

# 白ネズミ小腸のフィターゼ

遠藤 亮子・高橋 平八郎

## On the Phytase of Rat Small Intestine

By

Ryoko ENDŌ and Heihachrō TAKAHASHI

### 緒 言

フィチン酸 (meso-inositol hexaphosphate) はそのCa, Mg, KやNaなどの塩であるフィチンの形で穀類などに広く分布している。そしてこのフィチン酸をイノシトールとリン酸に水解する酵素フィターゼが米, コムギ, サツマイモなどの高等植物やネズミなどの高等動物にも存在していることが知られている。このうち植物起源の酵素についての報告は多く、永井らは小麦ふすまから1500倍に活性を高めた、超遠心的にも電気泳動的にも均一な標品を得、その特性について詳細な研究を行っている。しかしながらその生理的意義は明らかにされていない。一方小柳らは米のリンの利用についての研究を行い、卵白を白米とともに白ネズミに与えると、ビタミンDを与えた時と同様に米中のリンのネズミ体内への利用が著しく増し、同時に腸内フィターゼも高まると報告しているこのことはフィチン態の吸収利用がフィターゼによる消化と関連の深いことを示めしている。しかし動物起源のフィターゼに関する研究は少なく、著者らはフィチン態の吸収利用の研究に先だち、フィターゼの性質を明らかにする必要があると考え、白ネズミ小腸磨砕物抽出液を用いて実験を行った。

### 実 験 材 料 お よ び 方 法

#### 1. 基質 (フィチン酸ナトリウム) の調製

米糠に10倍量 M/2 塩酸を加えて30分間攪拌抽出し、遠心分離 (3000 $\gamma$ . P.m 30分) して得られた上清を3倍量の水で希釈し、これに10%塩化第二鉄溶液 (M/6塩酸に溶解) を加え生じたフィチン酸鉄の沈澱を遠心分離によって集め、これに5N水酸化ナトリウムをpH 11.5になるまで加えフィチン酸ナトリウムとし、同時に生成する水酸化鉄を遠心分離して除き、5N塩酸で中和後 $\frac{1}{2}$ 量のエタノールを加えて数日間放置し結晶化する。この結晶を集めて水に溶解、再び $\frac{1}{2}$ 量のエタノールを加えて再結晶する。この方法で得たフィチン酸ナトリウムは低リン酸エステルを含有している<sup>4)</sup>ので更に上原らの方法により、Dowex1 $\times$ 1 [Cl型] を用いたイオン交換クロトマグラフィーにより、イノシトールヘキリン酸エステルを分離し、濃縮後バリウム塩とし次いで硫酸処理によってバリウムを除き水酸化ナトリウムで中和してナトリウム塩とし、エタノール添加によって結晶化を数回繰り返す。基質溶液を調整するにあたっては、リン酸定量値からその濃度を求めそれより所定濃度の液に調製した。

#### 2. 酵 素 液 の 調 製

一日絶食させ腸内容物を排除させた白ネズミを屠殺し、小腸部分を取り出して4%食塩水で洗浄後濾紙に夾んで水分を除く。これに5倍量の水と少量の海砂を加えて乳鉢で磨砕し、トル

エン数滴を加えてセロファンチューブを用いて流水中で一夜透析，無機リン酸を除く．これを遠心分離（10,000r. p.m.20分）しその上清を酵素溶液とした．

### 3. 酵素作用の測定

1) フィターゼ作用； 0.0025Mに調製したフィチン酸ナトリウム液 0.5 ml を試験管にとり，緩衝液 1.3 ml，蒸留水 0.2 ml を加え，38°C で酵素液 0.5 ml を加えて 60 分間作用させる．10% トリクロール酢酸 2.5 ml 加えて反応を停止させ，そのまま 15 分間放置し，濾液の一定量をとって，生成した無機リン酸を中村の方法で定量した．酵素活性は生成無機リン酸のリン量で表わした．各種イオンの影響を見る実験では，それらを加えない場合の活性を 100% としてそれに対する比率で表わした．

なお緩衝液は pH5.8~6.6 では 0.2M マレイン酸緩衝液を，pH6.8~8.6 の範囲ではペロナール緩衝液を用いた．

2) ホスホモノエステラーゼ作用： 0.1M  $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウム溶液 0.5 ml，ペロナール緩衝液 1.3 ml 0.05M 酢酸マグネシウム 0.2 ml に酵素液 0.5 ml を加えて 38°C 15 分間反応させ，10% トリクロール酢酸 2.5 ml を加えて反応を止めた後，フィターゼの場合と同様に生成リン酸量を求めた．

## 実 験 結 果

### 1. pH と 酵 素 活 性

図 1 のごとく pH6.6 と 8.4 の 2 ヶ所に至適 pH が存在する結果が得られた，これから，この粗酵素液中にフィターゼ作用をもったものが 2 種類存在することが考えられ，以下 pH 6.6 と 8.4 で測定を行った．

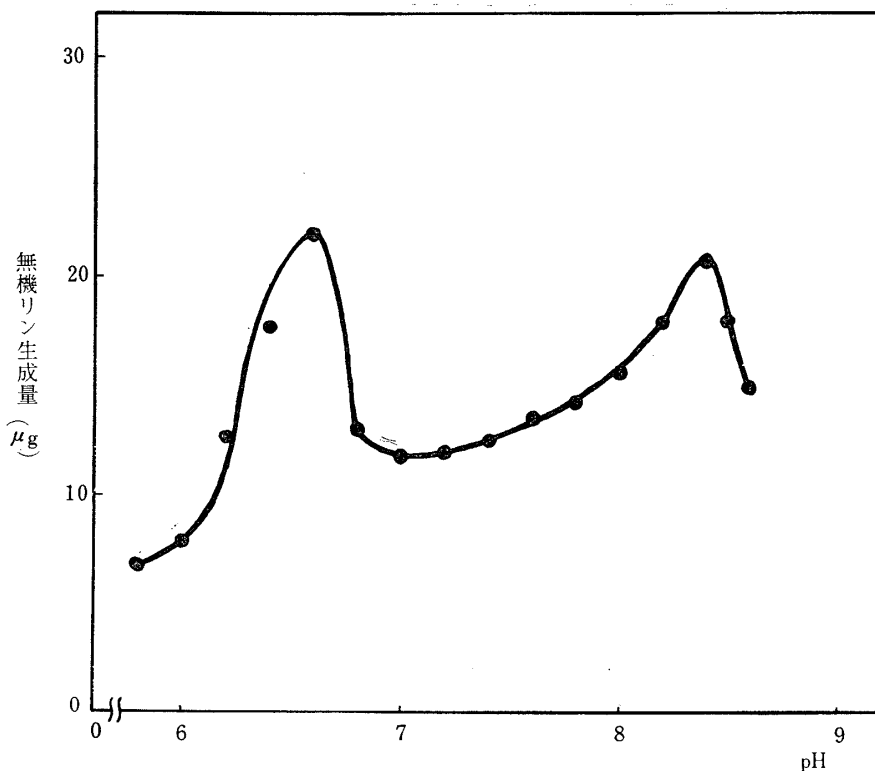


図 1 pH と 酵 素 活 性

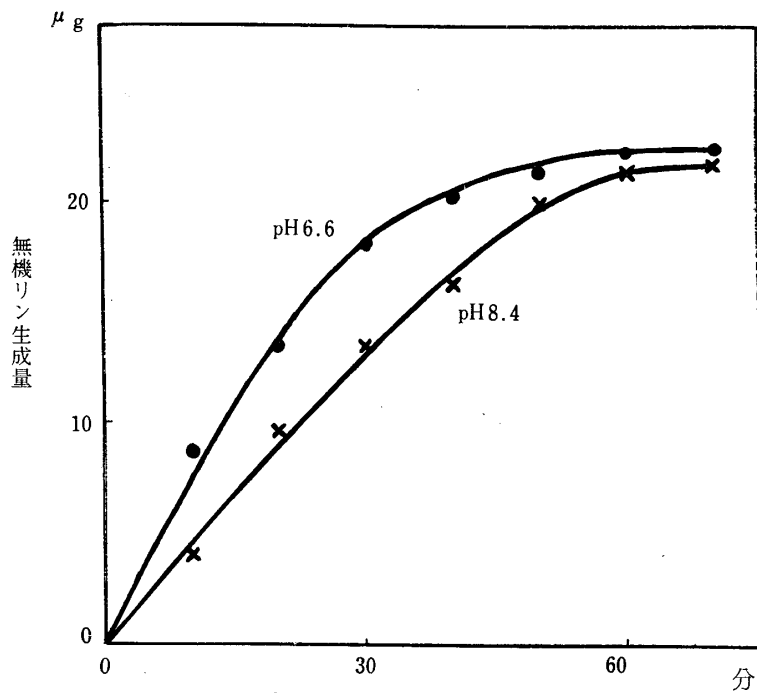


図2 反応時間と作用力 (基質濃度 0.0005M)

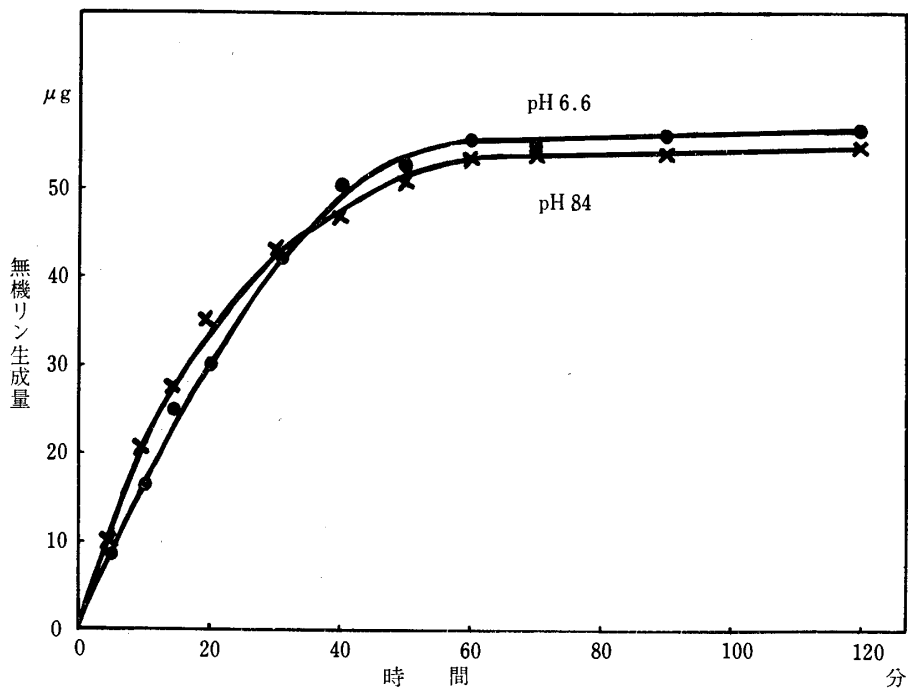


図3 反応時間と作用力 (基質濃度 0.000M)

## 2. 反応時間と酵素作用

図2, 図3示したごとく, 基質濃度が0.005M, 0.0005 Mいずれの場合も, また pH6.6 においても, pH8.4 においても約60分で水解量は一定に達した。またこの時の加水分解率は基質濃度0.005M, pH6.6では6.1%また pH8.4では5.7%であった。さらに0.0005M, pH6.6では22.2%, pH8.4では21.2%であった。

### 3. Mg<sup>2+</sup> の影響

pH6.6ではMg<sup>2+</sup>は酵素作用を増加させるが、濃度が高ければその効果は減少し、1.6×10<sup>-3</sup>Mではやや阻害的であった。pH8.8においてはMg<sup>2+</sup>は阻害的に作用している。

表1 Mg<sup>2+</sup> の影響

| (CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Mg | 酵 素 活 性 |       |
|--|---------|-------|
|  | pH6.6   | pH8.4 |
| な し  | 100%    | 100%  |
| 4.0×10 <sup>-4</sup> M                             | 217     | 59    |
| 8.0×10 <sup>-4</sup> M                             | 130     | 58    |
| 1.2×10 <sup>-3</sup> M                             | 105     | 41    |
| 1.6×10 <sup>-3</sup> M                             | 83      | 18    |

表2 Ca<sup>2+</sup> の影響

| Ca Cl <sub>2</sub>   | 酵 素 活 性 |       |
|----------------------|---------|-------|
|                      | pH6.6   | pH8.4 |
| な し                  | 100%    | 100%  |
| 4×10 <sup>-4</sup> M | 100     | 98    |
| 4×10 <sup>-3</sup> M | 58      | 36    |

### 4. Ca<sup>2+</sup> の影響

Ca<sup>2+</sup>は表2に示したごとく、フィチン酸の水解を減少させた。Ca<sup>2+</sup>は中性付近からアルカリ性領域にかけてフィチン酸と結合し易く高濃度では不溶性塩となって沈殿を生ずる。

事実本測定条件の基質濃度において、カルシウム濃度4×10<sup>-4</sup>Mで白濁が認められ、4×10<sup>-3</sup>Mでは沈殿を生じた、したがってCa<sup>2+</sup>が酵素化学的意味での阻害効果を示しているのではなく、基質実効濃度を減少させていることの影響が大きいと思われる。

### 5. PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> の影響

pH8.4においてかなりの阻害効果が認められ、pH6.2ではpH8.4における場合よりも弱い阻害的である。

表3 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> の影響

| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 酵 素 活 性 |       |
|---------------------------------|---------|-------|
|                                 | pH6.6   | pH8.4 |
| な し                             | 100%    | 100%  |
| 4×10 <sup>-6</sup> M            | 88      | 72    |
| 4×10 <sup>-5</sup> M            | 88      | 72    |
| 4×10 <sup>-4</sup> M            | 86      | 67    |

表4 F<sup>-</sup> の影響

| NaF                  | 酵 素 活 性 |       |
|----------------------|---------|-------|
|                      | pH6.6   | pH8.4 |
| な し                  | 100%    | 100%  |
| 4×10 <sup>-4</sup> M | 102     | 99    |
| 4×10 <sup>-3</sup> M | 101     | 100   |

### 6. F<sup>-</sup> の影響

ほとんど影響は認められなかった。

### 7. β-グリセロリン酸に対する作用

表5に示す通り若干の水解作用があり、アルカリ側においてその活性が高かった。

表5 β-グリセロリン酸に対する作用

| pH  | 生成無機リン酸 (pμg) |
|-----|---------------|
| 6.6 | 5.7           |
| 7.4 | 6.0           |
| 8.4 | 10.2          |

## 考 察

われわれが用いた白ネズミ小腸酵素剤では至適pHがpH6.6とpH8.4の2ヶ所にあり、それぞれのpHにおいて、 $Mg^{2+}$ の効果が異なる点よりみて、2種類のフィターゼの存在が考えられる。吉田はフィターゼを他のホスファターゼにならって、便宜的に至適pHおよび阻害剤の影響によって、5つの型に分類しているが、それによれば哺乳類臓器に存在するフィターゼ1は至適pH7.6~7.8で $Mg^{2+}$ で活性化されリン酸で阻害される。われわれの用いた酵素剤では至適pHがこれに該当せず、阻害剤および活性化剤の点から見れば、pH6.6における作用と一致する。pH8.4における性質と一致するものは吉田の分類には見当らない。このpHにおける作用がpH6.6におけるものと別の酵素作用であるとすれば、 $\beta$ グリセロリン酸に対する作用から見て、アルカリホスファターゼの性質をもつものと考えられる。

## 要 約

白ネズミ小腸磨砕抽出液を用いてフィターゼ作用を調べた。至適pHがpH6.6とpH8.4の2ヶ所に存在し、 $Mg^{2+}$ の効果が両pHで異なることから、白ネズミ小腸には少なくとも2種のフィターゼ作用をもつ酵素が存在すると推定した。

実験に協力頂いた浅見靖子、友枝由紀両氏に感謝致します。

## 文 献

- 1) Y. Nagai and S. Funahashi, 1962. Agr. Biol. Chem., 26, 794.
- 2) Y. Nagai and S. Funahashi, 1962. Agr. Biol. Chem., 27, 619.
- 3) 小柳達男, 植木美知子, 鷹角菊テル, 及川桂子, 1964. 栄養と食糧, 17, 55.
- 4) 上原喜八郎, 菅野浩一, 米谷行男, 山本浩代, 1961. 生化学, 33, 769.
- 5) 日本化学会編, 1957. 実験化学講座 23, 536.
- 6) 赤堀四郎編, 1960. 酵素研究法 2, 70.