzo, A. J. D. (1963) Olfaction and Taste, ed. by Y. Zotterman, Pergamon Press, Oxford, pp. 5-17
- 7) Kimura, K. and L. M. Beidler (1961) J. Cell, Comp. Physiol. **58**, 131
- 8) Beidler, L. M. (1963) Olfaction and Taste, ed. by Y. Zotterman, Pergamon Press, Oxford, pp. 133-145
- 9) Von Békésy, G. (1964) J. Appl. Physiol. **19**, 1105
- 10) Cohen, M. J., S. Hagiwara and Y. Zotterman (1955) Acta Physiol. Scand. **33**, 316
- 11) Kionka, H. and F. Strätz (1922) Arch. Exp. Path. Pharm. **95**, 241
- 12) 足立 明 (1964) 日本生理誌 **26**, 347

地方小学会報

第31回近畿生理学談話会 (つづき)

時 昭和39年7月14日午前9時半-午後5時

所と当番 大阪医科大学講堂 中西政周・笹川久吾

5. 辻 繁勝・松下 宏 (和歌山医大第2生理)

筋萎縮症ハツカネズミに於ける蛋白質代謝の異常

遺伝性筋萎縮症ハツカネズミに於ける血清中及び筋肉組織中のトランスアミナーゼ活性の変動の量的相関性については既に第40回生理学会総会に於いて報告したが、その後疾病筋組織中に於けるGO-T, GP-Tを中心とした代謝経路の量的変動及び正常組織との質的な差異に検討を加えた。即ち疾病骨格筋中のGO-T, GP-T活性値は正常組織の約2倍近い上昇が認められるが、心筋の場合は殆んど変化が認められなかった。骨格筋及び心筋の組織をミトコンドリア画分と上清画分とにわけてそれぞれの活性値を測定した所、骨格筋に於いては両酵素共に上清画分の活性値のみが正常値と比較して著しく上昇していることがわかった。これはそれぞれの画分に存在する isozymeのうち特に上清画分の酵素のみに変性が存在する事を示すものと思われた。心筋ではこのような変化は認められなかった。血清中に之等両酵素の活性を上昇させる activator の存在が知られているが、疾病骨格筋では血清添加による活性値上昇が殆んど見られなかった。又60°C, 30分の加熱処理に対する不活性化率が疾病骨格筋でやや高い事等から疾患部の之等酵素に質的な差異が存在する事が推測された。コーチゾンの皮下注射によって生ずる両酵素の誘導率はGP-Tでは正常個体と同程度であったが、GO-Tの場合は正常個体では誘導されるのに対して疾患部では全く誘導が見られなかった。これらの事実に加えてグルタミン酸脱水素酵素の活性が約1.5倍上昇する事から、疾病筋肉に於いてはグルタミン酸から α -ケト酸への系が著しく促進されている事が判る。以上の結果のみから疾病筋中に見られる蛋白質のCatabolic processの促進が之等酵素変性に起因することは断定出来ないが、酵素の質的な変性が先天的なものか或いは他の代謝経路の異常によって惹起されたものであるかは興味ある問題と思われる。

6. 畑 滋二・大柴 進 (神戸大第1生理)

Plasmin の TAMEsterase 抑制因子について

著者等は既に動物の胆汁、特に家兎の胆汁が、Plasmin の TAMEsterase 活性を特異的に抑制する事を見出し、家兎胆汁と Epsiron amino caproic acid (EACA) を用いる事によって Plasmin の酵素活性を、フィブリノリシン型と非フィブリノリシン型に大別出来る事を報告した(第29回近畿生理学談話会)。その後、家兎胆汁の TAMEsterase 抑制因子の性質について追求した結果此の因子は耐熱性、透析性である事。水溶性、アルコール可溶性、70-90% アセトン可溶性、エーテル不溶性である事。酸性化によって沈殿化する事等が分った。

以上の如き分析結果から、此の因子は、胆汁酸塩に属する物質であろうと云う見当のもとに、下記の4つの物質について T Spontenious activated plasmin の TAME 分解活性抑制効果を比較した。結果は、Sodium desoxycholate>Sodium taurocholate>Sodium glycocholate>Sodiummcholate の順であり、Sodium desoxycholate $2.5 \times 10^{-3} M$ の濃度に於て、50% inhibition を示した。そこで著者等は、未だ家兎胆汁中の抑制因子の同定を行っていないが、一応 Sodium desoxycholate を Plasmin の TAMEsterase inhibitor と認め、その作用様式について、若干の検討を行ない、次の如き追加的知見を得た。

1) Sodium desoxycholate は、すでに活性化された Plasmin の TAMEsterase 活性を抑制するのみならず、SK による TAMEsterase 活性発現過程をも抑制した。しかし、Preconsor の potential に対しては、阻害作用を示さなかった。

2) Sodium desoxycholate は、SK-activated Plasmin の Lysine ethylestev (LEe) 分解作用に対しても、強い抑制効果を示した。

7. 川井 浩・村上長雄 (三重大第1生理) 武部吉秀 (京大教養)

赤血球内心臓促進物質の身体運動における意義

〔A〕 赤血球内容物中に末梢血管収縮昇圧作用をもつ物質が含まれる事は既に報告されており、今泉はこの有効成分は *adrenaline* であるとしている。我々の実験より、当該物質は耐熱性であり、60% *ethanol* で沈澱、PCG で $R \pm 1.5-2.1$ (溶血液より *butanol*、塩酸で抽出、展開液には酢酸 *butanol* を、発色には *pot ferricyanite* を用いた) である事が判った。墓心灌流標本において、著明な収縮促進作用を示したが、最初の促進後暫時の抑制を経て顕著な促進に移行する点 *adrenaline* と作用態度を異にした (墓、家兎、及び人間の赤血球よりの資料で全く類似せる結果を得た)。なお家兎でその自家溶血成分は著しい昇圧作用を示した。

〔B〕 (1) 急速努力走で赤血球抵抗性の減弱をみ、その際得られた血液単位量より得られた赤血球溶血成分は、墓心収縮作用及び沃度酸値何れもにおける低下を示した。一方、家兎で *adrenaline* 静注は赤血球抵抗性に同様の影響を与える事、及び赤血球を *adrenaline*-Ringer 液に浮遊させる事によりその大きさの減少する事 (*spherocyte* の増加を示すものと考えられる) を観察した。(2) 合宿練習で第3日には血圧の上昇、赤血球抵抗性の若干の減弱、第5日には血圧の下降傾向、赤血球抵抗性の増大をみたが、第7日 (種々の点より疲労期に相当) には両者とも最低を示し後回復傾向を示した。一方家兎で1日5回30分間隔で *adrenaline* を筋注した際の赤血球数及びその抵抗性の消長をみるに、前者は第3日まで増加その後急峻な低減を示し第5日に最低を示し後回復傾向を示し、後者はこの消長にやや先駆する略々平行した波動を示した。

以上より身体運動により強力に分泌される副腎髓質ホルモンが赤血球に作用し、その抵抗性を減弱する事により、赤血球内強心昇圧物質を遊離させ、運動能力維持に役立つと考えられる血圧の維持に貢献するものと考えられる。なお家兎でその溶血成分は血漿 Na 濃度上昇作用を示した。

8. 伊東洋一郎 (大阪市大第2生理)

ラットと血清並びに臓器抽出液の淋巴組織細胞分裂促進作用とそのレ線照射後の時間的変動について

生体内に存在する微量の活性物質を生体反応を示標として検出する為には、動物の個体差や試料の間接作用を除去する必要がある。ラットの淋巴組織の増殖が主として血中の物質により支配されるとの想定の下に30匹の正常ラットの左右両膝窩淋巴節を剔出してその *mitosis* 頻度を調べた結果、大巾の個体差にも拘らず同一個体の左右両淋巴節の *mitosis* 頻度には 0.67 という有意の相関が見られた。従って試料を一側足底に注射後両側淋巴節の *mitosis* 頻度を比較する事により、微量の活性物質の検出が可能である。今回はこの方法を用いてレ線照射後のラット血清中に出現する淋巴組織 *mitosis* 促進物質の活性を時間的に追求し、更に正常ラット並にレ線照射ラットの臓器抽出液中に存在する類似の活性物質を調べた。

550 r のレ線全身照射によりラットの末梢淋巴球は24時間以内に急減した後徐々に回復に向い、約20日後には正常値に復帰する。一方血清中の淋巴組織 *mitosis* 促進物質は24時間以内に最高に達した後急減するが末梢淋巴球数が正常値に復帰する20日目迄は微量乍ら存続する。

ラットの臓器食塩水抽出液は活性とそのレ線照射後の時間的変動により3群に大別される。第1群は顕著な活性を示す消化管及びその内容物であるが、濾過、加熱、透析等の操作により調べた結果、活性は易熱性の高分子化合物、恐らく細菌毒素に由来すると想像される。かかる物質がレ線照射後消化管壁を通して一時血中にその濃度を高める可能性が考えられる。第2群は血清と類似の変動を示すもので、骨髓や骨格筋等が之に属する。高度の稀釈にも拘らず血清より遙かに強い活性を示す骨髓では活性物質の濃縮或いは産生が考えられる。第3群は脳下垂体、甲状腺、副腎、胸腺、脾、淋巴節、肝、腎、皮膚等で血清と逆の時間的変動傾向を示し、血清中の活性物質は主として之等諸臓器から由来するものと思われる。この活性物質の性状は未だ不明であるが、目下その解明を企てている。

9. 高坂広子・川口 茂・川口美代子・辻本 毅丸山茂樹・長井音次 (和歌山医大第1生理)

心筋ミトコンドリア (Heart Sarcosome) の呼吸調節に就いて

前に上西は白鼠肝ミトコンドリアのコハク酸呼

吸において、共役状態ではADP呼吸調節はアデニレートキナーゼを介して行なわれていること、非共役状態では高エネルギー中間物の存在によって支えられることを報告した。

今回は心筋ミトコンドリアでのコハク酸呼吸に就いて報告する。

1. 共役状態においてADP呼吸調節が見られることは肝ミトコンドリアと同様である。

2. Mgイオンの呼吸調節に及ぼす影響は肝ミトコンドリアの場合と異り、呼吸調節率を低下させる外見を呈している。即ちstate 3呼吸速度を低下せしめ、state 4呼吸速度を上昇せしめる。

これをPN(ピリジンヌクレオチッド)のエネルギー依存酸化還元を通して見る時、Mg無添加の場合はstate 3-4遷移を反復的に示すが、Mg添加の場合はstate 3-4遷移は反復性を失ない、state 4水準が酸化型に移行する。ATPの添加ではstate 3は見られぬのは当然であるが、ADPの場合と全く同様Mgの存在下でPNのstate 4水準は酸化型に移行する。これはMgによりADP→ATP→ADPの輪回機構が賦活されたことを意味する。この様な輪回機構として考えられるものはアデニレートキナーゼとADPフォスホリラーゼである。この機構の賦活はstate 4とstate 3の弁別を不明瞭化し、一方高エネルギー中間物の蓄積を減小せしめ、且つPNの酸化還元水準を酸化に傾かしめる。

3. Uncouplerによっておこる呼吸はstate 3速度である筈であるが(state 3u)。高エネルギー中間物の蓄積と水解の速度の大小によって、高速度なstate 3u呼吸の持続時間が規制される筈である。

ここに与えた非共役実験の代謝条件は又上の理に定性的に合致している。

4. オリゴマイシンにより末端磷酸化段階を抑制するときにはMg-ADPがPNのstate 4水準に与える酸化傾向を全く消去する。Caイオンの少量はこの場合でもPN水準にstate 3-4遷移を生起せしめる。これはCaイオンの蓄積に高エネルギー中間物からエネルギーが供給されることを意味する。

(心筋ミトコンドリア標本調整に教示を受けた阪

大萩原文二教授に謝意を表す)

10. 酒田英夫 (大阪市大第1生理)

ネコの視床腹外側核 VL の単一ニューロン活動について

視床腹外側核(VL)は解剖学的に小脳核から結合腕を経て上行する線維を受け大脳皮質運動領に投射する中継核であることが知られている。VLは視床の諸核のうち運動機能と最も密接な関係を持ち、その刺激により皮質運動領に潜時の短い誘発電位を発生しさらに遠心性に錐体路の発射を起し脊髄前角細胞に興奮性の影響をおよぼすことが知られている。本実験では、ニューロンの活動を直接記録し、その活動様式を分析して機能的構造をしらべた。

方法：約50匹のネコを用い、エーテル麻醉下に手術し脳定位固定装置を用いて軽いネブタール麻醉下で実験を行なった。記録には3M-KCl電極抵抗(2-10 MΩ)を用い、これをstereotaxicにVLに刺入し細胞外記録で単一ニューロンの活動をしらべた。双極刺激電極を用いて結合腕に1秒1回の刺激を繰り返しながら微少電極を刺入し同刺激で誘発されるニューロンの単位発射を分離しそれについて大脳皮質刺激、基底核、視床非特殊核等の刺激の影響をしらべた。

結果：1. VLには小脳刺激に短潜時で応じるニューロンが分布している。2. そのニューロンの大部分は1.5-2.0 msecの潜時で発火する。VLへの求心性線維の発射の潜時は0.7 msec以上でありこれより計算すれば1.5-2.0 msecで現れるスパイクは単シナプス性の興奮と考えられる。3. このニューロンは皮質十字回の刺激で逆行性に発火する。4. 逆行性発火を起す皮質の部位の分布は前十字回に多く、後十字回には少ない。即ちVLから皮質への投射は運動領が主で体性感覚領は少ない。5. VLニューロンへは淡蒼球刺激では促進、視床非特殊核刺激ではじめ促進のち抑制の影響があらわれる。

(この実験は東大脳研究所生理学部門において、脳神経外科石島武一、東北農学部豊田裕と共同で行なったものである)

(以下次号掲載予定)

短

報

〔会報〕

日本生理学会常任幹事会議事要録

日 時：昭和40年4月10日（土）正午より，午後4時

会 場：学士会館本郷分館

出席者：(16名)

伊藤 龍君・井上 章君・内菌耕二君・勝木保次君・竹中繁雄君・問田直幹君・藤森聞一君・松田幸次郎君・本川弘一君・鈴木正夫君（代理・本間三郎君）・吉井直三郎君・若林勲君の各常任幹事・内山孝一君・浦本政三郎君・戸塚武彦君・加藤元一君の各委員

欠席者：(10名)

緒方維弘君・鎌倉勝夫君・高木健太郎君・時実利彦君・富田恒男君・永井寅男君・西田勇君・福原武君・三田俊定君・吉村寿人君

議 長：松田庶務幹事

議事に先だって松田幹事より，事務の野口秋水君，急病のため東大吉利内科に入院，差当り庶務会計事務を附田恵氏，編集事務を佐々木祐治氏に担当してもらって急場をつなぎたい。何れ対策を慎重考慮して改めて協議願う旨を述べ，了承を得た。

1. 庶務報告（松田幹事）

生理学会々員数，評議員，常任幹事，特別会員，其他日本生理誌購読者数等の現状を別表の通り報告，また特別会員藤田敏彦君の長逝を哀悼し，本会より弔電と供花を捧げた旨報告した。

2. 会計報告（内菌幹事）

日本生理学会昭和39年度決算報告並びに昭和40年度予算を別紙の通り説明，一同これを了承した。

3. 生理学将来計画に関して，まず松田幹事より過般来学術会議内の生物科学将来計画委員会が日本生理学会の意向をも取入れることにきめた経緯，ならびにそれと並列して学術会議第7部長よりもこれについて日本生理学会の方針について諮問があった旨の総括的解説があり，次いで，本川委員より学術会議における学術振興5ヶ年及び10ヶ年計画立案，勝木委員より生物科学将来計画案審議についての説明があった。内山委員長（生理学振興委員会）よりは，先般生理学会々員に配布

の生理学将来計画についてのアンケートの回答は来る5月24日午後（生理学会総会の前々日）岐阜に於て開催予定の同委員会までに集計し報告したい。尚同日は委員以外の多数会員の参加を希望する旨，発言があった。

尚，井上幹事よりも先に関西で行った生理学将来計画についてのアンケートの回答ならびにそれに関しての同地区会員の長期計画に関する意見の紹介があった。

なお生理学振興委員会委員もこの際改組が望ましい旨の発言もあり，来る岐阜での常任幹事会で以上諸件を併せて審議することとなった。

（この件については岐阜学会前に内山委員長より各生理学研究室宛に関係事項の報告乃至資料を予め送付することになった）

4. 第23回国際生理科学会議の記念誌について：同会議組織委員会内，記念誌小委員会委員長たる内山教授よりその編集の現況，その問題点について報告があった。

5. 日本生理史編集（浦本委員長）：其後余り進んでいない。国際生理科学会議の終了次第編集を進めたい。材料集収よりすでに数年経過している故，更にその後の変動を追加する必要があると報告した。

6. 第42回日本生理学会総会の準備状況（竹中当番幹事）：これに関する報告があり，これを了承した。

7. 第17回日本医学総会（昭和42年）の件（伊藤（龍）幹事）：期日，総会講演，シンポジウム，分科会期日，会場等に就いての準備状況につき発言があったが，具体的には，まだ殆んど未決定である。分科会々長は伊藤（龍）幹事が就任と決定したが，日本生理学会総会の当番幹事に就いては未定であると。これについての従来の慣習について，戸塚，吉井両教授より発言あり，結局地区で当番幹事を近々決定し，それに総会の運営を一任することを了承した。

9. 生理誌編集（内菌幹事）：昭和39年度，第26巻編集報告（別表）。次いで去る4月3日の編集会議の経過を報告し，其際，地方編集委員として内定の諸君（北海道：藤森・永井，東北：鈴木，関東・東京：高木・富田，中部：高木，近畿：吉

井・井上・中馬，中国・四国；福原，九州；間田・佐藤(昌))に依頼した旨報告，依って従来の在京の編集委員，市岡・市河・内菌，高橋(恵)・戸塚，畠山，真島の諸君を加えて20名に内定の件を報告，了承された。

尚，高橋(恵)編集委員より，生理学会当番幹事は，小形の学会了稿集を印刷配布し，学会終了後充実した学会号を雑誌として編集したい，との希望意見ある旨報告。これについて戸塚，其他の諸君より種々発言があったが具体的決定には至らなかった。

10. 会員名簿の作製について：雑誌大，8ポ二段組，45頁として単価60-64円，1,500部の印刷費約90,000-96,000円，外に郵送費を必要とする予定，その可否を審議した結果，この名簿作製そのものには反対意見はなかったが，経費について更に検討することとなった。

庶務報告

(昭和39年12月末現在)

会員数	1,565名
学校図書館・研究所等の購読	112部
外国の購読者及び書店取次	45部
寄贈・交換その他(外国26部)	45部
計	1,767

役員 評議員 423名 内 常任幹事 23名
特別会員(11名) 東龍太郎君・板垣政彦君・浦本政三郎君・加藤元一君・久野 寧君・小玉作治君・坂本嶋嶺君・暉峻義等君・中西政周君・林 香苗君・山極一三君。

日本生理学雑誌26巻(39年度)編集報告

第26巻1号-12号(12回発行)

毎号の印刷部数	1,800部
第26巻の総頁数	688頁
(内訳) 原 著	40編 397頁(約58%)
抄 録	166頁(約24%)
業績目録	30頁(約4%)
会報及総目次	56頁
広告頁	39頁
	(約14%)

日本生理学会昭和39年度決算報告

(自昭和39年1月1日)
(至昭和39年12月31日)

収 入

昭和38年度より繰越高	2,219,557円
昭和39年収入	3,169,475円
(内訳) 会 費	1,808,100円 (1,135名) 約76%
購 読 料	255,837円 (159部)
会 誌 分 冊 売	21,300円
広 告 掲 載 料	273,760円 (25巻9号-26巻7号)
論 文 掲 載 料	688,960円 (33編)
預 金 利 子	99,368円 (振替貯金及び銀行預金)
日本医師会奨励金	20,000円 (38年度)
そ の 他 収 入	2,150円 (生理学用語集その他)
合 計	5,389,032円

支 出

昭和39年度支出	2,767,631円
(内訳) 発送料及び通信費	221,126円 (25巻12号-26巻10号発送料その他)
人 件 費	858,700円
会 合 費	59,765円 (常任幹事会及び編集会議)
交 通 費	96,860円 (常任幹事会幹事旅費その他)
備 品 費	0円

編 集 費	122,460円	(26巻1号-12号校正代)
原 稿 費	0円	
印 刷 費	1,302,578円	(25巻12号-26巻10号印刷代その他)
雑 費	45,460円	
事 務 室 費	13,483円	(事務室及び光熱費等)
総 会 費	27,489円	(プログラム印刷代)
職員健康保険費	17,520円	
各種委員会費	2,190円	(生理学会振興委員会関係)
昭和40年度へ繰越高		2,621,401円
振 替 預 金	475,335円	
銀 行 預 金	644,772円	
現 金	1,294円	
基 金	1,500,000円	(三菱信託銀行定期)
合 計		5,389,032円

日本生理学会昭和40年度予算

(自昭和40年1月1日)
(至昭和40年12月31日)収 入

昭和39年度より繰越高	2,621,401円
昭和40年度収入	3,200,000円
(内訳) 会 費	1,860,000円
購 読 料	200,000円
会 誌 分 冊 料	20,000円
広 告 掲 載 料	290,000円
論 文 掲 載 料	700,000円
預 金 利 子	110,000円
日本医師会奨励金	20,000円
合 計	5,821,401円

支 出

昭和40年度支出	3,200,000円
----------	------------

(内訳) 発送料及び通信費

人 件 費	250,000円
会 合 費	900,000円
交 通 費	70,000円
備 品 費	100,000円
編 集 費	20,000円
原 稿 費	140,000円
印 刷 費	50,000円
雑 費	1,400,000円
事 務 室 費	40,000円
総 会 費	20,000円
職員健康保険費	40,000円
各種委員会費	20,000円
予 備 費	50,000円
	100,000円

昭和41年度へ繰越高	2,621,401円
合 計	5,821,401円

〔編集後記〕

何時まで寒が続くのかと思わせた今年の春もようやく過ぎ去ろうとする頃、第5号が出来上がった段取りとなった。

○ 本誌存在の理由乃至目的の一つは、日本語で書かれた論文の概要なりともが世界の人の目にとまるようにという点にある。このために欧文抄録は是非200語程度にまとめて頂き度い。そうすると刷り上った抄録は大型カードの大きさとなり、

外国人が抄録の部分だけを切り抜いて保存することができるからである。さらに、次号からは表題、著者名、誌名(いづれも欧文)巻、号、頁等が、このカードの枠内に入るよう、従来とは違った配置にするつもりである。

○ この四月に教授陣に若干の異動があったので、退職された方や新任された方に総説をお願いしようと思っている。また、新婦朝者にもお願いしようと思っている。

○ 原著は勿論のこと、短報欄への御投稿も是非どうぞ。
(市岡正道)

*世界に進出する

Shimadzu MICROSCOPE

ひんばんな使用に耐えて、感度敏感な微動装置！

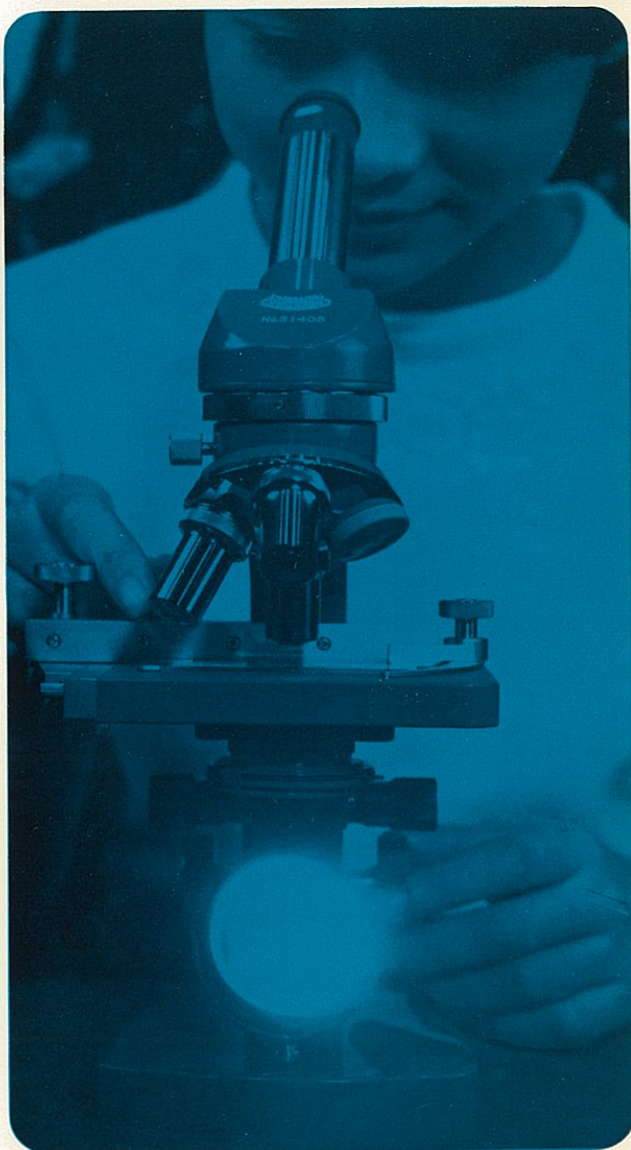
大形生物顕微鏡

PL形



PL形は各部に交換性を持った安価な高級顕微鏡であります。

1. 交換可能、回転自由の傾斜鏡筒
2. 高機構・高感度微動装置
3. 写真撮影に適したスマートで、安定性ある鏡基



形 名	PL-S1	PL-S2
ステージ	角形固定式	角形二軸十字動式
接眼レンズ	H5×, H10×, H15×	H5×, P10×, P15×
対物レンズ	10×, 40×, H1100×	
拡大力	50×~1500×	
定 価	¥36,900	¥45,400

〈カタログ進呈〉

Shimadzu MICROSCOPE

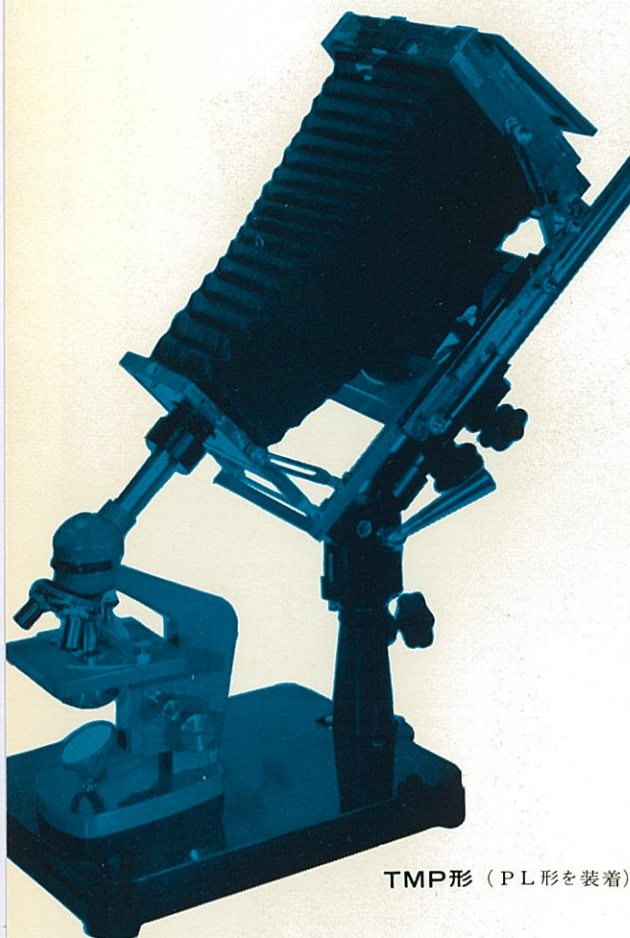
みたままの像が写真にとれる！

顕微鏡写真装置

TMP形



島津顕微鏡写真装置TMP形は精密なよい構図を得るための顕微鏡写真の撮影 および図書の複写、ふかん写真、無陰影写真などあらゆる撮影に応用できる万能写真撮影装置であります。



TMP形（PL形を装着）

● 特 長

1. 撮影倍率は検鏡倍率と同じ
2. すべての顕微鏡に使用できる
3. 安定な基台
4. 顕微鏡へ重量がかからない
5. 利用範囲の拡大
6. 安全な付属品

定価 ￥ 43,200 円

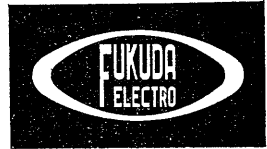
〈カタログ進呈〉

科学器械事業部 京都市中京区西ノ京桑原町18 京都81-1111
本社 京都・支社 東京・支店 大阪 福岡 名古屋 広島 札幌 仙台



島津製作所

RS-102A - B型

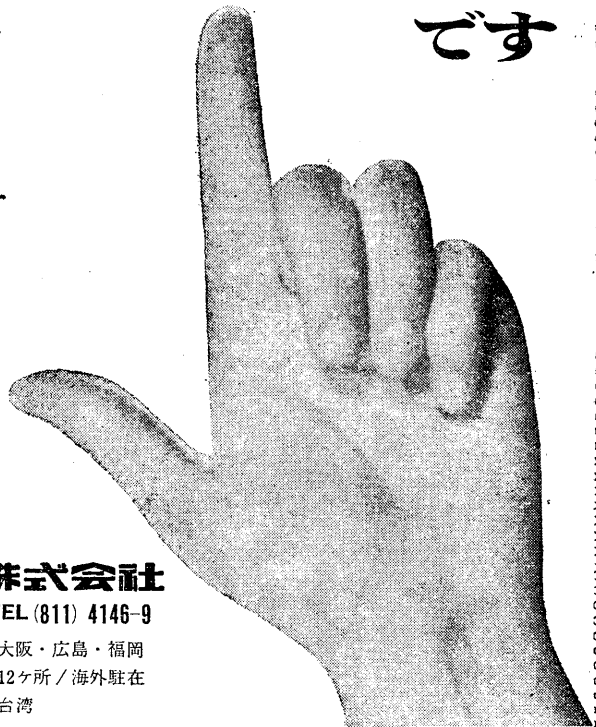


医用電子の総合技術が生んだ
優れた性能……

卓越した電氣的諸特性が信頼性の高い波形を描記いたします／専門的な器機的知識や複雑な操作のいらない自動連動機構／樹脂と金属とを特殊合成し防錆耐薬の新材質採用／洗練されたデザイン診療室に調和する色彩／長期保証つき

オールプッシュボタン方式・極性切換装置つき・セレクターとインストの自動連動機構・感度切換装置つき・自動的ペーパールーム・電氣的変速機構・記録紙残量表示装置つき・ブラウン管出力端子つき・その他諸機構に創意工夫が数多く採用され操作能率の著しい向上が本器により達成せられました。

これが
ニュー
カルジオライト
です



福田エレクトロ株式会社

東京都文京区本郷2丁目35番8号 TEL (811) 4146-9

支店所在地／札幌・仙台・東京・名古屋・大阪・広島・福岡
岡山／営業所・全国13ヶ所／出張所・全国12ヶ所／海外駐在所・HAMBURG・NEW YORK・台湾

各科領域における

健保適用

37.10.1より

耐性

ブドウ球菌感染症に



医薬は萬有

内服用・注射用・新合成ペニシリン

スタフシリン-V

STAPHICILLIN-V (メチルフェニルイソキサゾリルペニシリンナトリウム)

内服用 (錠剤・カプセル)・筋注用

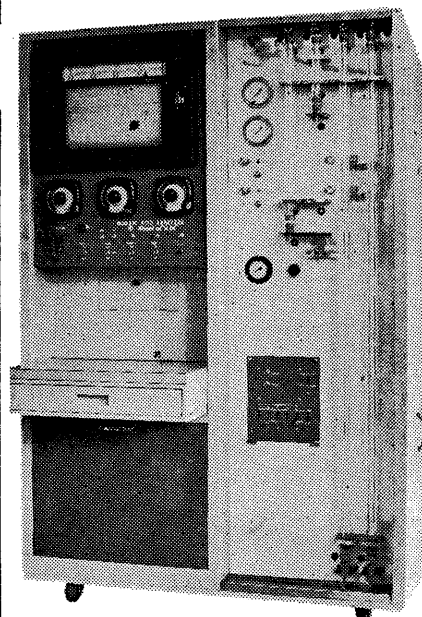
製造発売元 萬有製薬株式会社 東京都中央区日本橋本町 2-7

■核酸の迅速分析に威力を発揮する

柳本核酸自動分析装置

LC-11型

- 本装置は、イオン交換クロマトグラフ法の原理に基づいて核酸を分離し、その溶離液について紫外外部吸収の連続測定を行なうもので、比色計には複光速光学零位法を使用した紫外外部連続比色計を用いているのできわめて高安定であります。
- ダブルカラム(溶離用および塩濃度補正用)複光速光学零位法に基づく比色計を用いているので、塩濃度変化によるベースラインの変動を補正することができます。
- 複光速光学零位法を用いているので、電源電圧の変動大きい場所でも安定して測定できる。
- フラクションコレクター(特別付属品)を内蔵することにより展開溶出液を分取することができます。



LC-11型

■詳細資料進呈■



株式会社 柳本製作所 柳本商事株式会社 本社 支店 本社 支店 京都市中京区木屋町通三条下ル 東京・大阪・名古屋・福岡・広島・藤沢・札幌

Journal of the Physiological Society of Japan Vo. 27, No. 5 (1965)

Originals

UOZUMI-Mitsuro : Photoabsorption-und ESR-spektrometrische Untersuchung über Xanthin Oxydase	243
SIINA-Hiroshi : The role of intramural ganglion cells taken in the acetylcholine formation	270
KAWAMURA-Yojiro・ADACHI-Akira : Single taste nerve responses to the chemical taste enhancers	279

昭和四十年四月二十日印刷

編集
兼
行人

東京都文京区本郷七丁目三ノ一
東京大学医学部生理学教室内

戸塚武彦

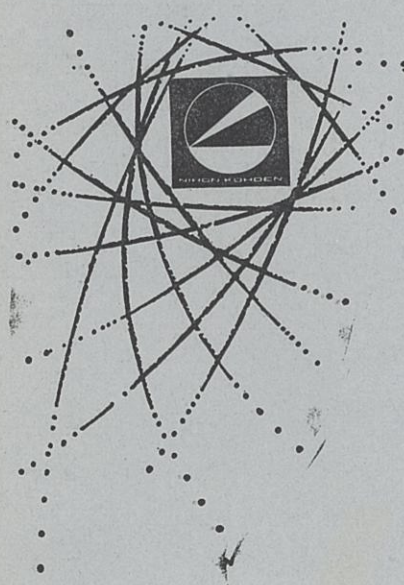
印刷所
印刷者

山形県鶴岡市馬場町甲三
中村作右衛門
鶴岡印刷株式会社

発行所

東京都文京区本郷七丁目三ノ一
東京大学医学部生理学教室内
日本生理学会

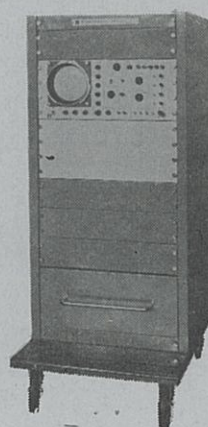
振替東京八六四三〇
定価百五拾円



専門メーカーが誇る 医用電子装置

デジタル型 ON-LINE 方式の
データ処理用電子計算機

- 入力信号は直ちに演算されブラウン管上で結果が直読できる。
- 誘発反応の加算の他、外部トガリによる加算も容易。
- 4つの現象の同時解析が可能。
- アナログ及びデジタル出力が取り出せる。
- 関連する各種付属装置の組合わせにより用途が広範。



日本光電工業株式会社

東京営業所 東京都新宿区角筈2-84 スタンダードビル TEL (342) 0231~8, 3674 仙台営業所 仙台市東3番丁70 山一會館 TEL (25) 1395
 大阪営業所 大阪市北区南森町11 第一ビル TEL (351) 2531~7 福岡営業所 福岡市浜小路 浜小路ビル TEL (3) 7931~4
 名古屋営業所 名古屋市中区栄王山通り7-1 田代ビル TEL (75) 7068 札幌営業所 札幌市豊平三条3-12 美好ビル TEL (81) 5706