

## 〔実験室ノート〕 その2

ペプシン作用も同時に使える

# アミラーゼの実験方法について\*\*

三 尾 隆 弥\*\*\*

### はじめに

だ液アミラーゼが、どのような条件でデンプンをどう消化するかを調べる実験で、温度やpHの影響以外に、新たにいろいろなイオン、阻害剤、またタンパク質分解酵素などとの関係をも取り上げ検討を加えたので、その結果を報告する。

### I 器具

恒温水槽、精密温度計、試験管立、モーター付攪拌装置、試験管(15×150mm)、ガラス棒(5×250mm)、ストップウォッチ、血球凝集(反応)板。

血球凝集(反応)板：ヨード反応消失時間を調べる時、従来の白色西洋紙か、白色西洋紙上の板ガラスまたは白色陶器板を用いる方法に代るもので、白色西洋紙上の血球凝集(反応)板の凹面に、ヨードヨードカリ液2滴(約0.08ml)をスポイドで滴下して反応消失時間を調べる。この方法は、ヨードヨードカリ液の滴数の調節ができ、板上の凹底が半球面のためヨード反応の色調の差異が観察しやすく、板(155×200mm)には凹(16mm)が80個あるなど非常に都合がよい。筆者は富永製作所製の血球凝集反応板を使用した。

### II 薬品及び試薬の作り方

2%でん粉液<sup>1)</sup>：可溶性でん粉10gを50mlビーカに採り、少量の冷水を加えて攪拌しながら、あらかじめ用意した480ml(脱イオン水(純水))をpH=6.8にN/10 NaOHで調整)の煮沸水中に注入する。これをさらに2分間煮沸し、放冷後500mlになるよう水を補い細口試薬ビンに貯える。

ヨードヨードカリ液：ヨード1gとヨードカリ2gを脱イオン水200mlに溶かし褐色細口試薬ビンに貯える。

稀積だ液：ガーゼ2枚しいたロートにだ液をはき出し、ろ過する。ろ液を同量の脱イオン水(pH=6.8)<sup>2)</sup>で稀積し、ろ紙でろ過して100ml三角ビンに入れ冷蔵庫に保存する。

稀積だ液混合物：表中にあげる混合物で、III区はKCl

とKBrを1N KOHで、他は1N NaOHでpH=6.8に調整する。IV区ではすべて1N NaOHでpH=6.8に調整する。V区では、ペプシンをN/10 HClでpH=2.0<sup>3)</sup>に調整し、トリプシンをN/10 NaONでpH=8.2<sup>3)</sup>に調整する。例 NaF M/10の場合：NaF 0.42gを約80mlの水に溶かし、1N NaOHでpH=6.8に調整する。これを100mlメスフラスコに移し水を補い100mlとする。

### III 実験方法

あらかじめ恒温水槽水を40°Cに調節し、2%でん粉液を100ml三角ビンに約80ml入れ、この水槽水中で加温して置く。また使用ガラス棒も同じように加温する。

#### 1) 稀積だ液の力価の調節について

まず2本の試験管に水0.2mlを1ml駒込ピペットで入れる。その1本に稀積だ液0.8mlを1ml駒込ピペットで注入し、水と混合した後、恒温水槽の試験管立てに立て、40°Cに加温する。血球凝集反応板上の凹穴10個にヨードヨードカリ液を2滴ずつ滴下する。このヨードヨードカリ液は長時間板上に放置すると退色するので実験直前に入れるようにする。つぎに、この試験管に2%でん粉液3mlを5ml駒込ピペットで押し出し、同時にストップウォッチを動かす。ガラス棒を乾いた布でふき、この試験管内に入れ攪拌する。20秒後ガラス棒を試験管壁に触れないようにして引き上げ血球凝集反応板上のヨードヨードカリ液につける。ガラス棒を流水中で洗い、恒温水槽水中で加温した後布でふき、また試験管内にもどし、攪拌40秒で引き上げヨード反応の色調を観察する。この操作を20秒間隔で、ヨード反応が消失するまで繰り返す。

ヨード反応消失時間が、80秒以内の場合は、イオンの影響が判りにくく、160秒以上の場合、作用阻止剤で実験終了に長時間を要し都合が悪い。これらのことから、ヨード反応消失時間が80~100秒間、ヨード反応試験4~5回の操作で実験終了となるようにだ液の稀積度を調整する。他の1本の試験管は調整を必要とした場合のテスト用とする。

\* 受付、昭和40年12月10日

\*\* 本報告の要旨は、科学の実験、17,428(1966)に発表した。

2) 実験の順序と結果について

実験の順序と結果は、参照、比較のため簡単に表にまとめた。この表について、I~V区の手順を述べる。

なお、表中のヨード反応消失時間は、筆者が昼食前に採集しただ液によって得たものである。

実験の順序と結果の表

実験区	実験目的	試験管記号	稀釈だ液 (ml)	稀釈だ液混合物とその濃度	混合量 (ml)	反応温度 (°C)	2%でん粉液 (ml)	ヨード反応消失時間 (秒)	説明と関係事項	
I	温度の影響	1	0.8	H <sub>2</sub> O (pH=6.8)	0.2	20	3	160	食物の温度	
		2	0.8	H <sub>2</sub> O (pH=6.8)	0.2	30	3	140		
		3	0.8	H <sub>2</sub> O (pH=6.8)	0.2	40	3	80		
		4	0.8	H <sub>2</sub> O (pH=6.8)	0.2	50	3	240		
II	pHの影響	5	0.8	CH <sub>3</sub> COOH N/10	3滴 (pH=5.0)	40	3	160	寿司の消化不良	
		6	0.8	CH <sub>3</sub> COOH N/10	1滴 (pH=6.0)	40	3	100		
		7	0.8	NaOH N/10	1滴 (pH=8.0)	40	3	200		
III	イオンの影響	8	0.8	NaCl 1 M	0.2	40	3	40	イモに塩をつけ食べる	
		9	0.8	NaF M/10	0.2	40	3	80		
		10	0.8	KCl 1 M	0.2	40	3	40	Cl <sup>-</sup> による活性化	
		11	0.8	KBr 1 M	0.2	40	3	60	Br <sup>-</sup> による活性化	
		12	0.8	CaCl <sub>2</sub> 1 M	0.2	40	3	40	Cl <sup>-</sup> による活性化	
		13	0.8	CaCO <sub>3</sub> 飽和 (pH=6.8)	0.2	40	3	60	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> による活性化	
IV	作用阻止剤の影響	14	0.8	タンニン酸 M/100	0.2	40	3	220	茶漬の消化不良	
		15	0.8	アスパラギン酸M/100	0.2	40	3	120		
		16	0.8	シスチン飽和	0.2	40	3	100	S H基の酸化	
		17	0.8	アスコルビン酸 M/50	0.2	40	3	120	S H基の酸化	
		18	0.8	モノヨード酢酸M/100	0.2	40	3	120	S H基のアルキル化	
実験区	実験目的	試験管記号	稀釈だ液 (ml)	稀釈だ液混合物とその濃度	混合量 (ml)	処理温度 (°C)	処理時間 (分)	反応温度 (°C)	2粉%液でん粉 (ml)	ヨード反応消失時間 (秒)
V	蛋白質分解酵素の影響	19	0.7	H <sub>2</sub> O (pH=6.8)	0.3	40	20	40	3	80
		20	0.7	ペプシン 1%	0.3	40	0	40	3	40
		21	0.7	ペプシン 1%	0.3	40	5	40	3	60
		22	0.7	ペプシン 1%	0.3	40	10	40	3	100
		23	0.7	ペプシン 1%	0.3	40	15	40	3	200
		24	0.7	ペプシン 1%	0.3	40	20	40	3	300
		25	0.7	トリプシン 5%	0.3	40	0	40	3	80
		26	0.7	トリプシン 5%	0.3	40	10	40	3	80
		27	0.7	トリプシン 5%	0.3	40	20	40	3	80

### 3) I区について

試験管に(1), (2), (3), (4)の記号をつけ, 稀釈だ液0.8mlを1ml駒込ピペットで4本とも入れる。つぎに脱イオン水0.2mlを1ml駒込ピペットで混合する。試験管記号(3), (4), (2), (1)の順で, 稀釈だ液力価調整のときと同じようにヨード反応消失時間を調べる。(4), (2), (1)の場合, 恒温水槽水を湯, または冷水と急速に取り換え, 素早く実験を終了する。

### 4) II区について

(5)~(7)に, それぞれ稀釈だ液0.8mlを入れる。2%でん粉液と稀釈だ液が40°Cに加熱され, ヨードヨードカリ液の滴下が終ると, (5)に, N/10 CH<sub>3</sub>COOHを3滴滴下し, 直ちに2%でん粉液を加えてヨード反応消失時間を調べる。稀釈だ液を強酸性の状態に置かないよう注意する。

(6), (7)も(5)と同じようにしてヨード反応消失時間を調べる。

### 5) III, IV区について

(8)~(18)に, それぞれ稀釈だ液0.8mlを入れ, (8)には1M NaCl 0.2mlを1ml駒込ピペットで混合, (9)にはM/10 NaF 0.2mlを混合と(18)までそれぞれ表中指定混合物を混合した後40°Cに加熱して置く。その後2%でん粉液を3mlづつ加えてヨード反応消失時間を調べる。

### 6) V区について

(19)~(27)に, それぞれ稀釈だ液0.7mlを入れ, (19)には脱イオン水0.3mlを, (20)~(24)には1%ペプシン0.3mlづつを混合する。(20)は, N/10 NaOH約2滴でpH=6.8に調整する。(21)~(24)は, それぞれ40°C恒温水槽水中で指定時間ペプシン処理をして後(20)と同じようにpH=6.8に調整する。その後2%でん粉液3mlを加えてヨード反応消失時間を調べる。

(25)~(27)には, 5%トリプシン0.3mlづつ混合する。(25)は, 1N CH<sub>3</sub>COOH約1滴でpH=6.8に調整する。(26), (27)は, それぞれ40°C恒温水槽水中で指定時間トリプシ

ン処理して後(25)と同じようにpH=6.8に調整する。その後2%でん粉液3mlを加えてヨード反応消失時間を調べる。

### まとめ

(1) この実験で, ヒトだ液アミラーゼ(α-アミラーゼ)が, Cl<sup>-</sup>やBr<sup>-</sup>により活性化されることが明瞭に判り, その活性化はCl<sup>-</sup>>Br<sup>-</sup>の順であることが確認できる。しかしCa<sup>++</sup>による保護<sup>4), 5)</sup>, CO<sub>3</sub><sup>-</sup>による活性化<sup>4)</sup>などは不明瞭である。

(2) ヒトだ液アミラーゼは, アスパラギン酸, アスコルビン酸<sup>6)</sup>, モノヨード酢酸<sup>6)</sup>などに比較してタンニン酸で顕著な作用阻止が認められる。

(3) 一般にペプシンは, ほとんどすべての蛋白質を分解するものである<sup>3)</sup>が, 酵素蛋白質のヒトだ液アミラーゼをも分解<sup>5), 7)</sup>することがこの実験で証明できる。しかもヒトだ液アミラーゼはペプシン共存でもCl<sup>-</sup>によって活性化されるという興味深い知見が得られる。これらのことから, 胃腔内でも相当量のでん粉が消化され得る<sup>7)</sup>ものと容易に理解できる。

(4) この実験からアミラーゼ(α-アミラーゼ)の作用中心部は, トリプシンの作用を受けないことが認められる。だ液アミラーゼと同じ<sup>すい</sup>臓液アミラーゼは, 胃液中のCl<sup>-</sup>と空腸の至適pHのもとでよく働く<sup>7)</sup>ものと容易に推察できる。

### 参考文献

- 1) 志賀・吉川・荒谷: 生化学実習, 116(1953) 南山堂
- 2) 坂口・朝井編: 酵素, 186(1953) 朝倉書店
- 3) 赤堀四郎編: 酵素研究法, 2, 108・260・274(1958) 朝倉書店
- 4) 及川淳: 蛋白質核酸酵素, 5, 131(1960)
- 5) 山本武彦: 蛋白質核酸酵素, 2, 91(1957)
- 6) 伊藤正晴: 蛋白質核酸酵素, 3, 334(1958)
- 7) 広畑竜造: 生化学講座, 7, 3・16・20(1961)