

ウレアーゼ及び其應用に關する研究

教授 農學士 竹内徳三郎

目次

緒言

第壹章 文獻

第貳章 酵素の分離

第參章 酵素の特殊分解作用

第四章 温度の影響

第五章 高等植物界に於ける分布

第六章 尿素の分析

摘要

緒言

予は曩に大豆種子中に尿素分解酵素を見出し高等植物體中にウレアーゼの存在せる事を明にせしが爾來是に關する研究盛に行はれ其分布性狀及び應用等に就き種々の文獻出づるに到れり。予も亦數年來是が研究の歩を進め興味ある結果を得たるを以て茲に總括して其梗概を報ずることとせり。

第壹章 文獻

尿素が酵素の作用により分解せらるゝ事實は一八七四年 Musculus (Compt. rend. 82, 334) の發見に係り次で Pasteur & Joubert (Centrbl. f. Bakt., II, 1876, 2, 3) により確證せられたりしが後 Lenbe Virchows Archiv. 100) は Micrococcus ureae に尿素分解酵素の存在せることを示し又 S. Lea (Journ. Physiol., 1885, 6, 136) は尿素菌體より粉末狀態にて該酵素を得たることを報じ P. Miguel (Compt. rend., 111, 379) は諸種の尿素菌より比較的純粹に該酵素を製出し之に Urase なる名を與へたり此名稱は間も無く Bouquetot (Bull. Soc. Mycol., 1893, 8, 421.) によりて Urase と改められ爾來此語が專用せらるゝに到れり其後 Beijerinck (Centrbl. f. Bakt. II. 1901, 1, 33) は十餘種の尿素菌に就きてウレアーゼの作用を検し Moll (Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., II, 1902, 344) は家兔の免疫により Anti-urase を得たる事を報じ次で吉寺博士 (Zeitschr. f. physiol. Chem., 1907, 51, 201) は松茸に父柴田博士 (Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., 5, 384.) は黒カビに尿素分解力ある酵素の存在せること

を證明せられ斯くして下等植物界に於けるウレアーゼの分布は稍明瞭となれり。

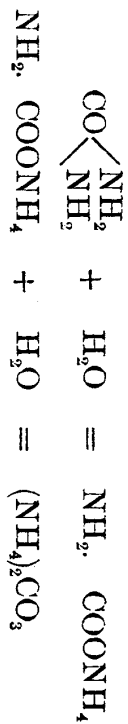
而して一九〇八年予が大豆種子を始め多くの荳科植物種子中にウレアーゼの存在せることを發表せし以來高等植物界に於ける分布に注目するもの多く A. Kiesel (Zeitschr. f. physiol. Chem., 1911, 75, 169.) は數十種の高等植物を検し G. Zemplén (Zeitschr. f. physiol. Chem., 1912, 79, 229) は Robinia pseudacacia の種子に有力なるウレアーゼの存在せることを證示し Falk. (Journ. am. chem. Soc., 1913, 35, 292) は Castor bean 中に Annett (Biochem. Journ., 1914, 8, 449) は Canavalia gladiata 中に夫々ウレアーゼの存在せることを報じ Benjamin (J. & Proc. Roy. Soc. N. S. Wales, 1915, 49, 78.) は荳科植物の根瘤竝に他の諸部分に於ける分布を調査し Mateer & Marshall (Journ. Biol. Chem. 1916, 25, 297) は Canavalia ensiformis 中のウレアーゼが甚強力なることを報じ G. Smith (Dublin. J. med. Soc., 1916, 141, 299) も亦ウレアーゼの分布其他の事項に關し詳細の報告をなせり。

是より先 P. Mon (Chem. Weekbl., 1916, 13, 255) は粉末大豆を二%尿素液に加へ二日間三〇度に放置せしむ唯酸酵を生ぜしのみにして炭酸アンモニウムの生成せられざりしことを觀察し大豆中にウレアーゼの存在するに非ずして大豆種子の表面に附着せる細菌の爲にアンモニア酸酵の起るべきを主張せしが是れ予が前報に於て再三其微生物的分解に非ることを證明したるにより明かなる事實なるも且間も無く F. Groll (Chem. Weekbl., 1916, 13, 254.) によりても亦反論せられたり即 Groll 氏は大豆を五分間一%鹽酸液に入れ注意して洗ひ表皮を脱したるものを殺菌水にて清洗し外部を脱離し其一五〇珎を無菌水を混じり一%尿素液一〇珎を加へ二五度に三〇分間放置したる後〇・一規定酸の一〇珎に相當せるアンモニアの生じたること

並に表皮一五〇疋を粉碎し之を一%尿素液一〇疋に加へ二〇度に三〇分間放置せしものは唯〇・五疋の〇・一規定酸に相當せしのみなりしことを報ぜり又 De Graaf & Van der Zande (Chem. Weekbl., 1916, 13, 258.) も同様の方法によりて Mom. 氏の異説を駁し次で W. Beijerinck (Chem. Weekbl., 1916, 13, 413.) は同氏獨得の Rainbow reaction により大豆種子中にウレアーゼの存在疑ひ無きことを確證せり又 D. H. Weister (Chem. Weekbl., 1916, 13, 663.) は大豆粉末を水及びグリセリンによりて浸出したる液に就き諸種殺菌劑の影響を検し昇汞及びフォルムアルデヒドを除きては酵素の作用を害せざることを實驗し又膠質濾器によりて處理せし濾液が不活性なるは菌體の缺存に歸すべからずして膠質酵素の吸着せられたるに由ること恰も陶土末にて處理したる濾液が作用無きが如しとせり。

次にウレアーゼの作用及び反應の速度に關しては E. Armstrong & E. Horton (Proc. Roy. Soc., B, 1912, 85, 109.) 研究の先鞭を着けたり氏等はウレアーゼ反應の速度は尿素の濃度と關係あること及び該反應はアンモニア、炭酸アンモニウム等により禁抑せられ炭酸瓦斯により増進せしめらるゝこと等を陳べ又尿素は分解に先ちて先づ水化物を作りて $(\text{OH})_2 \parallel \text{C} \parallel (\text{OH})_2$ と成り此者はアンモニアとヒドロントを失ひてシアン酸と成るか或は加水してオルソ炭酸とアンモニアとに成り得べきにウレアーゼの作用は後の分解のみを起すなりとしアンモニアはウレアーゼと尿素との結合を妨ぐる故其作用を遅め炭酸の如き酸性のものはアンモニア等を奪ひてウレアーゼと尿素との結合を容易ならしむる故促進の效を奏するなりと説けり氏等は又 (Proc. Roy. Soc., B, 1913, 86, 561.) 反應の進むに従ひ漸次分解作用の成基する

ぜられたる炭酸アンモニウムに歸し結論として此反應は被加水物の溶液中に懸存せる粒子の表面に於て起り眞正溶液状態に在る物質間の作用に非ずと唱へ次で Marshall (J. Biol. Chem., 1913, 14, 283.) は反應の速度は一定の範圍内にては酵素の濃度に比例し稀釋度と共に最大限に達し猶進で稀釋すれば漸次復た減退することを證し Van Slyke & Cullen (J. Biol. Chem., 1914, 19, 146.) は先づ尿素が酵素と中間化合物を作り此者が游離酵素、炭酸アンモニアに分解すと稱せり K. G. Falk (J. Biol. Chem., 1917, 28, 389.) は是に反して酵素分子多量なる時は反應進行の度は一層複雑と成りて酵素分子の平均時を考ふる必要を生じ従て Van Slyke 氏等の式を適用すること能はずとし又山崎榮一博士(東京化學會誌 1914, 35, 702; 1916, 37, 358; 1918, 39, 125) は尿素の加水分解は次の



二段に進行すべきものにして中間物たるカーバミン酸アンモニウムは實存し得べきものなれば先づ第一に上記の連続的加水分解を想像するが自然の順序なるべく殊に同氏は Henton (Proc. Roy. Soc., 1886, 33, 386.) 法により該中間物の實在を認識せられたりとして Van Slyke 氏の説を評せられ又進で夥多の實驗を経てウレアーゼの反應速度を研究せられたり、以上諸氏の外 R. Labberte (Pharm. Weekbl., 1915, 52, 1428) は尿素の分解は一分子反應ならざること、反應の平均値は Arrhenius 氏の溫度則に従ふこと、反應の速度は酵素の濃度に比例すること、酵素液の接觸効果は一定にして游離酵素量に比例すること、炭酸アンモニウムが反應を減退せしむること等

を結論し又 M. Bayliss Rep. Brit. Assoc., 1915, 85, 187) はウレアーゼは酒精の如き自己の溶解し難き溶劑中に在る時にも活性なるより尿素を自己の表面に吸着して作用すとなし種々の説明を與へ又ウレアーゼの加水作用は甚複雑なるものにして其第一段はシアン酸アンモニウムを作るに在りと推論せり。

次に Co-enzym の事に關しては M. Falk (Biochem. Zeitschr., 1914, 59, 298) は家兎の血清中に之を見出して *Auxo-urease* と稱し他の動物の血清中にも僅少ながら之を有すとし又此者は透析し能はざる性質のものなりと云ひ M. Jacoby & Umeda (Biochem. Zeitschr., 1915, 68, 2) は羊の血清より透析し得べき強力な *Auxo-urease* を分離し犢及び人間の血清にも之ありとし兩氏は又グリコ、アラニン、ロイシン、チロシン、アスバラギン、グルタミン酸等は光學的活性不活性を問はずウレアーゼにより分解せられざるは勿論反て其作用を促進せしむることを報じ Neumann (Biochem. Zeitschr., 1915, 69, 134) は人間の血清は大豆ウレアーゼの尿素分解力を殆ど八倍だけ増すこと等を説けり M. Jacoby (Biochem. Zeitschr., 1916, 74, 107) は又芥子油も作用を促進せしむと云へり小野寺氏 (Biochem Journ., 1915, 9, 575) は次の如き觀察により Co-enzyme を認められたり即五日間透析せしウレアーゼと透析せざりしものとに就きて作用を比較し前者は殆ど作用無かりしに反し後者は普通の分解作用を呈したるを觀猶進で透析せしウレアーゼに新鮮なるウレアーゼの稀薄液を加へしに先に失はれたりし分解力著しく回復せられたりしことを認め爾も此際の分解力は透析せしもの及び新鮮ウレアーゼの夫々が分解するよりも遙に多量のアンモニアを生じたりと云ふ而して氏は此の Co-enzyme は無機物ならずして有機物なりと推論せらるゝものなりとし又熱酸、アルカリ等の分解力を減退せしむる作用はウレアーゼ夫れ自身に對するものに非ずして此 Co-enzyme に對する動きの結果なりと稱せり。

ンモニアを生じたりと云ふ而して氏は此 Coenzyme は無機鹽ならずしてエーテルにより破壊

せらるゝものなりとし又熱酸アルカリ等の分解力を減退せしむる作用はウレアーゼ夫れ自身に對するものに非ずして此 Coenzyme に對する働きの結果なりと稱せり。

酸及アルカリ類のウレアーゼに對する影響に就ては Armstrong (Proc. Roy. Soc. B. 1913, 86, 328), Marshall (J. Biol. Chem., 1914, 17, 351); Van Slyke & Zaccarins (J. Biol. Chem., 1914, 19, 181.) 山崎博士(前掲)等の周到なる研究結果あり即氏等は水素及び水酸イオンの濃度に關して研究し Marshall 氏は鹽酸が〇・〇〇一規定液に到るまではウレアーゼの作用に甚しき影響を有せざるも〇・〇〇五規定液に到らば充分に其作用を防止しこれ以上の濃度に達すれば酵素を破壊し始め〇・〇一五規定液にては完全に破壊し去ることを示し又苛性曹達に在りては〇・〇〇二規定液にても反應の速度を小ならしめ其遲滯作用は濃度と共に増し〇・〇二規定液に到りては全く阻害すと云へり。

最後にウレアーゼの尿素合成作用に關することは生物化學上甚重大なる問題なるも未だ此の關係を積極的に證明せしものなく Schröder (Archiv f. experim. Pathol. u. Pharm., 15), A. Kiessel (Zeitschr. f. physiol. Chem., 1911, 76, 192), M. Jacoby (Biochem Zeitschr., 1916, 74, 93.) 等が是を證明し能はざりし事を報告せるを見るのみ予も亦之に關し幾多の實驗を行ひたりしが一として合成結果を證明し得るもの無かりき。

ウレアーゼ應用の方面に關しては Zempenn (Zeitschr. f. angewand. Chem., 1912, 1560), H. Kühn (Südd. Apothek. Ztg. 52, 686.) 氏等のアンモニウム鹽類製造に關する報告あり又尿素の分析に關するもの甚多きも之等は後章に其文獻を掲載せり。

第二章 酵素の分離

ウレアーゼを分離する爲に予は脱脂大豆粉末に五倍容の水を加へ室温にて約一時間充分に攪拌浸出したる後濾過し半透明なる濾液を得之を約五倍容の酒精エーテル混液(註二)の内に注入し沈澱静定の後吸引濾過し真空乾燥器(鹽化カルシウム)内に脱濕せしめたり Van Slyke氏等は沈澱生成劑として一〇倍容のアセトンを賞用せるを以て予は同一大豆種子浸出液に就き五倍容の酒精エーテル混液と一〇倍容のアセトンとにて夫々沈澱を生ぜしめ孰れの場合が適切なるかを比較せり其結果次の如し。

第一表

風乾大豆粉末 (瓦)	粗酵素乾物收量 (瓦)
二 (脱脂)	アセトン法 〇・四七六
二 (同)	酒精エーテル法 〇・四六八
一〇 (同)	〇・四九四
二 (不脱脂)	二・九五〇
二 (同)	〇・四四九
	〇・四三二

即粗酵素收量に於ては兩法何れも大差無し次に酵素の活力を比較せんが爲に各標品〇・一瓦宛を一〇珎の水に懸存せしめたるものを一八%尿素液(註三)〇珎中に加へて得たる溶液を

宛を一〇蚝の水に懸存せしめたるものを一・八%尿素液二〇蚝中...

一四度の室温に放置し各一〇分毎に指示薬として滴定し、次の数字(〇・一規定曹達液要量耗)を得たり。

本報所載の實驗に於ては特に記名せざる限り指示薬として常にメチルオレンジを用ひ又原液のアルカリ度は差引きて示せり。

第二表

經過せし時間	アセトン法	酒精エーテル法
一〇分	一九九	一九八
二〇分	一九八	一九七
三〇分	一九八	一九六

第二表の結果はアセトン法によるもの稍劣れるを示すも頗る不著明なるを以て次に新たに稍多量の粗酵素を得其二瓦宛を四〇蚝の水にて浸出したる濾液二〇蚝宛に一・八%尿素液三〇蚝宛を加へ一五—一六度の室温に置きて各時間の終毎に一〇蚝宛を取り〇・二規定硫酸液内(一〇蚝)に投じ之を〇・一規定曹達液にて滴定せり。

第三表

經過せし時間	アセトン法	酒精エーテル法
一〇分	一九九	一九八
三〇分	一九八	一九七

茲に於て兩者の差は稍明瞭になりたるも上記酵素は良好ならざる原粉より製出せられたりし事を知りたるを以て更に他の優良なる大豆種子より兩法にて分離したる粗酵素に就きて比較したり、先づ收量關係を比較せしに亦大差無かりき。

第四表

風乾大豆粉末 (瓦)	粗酵素乾物收量 (瓦)
一時間	一九七
	一九六
	一八五
	一八三
五 (脱脂)	二二九
五 (同)	二二四
五 (不脱脂)	二〇六
五 (同)	二〇四
	一八七

次に活力の比較をなす爲に粗酵素標品各一瓦宛を四〇蚝水にて浸出し濾液二〇蚝宛を得之に一・八%尿素液三〇蚝を加へ一七度の室温に放置し各時間の終り毎に其一〇蚝宛を取り之を〇・〇二規定硫酸液にて滴定して次の數値を得たり。

第五表

經過せし時間	アセトン法	酒精エーテル法
--------	-------	---------

二時間

二五

二五

二五

二五

二五

二五

二五

次に水浸液を作らず粗酵素粉末全部を尿素液の中に入れて作用せしめて比較せしにこれ亦アセトン法の非常に劣れるを示せり、即各酵素〇・一瓦宛を二〇耗水に懸存せしめ之に一・八%尿素液三〇耗を加へ一九度の室温に放置し各時間の終り毎に滴定せり、其結果(〇〇二規定硫酸要量耗)次の如し。

第六表

経過せし時間	アセトン法		酒精エーテル法	
	〇・九	一・〇	一・〇	一・〇
三〇分	〇・九	一・〇	一・〇	一・〇
一時間	一・〇	一・〇	一・〇	一・〇
二時間	一・一	一・二	二・八四	二・九六

又別の二種の標品に就き〇・一瓦宛を三五度に於て一・八%尿素液五耗に三〇分間作用せしめたる後生じたるアンモニアを〇・二規定硫酸液中に換氣吸引せしめ之を〇・一規定曹達液にて滴定したり、但標品〇・一耗より生ぜし對照管に於ける曹達液耗數〇・一宛を差引きたり。

第七表

〇・二規定硫酸(耗)達	アセトン法		酒精エーテル法	
	〇・一規定曹(耗)相當數	〇・一規定酸(耗)達	〇・一規定曹(耗)相當數	〇・一規定酸(耗)達
一〇	一・八二	一・八	一・一三	八・七

一〇	一八・四	一・六	一一・〇	九・〇
三〇	五九・一	〇・九	五一・三	八・七
三〇	五九・〇	一・〇	五一・二	八・九

以上數表に徴するに何れの場合も酒精エーテル法の優れるを示さざる無し此事實は又簡單にフェノールフタレインを用ひて定性的に示すを得即兩法に依りて得られたる粗酵素の水浸液を作り同一條件の下に比較せば酒精エーテル法によりて作りたるものゝ遙に早く赤色を呈するを觀るべし。

次にウレアーゼを得る方法の主なるものを摘録せん R. Labbertz (harm. Weekbl. 1915, 52, 1428) は脱脂粉末を一〇倍の水を以て一時間振盪し遠心機により分離したる後濾過して有力なる製品を得 Van Slyke 氏等も亦持久的酵素の製法として大豆粉を五倍容の水にて浸出し之を一〇倍容のアセトン内に注入して沈澱せしむる方法を賞用せり J. Jansen (Chem. Weekbl., 1915, 12, 483) は大豆粉末九容を五容の水にて數時間浸出したる後遠心機に懸けて水溶液を分取し之に同容のグリセリンを加へて安定なる酵素液を得たることを報じ M. Jacoby & Suga (Biochem. Zeitschr., 915, 169, 116) は先づ大豆粉末を石油エーテルにて六時間浸出し次に五倍容の水を以て零度にて一六—二四時間浸出したる液を濾過するか或は遠心機に懸けたる後室溫に於て氣流を善くして乾燥するまで濃縮して之を粉末となすべきことを報じ又 Link 氏は定量用酵素の製法として大豆粉末二五瓦を一時間二五〇瓦の水と共に振り之に〇・一規定鹽酸液二五瓦を和し五分間放置し吸引したる濾液に磷酸鹽混合液($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{aq}$, 七〇瓦と KH_2PO_4

...の毛水に溶かせる液)五瓦を加へ冷室に貯藏せば永く保存し得と云ふ此他後

二七瓦とを一〇〇㊦水に溶かせる。五㊦を加へ、室温に放置せしめ、俟て、
 章述べんとする尿素定量用藥品として各種のウレアーゼ製品作り出され米國にては紐育市
 Arlington Chemical Co. により又獨逸國にてはメルク會社により製造販賣せらるゝに到り殊に
 前者製品は Arleo-ribose なる名稱の下に弘く用ひらると云ふ。

次に酵素を分離するに當り注意すべきは其材料を選択すべきことなりとす固より發芽力の
 弱きもの或は收穫後日猶淺きものより得らるゝ。酵素は其活力甚鈍し茲に收穫後時日の異り
 たる同一大豆種子に就き活力比較試験をなしたる結果を表示せん但供試大豆種子は鹿兒島
 縣立農事試験場産にして活力弱きものなりき。

二瓦種子を粉末とし四〇㊦水と共に一時間攪拌しつゝ、室温に放置し濾液二〇㊦を得之に一・
 八%尿素液三〇㊦を加へ室温に置き其一〇㊦づゝを一定時間毎に取り〇・二規定硫酸液五㊦
 内に投じ〇・一規定曹達液にて滴定せり。次の諸表は斯くして得られたる曹達液の滴定數(㊦)
 を示せるものにしてメチルオレンジに對する原液のアルカリ度は總て差引きて示せり。

第 八 表

收穫後一ヶ月を經過せしもの 室温二〇度

種 名	室温二〇度		
	三〇分後	一時間後	二時間後
金 大 豆	九・八	九・七	九・六
青 大 豆	九・九	九・八	九・六
毛 裸	九・九	九・八	九・七

第九表

收穫後二ヶ月を經過せしもの

室温

一六一—一七度

種名	三〇分後	一時間後	一時間後
早生金大豆	九・九	九・八	九・六
生大娘	九・七	九・六	九・四
中白大豆	九・九	九・七	九・六
黄莢	九・八	九・七	九・六
白大豆	九・七	九・六	九・四
鬼裸	九・八	九・七	九・六
毛標	九・六	九・二	八・五
早生金大豆	九・六	九・三	八・七
生娘	九・三	八・二	八・〇
中白大豆	九・五	八・八	八・四
黄莢	九・四	八・六	八・三
白大豆	九・三	八・三	八・〇
金大豆	九・四	八・三	八・〇
青大豆	九・七	九・三	八・八

第十表

收穫後三ヶ月を経過せしもの 室温 一〇—一一度

種名	三〇分後	一時間後	二時間後
金大豆	九〇	八三	七二
青大豆	九三	八八	七九
毛裸	九二	八六	七八
早生金大豆	九二	八六	七七
生娘	九一	八四	七三
中白大豆	九二	八六	七七
黄莢	九〇	八二	七三
白大豆	九一	八四	七二
鬼裸	九三	八七	七八

第十一表

收穫後四ヶ月を経過せしもの 室温 八—九度

種名	三〇分後	一時間後	二時間後
金大豆	九〇	八二	七一
青大豆	九二	八八	七七
毛裸	九〇	八五	七五

ウレアーゼ及び其應用に關する研究

上記數表を綜合して最後の10号中のアンモニア量(%)を示せば次の如し

第十二表

種名	一ヶ月後	二ヶ月後	三ヶ月後	四ヶ月後
早生金大豆	九・一	八・六	七・五	
生娘	九・〇	八・三	七・四	
中白大豆	九・一	八・六	七・五	
黄莢	九・〇	八・三	七・四	
白大豆	九・〇	八・三	七・三	
鬼裸	九・一	八・六	七・六	
早生金大豆	〇・〇〇六八	〇・〇〇二二	〇・〇〇三九	〇・〇〇四二
生娘	〇・〇〇一〇	〇・〇〇三四	〇・〇〇四五	〇・〇〇四四
中白大豆	〇・〇〇六八	〇・〇〇二七	〇・〇〇三九	〇・〇〇四二
黄莢	〇・〇〇六八	〇・〇〇二八	〇・〇〇四五	〇・〇〇四二
白大豆	〇・〇〇一〇	〇・〇〇三四	〇・〇〇四七	〇・〇〇四五
鬼裸	〇・〇〇六八	〇・〇〇二五	〇・〇〇三七	〇・〇〇四二
青大豆	〇・〇〇六八	〇・〇〇二〇	〇・〇〇三五	〇・〇〇三九
毛裸	〇・〇〇五一	〇・〇〇二五	〇・〇〇三七	〇・〇〇四二
金大豆	〇・〇〇六八	〇・〇〇三四	〇・〇〇四七	〇・〇〇四九

予は更に東京府産及び広島縣産青大豆に就き收穫後異りたる時期毎に試験して其の結果を

鬼 〇〇〇〇六八 〇〇〇二五五 〇〇〇三七四 〇〇〇四〇八

予は更に東京府産及び廣島縣産大豆に就き收穫後熟したる時期毎に試料を得たり。但し供試種子は上記の種子に比し活力大なりしを以て他の條件は等しきも〇・二規定硫酸液一〇蚝を用ひ之に對して要したる〇・一規定曹達液の蚝數を以て示したり。

第十三表

東京府産			廣島縣産		
第一號	第二號	第三號	第一號	第二號	第三號
二ヶ月後	三ヶ月後	四ヶ月後	二ヶ月後	三ヶ月後	四ヶ月後
一三	一〇	八一	一三	一〇	八一
三〇分後	一四・二	一四・二	三〇分後	一四・七	一四・五
一時間後	九九	九八	一時間後	一〇・二	一〇・一
一時間後(瓦)	〇〇一三〇九	〇〇一七三七	一時間後(瓦)	〇〇一六七三	〇〇一六八三

第十四表

東京府産			廣島縣産		
第一號	第二號	第三號	第一號	第二號	第三號
二ヶ月後	三ヶ月後	四ヶ月後	二ヶ月後	三ヶ月後	四ヶ月後
一三	一〇	八一	一三	一〇	八一
三〇分後	一四・二	一四・二	三〇分後	一四・七	一四・五
一時間後	九九	九八	一時間後	一〇・二	一〇・一
一時間後(瓦)	〇〇一三〇九	〇〇一七三七	一時間後(瓦)	〇〇一六七三	〇〇一六八三

ウレアーゼ及び其應用に關する研究

號(四ヶ月後)

八一九

一三二

九五

〇〇一七八五

以上の數字は固より非常に精確なるものに非ずと雖も收穫後日淺きものは孰れも其活力鈍く二ヶ月の後に及び温度は反て低きに拘らず俄かに其活力を増し來ることを示し生理上甚興味ある事實にして又ウレアーゼ製出の目的に向つて大に注意すべきことなりとす。又上記の結果を考案するに會て Annett (Biochem. Journ., 1914, 8, 419.) の報ぜし如く種類による活力の差異を認めずと雖も産地により各大豆ウレアーゼの活力に差異ありて東京、廣島産のものは常に強力に、鹿兒島縣産のものは其力常に甚鈍きことを窺ひ得べし。

予は更に各地より得たる諸種の大豆但收穫後四―六月を經過せるものを粉末とし其二瓦を四〇蚝水にて約一時間浸出し濾液二〇蚝を採り之に一・八%尿素液三〇蚝を加へ室温に於て前記の如く操作し○二規定硫酸液一〇蚝に對する○一規定曹達液の蚝數(原液のアルカリ度を差引きたる)を以て比較したり即左の如し。

第十五表

	温度(度)	
	三〇分後	一時間後
鹿兒島金大豆	一三三	一八九
同 (同)	同	一七九
同 (青大豆)	一二二	一七七
同 (同)	同	一八〇
同 (同)	一八五	一七八
沖繩(白大豆)	一三三	一九二

同 (同)
沖繩(白大豆)

同

一八五

一七八

同 (同)

同

一八九

一七九

同 (同)

一二

一八九

一七八

熊本(大々豆)

一〇

一八〇

一七〇

同 (トッパ)

同

一八七

一八四

同 (島原早生)

同

一八六

一八四

福岡(三井郡産)

一二

一六六

一四二

同 (八女郡産)

同

一八三

一七三

宮崎(アオジ)

一七

一六六

一三七

同 (シロメ)

同

一六一

一二九

朝鮮(白大豆)

一一

一五八

一三二

同 (同)

同

一六三

一三六

愛媛(青大豆)

一八

一五五

一二八

同 (白大豆)

同

一四九

一二四

廣島(青大豆)

一〇

一三二

九五

同 (白大豆)

同

一三〇

九三

石川(無借金)

一二五

一四四

一〇九

同 (赤莢)

同

一四二

一〇二

東京(白大豆)

九

一四二

九六

ウレアーゼ及び其應用に關する研究

上記實驗の範圍内に於ては沖繩及び九州産のものに到りては誠に其名を辱しめざるも

同	同	同	同	同	滿洲	同	秋	同	山	同	福	同	新	同	同	同	同
(小黒臍)	(黒臍)	(金元)	(黒皮青中)	(白花躰子)	洲(白眉)	(兄)	田(白莢)	(伊達青)	形(兄)	(青大豆)	島(白大豆)	(白大豆)	潟(青大豆)	(同)	(同)	(同)	(同)
同	同	同	同	同	一七	同	一三	同	一四	同	一二	同	一四	同	八	同	同
一三〇	一三三	一二五	一四〇	一二〇	一一二	一五二	一五六	一八一	一四〇	一七三	一六三	一三四	一三六	一四七	一四五	一四二	一四二
七四	七七	六六	八五	六四	五七	一一一	一二五	一六八	九六	一六二	一三七	九五	九五	一〇二	一〇一	九九	九九

ものは概して其強度大差無きもの、如く滿洲産のものに到りては誠は其名を辱しめざるものと云ふべし。表中福岡縣三井郡産のものと八女郡産のものとの間に比較的著しき活力の相違あること及び山形縣産伊達青種及び福島縣産青大豆が特に活力の乏しきは一顧の値あるべきも未だ其因由を詳にするを得ず。

斯の如く産地により活力に差等あるは注意すべき事實に係り予は他日を期して其詳細を究めんと欲す。曾て Wakulenco. (Landw. Vers. Stat., 1913, 82, 361) は白大豆に就き其尿素分解作用の甚鈍きことを報ぜしが或は如上の事實を考察せずして實驗したる結果に非ざるかを疑はしむるもの無しとせず。

第三章 酵素の特殊分解作用

予は曩に大豆ウレアーゼは尿素のみに特殊的に作用しアラニン、アラントイン、アルギニン、ベンザミド、クレアチン、グリコ、ル、グワニジン、グワニン、ヒスチン、馬尿酸、ロイシン、チロシン、尿酸等の何れにも作用せざることを報ぜしが其後アスパラギン酸、アスパラギン、アデニン、ペタイン、シスチン、コリン、グルタミン酸、ウレタン、カゼイン、ペプトン等に就きても作用無きこと明にせられたり Armstrong & Horton (Proc. Roy. Soc., B, 1912, 85, 199) はメチル尿素、對稱ニメチル尿素、對稱ニエチル尿素、ピウレット等に對するウレアーゼの作用を検し是等の化合物も亦分解作用を受けざることを明にし其他 Bayliss (Rep. Brit. Assoc. 1915, 85, 687); Van Slyke (J. Am. med. Assoc., 1914, 62, 1558); R. Lubberte (Pharm. Weekbl., 1915, 52, 1128) 氏等孰れも大豆ウレアーゼの尿

素のみに特殊的に働くものなることを證明し Mateur & Marshall (J. Biol. Chem., 1916, 2, 297.) 兩氏は Jack bean ウレアーゼに就き尿酸、クレアチン、クレアチニン、アデニン、グワニン、グルコサミン、アロキサンチン、ベタイン、チロシン及びシスチン等のアミド化合物を検査し何れも作用を受けざることを證せり。予は更に濱刀豆及び刀豆ウレアーゼに就て左記の化合物を試験し何れも分解作用を受けざることを證し得たり。即ち五瓦物質を取り之に水五耗と一%粗酵素液一〇耗とを加へ三〇―三五度に於て三〇分間作用せしめたる後五瓦炭酸曹達を加へて換氣し〇〇二規定硫酸液一〇耗内に吸引せしめ滴定の結果次の數字を得たり。

第十六表

	濱刀豆酵素	〇〇一規定曹達要量(耗)	〇〇一規定酸相當量(耗)
酵素液一〇耗	一九八	〇・二	
馬尿酸	一九六	〇・一	
同對照	一九七	〇・三	
アラニン	一九五	〇・一	
同對照	一九六	〇・四	
アラントイン	一九六	〇・三	
同對照	一九九	〇・一	
グリコ、ル	一九四	〇・一	
同對照	一九五	〇・五	

ロイシン

一九四

〇・一

同對照

一九五

〇・五

アルギニン(硝酸鹽)

一九四

〇・一

同對照

一九五

〇・五

アスパラギン

一九六

〇・〇

同對照

一九四

〇・六

アスパラギン酸(曹達)

一九二

〇・一

同對照

一九三

〇・七

グルタミン

一九五

〇・〇

同對照

一九五

〇・五

グルタミン酸

一九七

〇・〇

同對照

一九五

〇・五

ベタイン(鹽酸鹽)

一九四

〇・二

同對照

一九六

〇・四

ベンザミド

一九四

〇・一

同對照

一九五

〇・五

ビウレット

一八七

〇・五

同對照

一九一

〇・九

第十七表

刀豆酵素

酵素液一〇蚝

馬尿酸

アラニン

アラントイン

グリコ、ル

ロイシン

アルギニン(硝酸鹽)

アスパラギン

アスパラギン酸

グルタミン

グルタミン酸

ベタイン

ベンザミト

ピウレット

〇・〇一規定曹達要量(蚝)

一九七

一九五

一九四

一九七

一九四

一九五

一九六

一九七

一九四

一九五

一九六

一九七

一九四

一八四

〇・〇一規定酸相當量(蚝)

〇・三

〇・二

〇・二

〇・二

〇・二

〇・二

〇・一

〇・〇

〇・一

〇・一

〇・一

〇・一

〇・二

〇・九

以上の事實は後章陳ぶべき尿素の定性竝に定量分析上甚重要なる基礎をなすものたるは論を俟たず。

第四章 温度の影響

温度の影響に關し調査したる結果によれば大豆ウレアーゼは五〇—五五度に於て最大活力を示し六〇度に於ては殆ど破壊的影響を蒙らず七〇度に至れば大部分は破壊せらるゝも全部に及ばず八〇度に於ては全く其活力を失ひ低温度に關しては零下八度に二〇分間放置せしも活力全く殺がれざりしを見たり Van Slyke 山崎博士等は炭酸アンモニウムの阻害作用を消去して一〇—五〇度の範囲内にては一〇度昂る毎に反應の速度を略倍量づゝ増すことを觀察せり。

予は濱刀豆酵素を精製し之に就きて生成せらるゝ炭酸アンモニウムの影響を検したり即豫め可檢温度に調節せる定温器内に入れたる一〇%精製酵素液五坵宛を相當温度になし置きたる一%尿素液五〇坵中に加へ一定時間の終り毎に其五坵宛を取りて〇・二規定硫酸液一〇坵中に投じ直に〇・一規定曹達液を以て滴定し其結果を〇・一規定酸相當量にて示し次の數字を得たり。

第十八表

即 時	六—七度	二八—二九度	四九—五〇度	五九—六一度	六九—七〇度
〇・二	〇・二	〇・二	〇・二	〇・二	〇・二
三〇分後	一・三	二・八	五・五	四・一	三・二

但第十八表は濱刀豆に就き第十九表は刀豆酵素に就きて行ひたる結果を示す

第十九表

二時間後	一・九	三・九	七・七	四・二	三・四
二時間半後	二・三	五・三	九・三	四・二	三・五
二時間後	二・七	六・一	一〇・四	四・〇	三・四
二時間半後	三・二	七・五	一〇・八	四・〇	三・三
三時間後	五・三	七・九	一一・〇	四・〇	三・三

即時	二九一三〇度	五〇度	五九一六〇度	七〇度	
一〇分後	〇・二	〇・二	〇・二	〇・二	
三〇分後	六・一	一二・六	一四・三	一・八	
一時間後	一二・八	一四・四	一四・四	二・八	
二時間後	一四・四	一四・四	一三・九	二・八	
三時間後	一四・六	一四・三	一三・七	二・六	

上記の數字は二回の實驗結果を平均したるものにして是によりて見れば濱刀豆及び刀豆ウレアーゼは五〇度附近に於て活力最大にして六〇度以上に於ては著しく活力を殺がることを知るべし。

Hopburn & Bazzoni (J. Franklin Inst't, 1915, 180, 603) は酵素の貯藏に際し低温度の影響を研究しウレアーゼ水溶液を一〇〇時間液體空氣の寒冷に曝せしものは九六・二九%の活力を維持し二〇度に一〇〇時間放置せしものは原活力の四四・三九%を維持し居たることを報じ又曰

二〇度に一〇〇時間放置せしものは原活力の四四・三九%を維持し居たることを報じ又ハ

H Wester (Chem. Weekbl., 1916, 13, 667) は三ヶ年間貯藏したるウレアーゼが猶其活力を甚しく失ひ居らざることを報ぜり予は九年前に製出し鹽化カルシウム乾燥器内に保存し置きたる大豆ウレアーゼに就き強力なる新製大豆ウレアーゼと活力の比較をなし次の結果を得たり。但一・八%尿素液五坵に水一〇坵宛を加へこれに各酵素標品〇・一瓦宛を投入し三〇度に保ちし分解管内に於て三〇分間作用せしめたる後五瓦炭酸曹達を加へて分解作用を防止せしめ

○二規定硫酸液二〇坵内に一時間半換氣吸引せしめて生じたるアンモニア量を滴定比較したり。斯くして九年間の長時日貯藏せしものにも意外に其活力を多く失ひ居らざることを觀たり。

第二十表

貯藏品	分解管	〇・一規定酸相當數(坵)	吸引されしアンモニア(瓦)	分解されしアンモニア(瓦)
同	對照管	六・三	〇〇一〇七一	〇〇一〇三七
同	分解管	〇・二	〇〇〇〇三四	〇〇一〇七一
同	分解管	六・五	〇〇一一〇五	〇〇一〇七一
同	對照管	〇・二	〇〇〇〇三四	〇〇一〇七一
新製品	分解管	一・三八	〇〇二三四六	〇〇二三二九
同	對照管	〇・二	〇〇〇〇一七	〇〇二三二九
同	分解管	一・四一	〇〇二三九七	〇〇二三二九
同	對照管	〇・一	〇〇〇〇一七	〇〇二三二八〇

第五章 高等植物界に於ける分布

高等植物界に於けるウレアーゼの分布に就ては予の報告に續て左記諸家により相踵で發表せられたり。

A. Kiessel	(Zeitschr. f. physiol. Chem.,	1911, 75, 169.)
G. Zemplén	(" " "	1912, 79, 229.)
Beijerinck	(Landw. Vers. Stat.,	1913, 82, 314.)
Annett	(Biochem. Journ.,	1914, 8, 449.)
Falk & Sugiura	(J. Am. Chem. Soc.,	1914, 36, 2166.)
A. Kizel	(Bull. Acad. Sci. Petrog.,	1915, 13, 1337.)
Benjamin	(J. & Proc. Roy. Soc. N. S. Wales.,)	1915, 49, 78.)
Mateer & Marshall	(J. Biol. Chem.,	1916, 25, 297.)
Fernandez & Pizarroso	(Anales. Soc. espan. fis. quim.,	1917, 15, 209.)

今左に前記諸家により研究せられたる植物名を擧げん。但*印を附したるものは其作用特に顯著なるものなりとす。

第二十一表

學名	和名	著者名
Lupinus hirsutus	* はうちはまめ屬の一種	A. Kiessel
Triticum vulgare	こむぎ	” ; Takeuchi
Amorpha fruticosa	* くろばなゑんどゆ	Zemplén ; Beijerinck
Robinia pseudoacacia	* にせわかしか	”

Caragana abrore cens

* ひれすずめ屬の一種

<i>Caragana abrotocens</i>	*	むれすずめ属の一種	"
<i>Lupinus arbus</i>	*	はうちはまめ属の一種	"
" <i>lutens</i>	"	"	"
<i>Laburno vulg. re</i>	"	さんぐさり	" ; Beijerinck
<i>Anthyllis Vulneraria</i>	"	_____	"
<i>Onobrychis sativa</i>	"	ひがまめ	"
<i>Morus alba</i>	"	く は	"
<i>Cannabis sativa</i>	"	あ さ	"
<i>Vicia Faba</i>	"	そらまめ	" ; Fernández
<i>Trifolium incarnatum</i>	"	べにはなうまやし	"
<i>Medicago lupulina</i>	"	こめつぶうまやし	"
<i>Palinurus oenleatus</i>	"	_____	"
<i>Grycyrrhiza glabra</i>	"	かんざう	"
<i>Colutea arborescens</i>	"	ぼうちうまめ	"
<i>Lotus corniculatus</i>	"	みやこぐさ	" ; Zemplén
<i>Olex europaeus</i>	"	はりえにしだ	"
<i>Pinus maritima</i>	"	_____	"
<i>Ornithopus sativus</i>	"	つひうまやし	"
<i>Medicago sativa</i>	"	むらさきうまやし	"
<i>Cytisus scoparius</i>	"	えにしだ	"
<i>Galega officinalis</i>	"	_____	"
<i>Melilotus coerules</i>	"	れいりよさこさ	"
<i>Pisum sativum</i>	"	しろえんどう	" ; Takeuchi.
<i>Taxus braccata</i>	"	いちね	"

<i>Capparius spinosa</i>	そ ば	Takeuchi
<i>Fagopyrum esculentum</i>	たうでま	Falk & S. girra
<i>Ricinus communis</i>	あ ゑ	Bejerinck
<i>Polygonum tinctorium</i>	なたまめ	Mateer & Marshall, Takeuchi
<i>Canavalia ensiformis</i>	*	Annett
" <i>gladiata</i>	" の一種	Benjamin ; Takeuchi
<i>Cucumis melo</i>	まくはうり	"
<i>Cucurbita moschata</i>	たうなす	"
<i>Abrus precatorius</i>	たうあづき	" ; Takeuchi
<i>Avena sativa</i>	まからすむぎ	" ; Takeuchi
<i>Vicia sativa</i>	やはずえんどう	" ; Takeuchi
<i>Trifolium pratense</i>	あかつめくさ	A. Kizel
<i>Angelica silvestris</i>	しうしど屬の一種	"
<i>Phaseolus calcaratus</i>	あづき屬の一種	"
" <i>angularis</i>	"	Mateer
" <i>aconitifolius</i>	"	"
" <i>nungo</i>	けつるあづき	"
" <i>aureus</i>	あづき	" ; Takeuchi
<i>Dolichos biflorus</i>	* ふぢまめ屬の一種	"
" <i>lablab</i>	ふぢまめ	"
<i>Papaver somniferum</i>	け し	Fernández & Pisarroso
<i>Prunus Amygdalus</i>	あめんだう	"
<i>Corylus sp.</i>	はしばみ屬の一種	"
<i>Arachis hypogaea</i>	なんきんまめ	"

<i>Juglans</i> sp.	くるみ属の一種	Fernández & Pi-arroso
<i>Pinus</i> "	松属の一種	"
<i>Glycine hispida</i>	* だいず	Takenuchi

以上列挙せしものは今日まで知られたる多少とも尿素分解力ある植物種子名なるが種子以外には Beijerinck 氏により *Laburnum* (多にしだ) の總ての部分にせわかしの樹皮 (*Glycine sinensis* (大豆属の一種) の幼芽等に又 Benjamin 氏により *Hippastrum* (トヤ) がたらしいせん) の胚珠及び花粉中竝に *Macrozamia spiralis* (蘇鐵科植物) の根瘤及び根毛に又 *Wistaria* (ふじの属) の葉等に見出されたり Benjamin 氏は進で各種豆科植物の根瘤に就き調査し次の根瘤中にウレアーゼの存在せることを報告せり。

<i>Trifolium agrarium,</i>	<i>Trifolium minus,</i>
<i>Pisum arvense,</i>	<i>Vicia lescaicarpus,</i>
<i>Vicia sativa</i>	<i>Glycine clandestina,</i>
<i>Acacia junikerina.</i>	<i>Acacia linearis,</i>
<i>Acacia lunata,</i>	<i>Acacia pumilla,</i>
<i>Acacia suaveolens.</i>	<i>Lotus villosa</i>
<i>Daviesia genistifolia,</i>	<i>Lathyrus latifolius.</i>
<i>Cytisus proliferus.</i>	

Benjamin 氏は猶 *Medicago sativa*, *Medicago denticulata*, *Medicago maculata*, *Trifolium repens* 等の根瘤中にはウレアーゼを證明し能はざりしことを附記せり。

予は上記種子以外に更に田菁、葛藤及び濱刀豆の種子中にウレアーゼの存在せることを證し

得たり唯田菁、葛及び藤中のものは其作用鈍くして定性的に其存在を知得せしに過ぎずと雖も濱刀豆のものは其作用甚強くして大豆種子よりのものに比し活力遜色無きことを見たり。先づ強弱兩種の大豆と濱刀豆との粉末二瓦宛を得各を四〇蚝の水にて室温一二度にて約一時間づゝ同様に浸出し濾液二〇蚝宛を得之を一八%尿素液三〇蚝に加へ前陳の如く一定の時間毎に〇二規定硫酸液一〇蚝内に其一〇蚝宛を入れ之を〇一規定曹達液にて滴定したり其の結果次の如し。

第二十二表

即 時	強 大 豆		弱 大 豆		濱 刀 豆	
	一	二	一	二	一	二
三〇分後	一九七	一三三	一九七	一九八	一九八	一九八
一時間後	九四	九二	一九五	一九四	一六二	一六三
二時間後	七三	七一	一八九	一八七	一四八	一五二
			一七七	一七四	一三二	一三六

次に酵素分離法の章下に記載せし如く濱刀豆種子浸出液を作り酒精エーテル法及びアセトン法により夫々沈澱せしめ次の結果を得たり。

第二十三表

粗 酵 素 乾 物 收 量 (瓦)	
供試粉末 (瓦)	アセトン法
一〇〇	二二五八
	酒精エーテル法
	二一三四

一〇	二〇	五〇	五〇
一・五九	三・六〇	一・一〇九	一・〇九七
一・五五	三・五四	一・〇八三	一・〇七六

收量に於ては大豆粉末に就て行ひし時と等しく兩法共に大差無きも製品の活力を検するに及び此處にも亦酒精エーテル法の優れることを知れり。即各標品〇・五瓦宛を取り三〇耗水にて浸出し其濾液二〇耗に一・八%尿素液三〇耗を加へ一二—一三度の室温に置き一定時間の終毎に其一〇耗宛を取り前述の如く〇・二規定硫酸一〇耗中に投じ之を〇・一規定曹達液にて滴定し原液のアルカリ度を減じたる耗数を以て比較せり。

第二十四表

	アセトン法		酒精エーテル法	
三〇分後	一九四	一九五	一七九	一七八
一時間後	一九二	一九三	一六六	一六四
二時間後	一八九	一九一	一五二	一四八

次に強力なる大豆より得たる粗酵素と濱刀豆より得たる酵素との各〇・五瓦宛を取り一三度に於て同様の方法にて活力を比較せし結果次の如し。

第二十五表

	三〇分後	一時間後	二時間後
大豆粗酵素	一七七	一六二	一三八
同	一七五	一五八	一三四
同	一七四	一五六	一三一
濱刀豆粗酵素	一八五	一七七	一六〇
同	一八七	一七九	一六五
同	一八一	一六七	一五四
同	一八〇	一六七	一五二

以上の實驗は大正六年十一月採集せし鹿兒島市外天保山附近に自生せる濱刀豆種子を以てせしが更に大正七年三月宮崎縣青島自生種を採集して試驗せし結果も亦酒精エーテル法に依りて製したるもの、優れることを示し爾も其分解力の著しく大なることを觀たり。

第二十六表

	アセトン法	酒精エーテル法
三〇分後	一九五	一六八
一時間後	一九〇	一五四
二時間後	一八四	一二九
	一九五	一六六
	一九二	一五二
	一八八	一二八

之によりて見れば鹿兒島産のものにてすら濱刀豆ウレアーゼは大豆ウレアーゼに比し甚しき遜色無く況や優良にして適當なる時期に採集せる種子より得らる、時は大豆ウレアーゼ

の代用として價值あるものと云ふべし。

次に予は大豆及び刀豆より同一方法に依りて粗酵素を製し其活力を比較せしに刀豆酵素收量平均脱皮原粉の約一六%の甚強力なるに驚かされたり。即一瓦粉末を三〇蚝水にて浸出し其濾液二〇蚝を一%尿素液五〇蚝に加へ其五蚝宛に就き〇一規定硫酸液にてアンモニア量を滴定したり但原液のアルカリ度は差引けり。

第二十七表

一 二 度	大豆 酵 素	刀 豆 酵 素
二〇分後	一・二	一・五
一時間後	二・二	二・四
一時間半後	三・三	三・五
二時間半後	三・九	四・六
三時間後	四・八	五・五
		六・九
		七・〇
		一・二・二
		一・二・五
		一・二・四
		一・二・五
		一・二・四
		一・二・五
		一・二・四

供試刀豆種子は京都府産のものを用ひしが他に各地産種子をも比較せし結果大豆ウレアーゼの場合の如く茲にも亦收穫期により又産地により酵素の活力に差等あることを見出した。今一・八%尿素液三〇蚝に二瓦種子粉末を四〇蚝水にて浸出したる濾液二〇蚝を加へ各時間の終り毎に其一〇蚝宛を採り之に〇二規定硫酸液二〇蚝を加へて反應を停止せしめたる後〇一規定曹達液にて滴定したる數値を記し如何に收穫期及び産地により相違あるかを示さん。

第二十八表

	收穫後(月)	溫度(度)	一〇分後	三〇分後	一時間後
鹿兒島縣產 赤刀豆	一	一二	三九三	三八八	三七四
同	一	一二	三九四	三八六	三七六
同	三	一二	三八五	三六七	三五〇
同	同	同	三八三	三六九	三五二
宮崎縣產 赤刀豆	五	一六	三五一	三二二	二八〇
同	同	同	三四六	三〇四	二四八
廣島縣產 白刀豆	一	一四	三八四	三六九	三四九
同	四	同	二四八	一一三	五一
京都府產 赤刀豆	四	一四	二四七	一一三	五二
同	同	同	二五〇	一一五	六〇
愛知縣產 白刀豆	同	同	二七八	一六九	五四
同	同	同	二七九	一七二	六一

以上の實驗により予の調査したるウレアーゼ中にては刀豆より得らるゝもの最強力なるを
 知り又其特殊分解作用を檢せしに前掲の如く尿素以外の物質に作用せざることを確め得た
 るを以て予はウレアーゼ法により尿素の分析をなすに當り刀豆より得らるゝものを應用す
 るの利あるを覺れり

第六章 尿素の分析

動物体内の窒素代謝に關する智識の近來著しく進歩せるは主として尿素の少量を定性若くは定量する方法の完成せられしに基くものと云ふべし。尿素定量の従前の方法即 Folin 法 (Zeitschr. f. physiol. Chem., 1902, 37, 161.)、Benedict 法 (Journ. Biol. Chem., 1910, 8.) 等は多くの場合比較的少量の供試品を要する嫌ありしが猶之に次の二つの缺點を伴ひ居たり。

(i) 分析進行中種々の操作を反覆する爲に尿素の損失あること。

(ii) アラントイン其他窒素化合物の少量が尿素量と共に算出せらるゝこと。

是等の缺點は殊に組織中尿素定量の場合に於て多しとす而して最満足なる方法は現今に於ては別に R. Fosse 氏の Xanthidrol method (Ann. Chim., 1914, 3803, & 1916, 13.) があるも先づ指をウレアーゼ法に屈せざるを得ず。

一八九〇年 P. Miquel (Compt. rend., 111, 501) 氏は尿素菌の培養液を濾過して之を尿素の定量に用ふべきことを報ぜしも報文簡單にして唯一個の實驗を伴ひしのみなりしより深く注意を拂はれざりき而して先年予が大豆ウレアーゼを發見し其特殊分解作用を明にし尿素の定性竝に定量に用ひ得べきことを報ずるや數年ならずして Marshall (Journ. Biol. Chem., 1913, 14, 283) は率先して其研究に當り尿、血液、組織汁液等に就き氏の所謂迅速定量法を案出し次で其滴定法を換氣吸引法に替へ稍完全なるものとなせり。然るに一方 Van Slyke & Cullen (前掲) も亦同一方面に深奥なる研究を積み最剴切なる尿素定量法を發表せり爾來左記の諸家相踵でウレ

アーゼに由る尿素定量法を論じたり。

A. Hahn & Saphra	(Deutsch. med. Wochenschr.,	1914,	40,	430.)
Plimmer & Skelton	(Biochem Journ.,	1914,	8,	70)
L. Kristeller	(Z. exp. path. Ther.,	1914,	16,	496.)
E. Eigenberger	(Zeitschr. f. physiol. Chem.,	1915,	93,	370.)
C. H. Fiske	(Journ. Biol. Chem.,	1915,	23,	455.)
R. Rose & R. Colemann.	(Biochem. Bull.,	1914,	3,	411.)
A. Hahn.	(Deutsch. med. Wochenschr.,	1915,	11,	134.)
M. Ibanéz.	(Anales. Soc. esp. fis. quim.,	1916,	14,	28.)
Folin & Denis.	(Journ. Biol. Chem.,	1916,	26,	501.)
J. B. Sumner.	(" " "	"	27,	95.)
Addis & Watanabe.	(" " "	"	"	249.)
Horrath & Kadletz	(Deutsch. med. Wochenschr.,	1916,	42,	414.)
O. I. Lee.	(S. Lukés Hosp. med. & Surg. Rep.	1917,	4.)	

今 Marshall, Van Slyke 及び Plimmer 三氏の方法を選出し其梗概を抄記せん。

(1) Marshall 氏迅速定量法 粉末大豆二五瓦を一時間時々振盪しつゝ二五〇蚝の水と混じ之に〇・一規定鹽酸液二五蚝を加へ三五度に數分間放置したる後濾過す此濾液はトルオールを加へ密栓し置かば少くとも五日間は活力を失はしめず貯藏するを得。分析を行ふには尿五蚝宛を二個の三角壘に取り一〇〇—一二五蚝に稀釋し一方には酵素液二蚝とトルオール數滴とを他方にはトルオールのみを加へ對照として室温に一夜间放置したる後〇・一規定鹽酸液にてメチルオレンヂを指示薬として滴定し兩者の數字の差より尿素量を計算す。

定鹽酸液にてメチルオレンヂを指示薬として滴定し兩者の數字の差より尿素量を計算す。

但酵素液に就きて豫めメチルオレンヂを以て指示薬とすべし。

(II) Marshall氏血中尿素定量法

(1)に於て述べたる方法は血液には直接應用するを得ず蓋し蛋白質多く尿素量少なければなり此缺點を補はんが爲にFolin氏に倣ひて滴定法に代ふるに換氣吸引法を以てせり。先づ血液を取り出し充分に凝固するまでに氷上に置き(一夜間放置するも血清中尿素量の減ずること無しと云ふ斯くして得たる血清の等量即三—一〇蚝を二個の試験管に取り一方(A)には酵素液一蚝とトルオール一蚝とを加へ對照管(B)にはトルオールのみを加へ密栓を施し五—六時間室温に放置す。次に(A)の内容物を換氣圓筒(a)に五蚝以内の水にて洗ひ込み二瓦食鹽と同容のアルコールを加へケロシンの薄層を作り同様に(B)管の内容物を(b)圓筒に入れて處理し(b)に接して〇〇二規定鹽酸二五蚝及び水約二五蚝を入れたる吸收管(b')次に(a)次に吸收管(a')の順序に配列し〇五瓦炭酸ナトリウムを(a)及び(b)圓筒に投じ稀薄硫酸内を通じたるアンモニア無き空氣を通じ一時間吸引したる後(a')及び(b')吸收管内規定酸の過剰を〇〇二規定曹達液にてアリザリン、サルフォン酸ナトリウムを指示薬として滴定し兩者の差數より計算によりて血中の尿素量を得。此際酵素液一蚝より來るアンモニア量は極微なるを以て補正を要せずと云ふ。此方法は組織中の尿素定量にも用ひらる但其場合には先づ酒精にて浸出し蒸發し其殘滓を水に溶かして式の如く定量を行ふべしと云ふ。

(III) Marshall氏前法の改良法

Ostwald氏ピペットにて尿一蚝宛を二個の試験管に取り殆ど

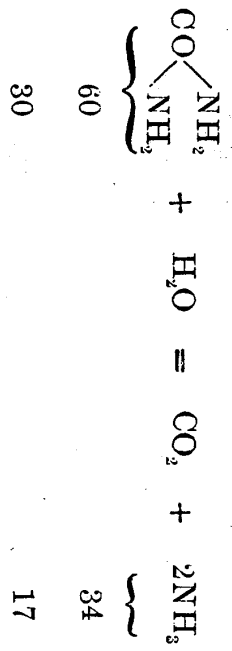
一〇蚝に稀釋し一管には前記の酵素液一蚝とトルオール一蚝とを加へ他管にはトルオールのみを入れて對照となし室溫に一夜間放置したる後ケロシンを加へ第(II)法の如く吸引す。唯〇〇二規定鹽酸液二五蚝の代りに五〇蚝を用ふると酒精を加ふることを要せざるとの差あるのみ。

(IV) Van Slyke 氏法 Marshall 氏法を改良したるものにして短時間内にも行ひ得るを特點

とす。先づアセトン法により粗酵素を製出し其一定量を溶液狀となし磷酸鹽混合液を加へて作用進行中に生ずべき水酸イオンの濃度を巧妙に調整せる供試液に作用せしめ換氣吸引法により生じたるアンモニアを規定鹽酸液に吸收せしめて後滴定するに在り。即大豆粉末を五倍容の水にて浸出したる後之を一〇倍容のアセトン中に注入して生じたる沈澱を乾燥し斯くして得たる酵素粉末二瓦に〇五瓦 K_2HPO_4 及び〇四瓦 KH_2PO_4 と一〇蚝水とを混ず。分析を行ふには先づ尿水を一〇倍に稀釋し其内原尿一蚝に相當する部分を取り一蚝酵素液と共に吸引管に入れ泡沫の發生を防ぐ爲にカプリルアルコール一滴を加へ密栓し一五分間放置し第二の吸引管にはアリザリン及び一滴のカプリルアルコールと共に〇〇二規定酸を入れ斯くして第一管は尿水のみ第二管は吸收管第三管は尿に酵素の作用せるもの第四管は第三管に對する吸收管の順序に各管を連結し稀硫酸内を通過せるアンモニア無き空氣を徐徐に吸引し一五分間の後三〇秒間更に強く吸引して尿分解管に殘留せるアンモニアの大部分を驅逐せしめ次に尿管の蓋を開きて四―五瓦の乾燥炭酸加里を加へ直に密栓して三〇分間又吸引し最後に吸收管内規定酸の過剩を〇〇二規定鹽酸液にて補完す。

血中尿素定量の爲には三蚝血液を吸引管内にて凝固する。法と混じ〇・五蚝酵素液及び二―三滴のカプリルアルコールを加へ一〇分時間作用せしめ以下の如く行ひ生じたるアンモニアを〇・〇一規定酸内に吸収せしめて滴定す。

(V) Plimmer 氏法 前記の方法と大差無し。瓦斯圓筒内には一―二%尿素液五蚝、水二五蚝ケロシン或は液狀パラフィン二蚝と粉末大壹〇・五―一瓦とを投じ四〇度の溫浴内に入れて三〇―六〇分間吸引したる後無水炭酸曹達一瓦を手早く投入し再び栓を施し三〇分間更に強く吸引してアンモニア吸管内の硫酸に吸収せしむ。吸管内には〇・一規定硫酸液二五―五〇蚝を入れアリザリレッド或はメチルオレンヂを加へて赤く着色せしむ斯くして〇・一規定硫酸の過剰を〇・一規定アルカリにて滴定し次の如く算出す。



60

34

30

17

上記の諸方法は夫々稍満足なる結果を與ふるも實施上非常に綿密なる注意を要し熟練せざれば動もすれば誤りたる結果を生ずるの虞あり且處々改善すべき點あるを見出したるを以て予は次の方法を考案せり。

(I) 刀豆粗酵素を得ること 種子粉末或は種子浸出液を用ふるよりも粗酵素を用ふる方が分析上安全なるは言を俟たざれども假に其不完全を忍ぶとしても種子粉末或は浸出液を

用ふる爲には分析に先ちて之を粉碎せざるべからざるの勞あり又豫め種子粉末の儘になし置く時は著しく酵素の活力を失ふ等の不利あるを以て常に粗酵素粉末を用ふるを良しとす前陳の如く歐米諸國にては此種の大豆若くは擬アカシア酵素販賣せらるゝも我邦にては未だ之有るを聞かず。予は刀豆酵素の最有利なるを知り之を以て尿素の分析に資せり。粗酵素を得る方法は既に前章に論じたるを以て之を略す。

(II) 粗酵素の活力を試験すること 吸引管内に〇・三%尿素液五坵と刀豆粗酵素〇・一坵とを入れ四〇―四五度に於て三〇分間作用せしめたる後炭酸曹達四瓦を加へ生じたるアンモニアを一時間吸引せしめ〇・〇二規定酸の二五坵を中和するや否やを検すべし。若し中和せずして酸性反應を呈せる時は粗酵素の力弱きか或は作用する時間少きなり但普通の製品ならば必ず此力ありとす。斯くして豫め粗酵素の分解力を檢定し置き若し活力弱き時は粗酵素量を多くするか或は作用せしむる時間を長くすべし。此檢定法に代ふるに三角嚢内に於ける滴定法を用ふるも妨げ無しとす但此場合原液のアルカリ度を閑却する事無きを要す。

(III) 定量法 〇・一―〇・三%尿素を含める様に適當に稀釋したる供試液五坵を精確に取り一は第一圓筒即分解管に他は第二圓筒即對稱管に入れ分解管には粗酵素〇・一坵と約二坵のケロシンとを加へ對稱管には粗酵素を入れず水五坵と約二坵のケロシンを加へ夫々に對應する吸収管を連結し四〇―四五度の溫浴内に入れ稀硫酸内を潛りたる空氣を通じて徐々に換氣せしむ。吸引の速度は此際毎分一―二立を度とすべし斯くすること三〇分間の後一分

間許り少しく速度を大にして吸引し管内の

間許り少しく速度を大にして吸引し管内のアンモニアを抽出せしむる事

め手早く作用管の栓を抜き(此際液の逆流せざる様注意するを要す)之に豫め精製秤量し置きたる四瓦の炭酸加里或は曹達を投じ直に栓を施し最初四―五分間は毎分一立位の速度を以て後毎分三―四立位の速度を以て一時間よく吸引したる後メチルレッド或はメチルオレンジを指示薬として〇・〇一規定曹達液にて滴定し分解及び對照兩管に就きて得たる〇・〇一規定酸に相當する滴定數の差に〇・〇〇一四を乗じて分解せられたる尿素態窒素の瓦數となし或は〇・〇一規定に相當する滴定數の差に〇・〇〇三を乗じて尿素の瓦數を得べし 分解吸収管には〇・〇二規定酸二五瓦と少量のケロシンを入れ又對照吸収管には〇・〇二規定酸一〇瓦とケロシン少量とを入れ置くべし。粗酵素〇一瓦の爲に生ずる滴定數(多くの場合〇一〇二瓦は閉却するも甚しき支障無し。

尿中尿素の定量には新鮮尿を一〇倍容に稀釋し其五瓦宛を取るべし又對照管に入れたる尿には初めより四瓦の乾燥炭酸曹達或は加里を加へ吸引すべし蓋し尿中動もすれば存在する尿素鹵の作用するを防止せんが爲にして時としては又偶々溜出すべき揮發性酸を固定せしむるの利も有りとす。

(IV) 定量装置に就ての附言 定量用に供する圓筒は大小種々のものを比較試験せしが内徑三―四糎高さ二五糎許のものも最適當にして吸収管は吸収高を延長せしむる爲稍内徑の小なる壘を用ふるを良しとす。予は吸収の爲に Munkke 氏瓦斯洗滌壘(内徑三糎高さ二五糎)を用ひ又一個の分解圓筒に對し該管を二個連結して以て第一吸収管を遁去せるアンモニアを第二吸収管内に捕集せしめたり此第二吸収管は多くの場合其必要を感じずと雖も吸引急に

過る時は往々其效を奏することあり。又泡沫の發生を防ぐ爲にはカプリルアルコール或はフェニル、エーテル七分とアルミルアルコール三分との混合液少量を用ふるを良しとするも刀豆酵素により分解せしむる時は單にケロシンの薄層を作るのみにて充分なりとす。

上記の方法により純尿素液に就き定量試験を行ひたる結果を記せん
 Riedel 會社製品純尿素を再結精製し其二瓦を Kjeldahl 氏法にて分解し一立となし其五〇瓦宛を取りて數回蒸溜滴定せし平均結果〇・一規定酸液三三瓦に相當せしを見即〇・一瓦標品中〇・〇四六二瓦窒素該尿素一瓦を水に溶して一〇〇瓦となし其一瓦宛を取り上記の方法にて定量せしに次の數字を得たり。

第二十九表

分解吸収管〇・〇一規定 曹達要量 (瓦)	對照吸収管〇・〇一 規定曹達要量 (瓦)	〇〇・一規定酸 相當數 (瓦)	尿素態窒素 (瓦)
一六・八	一九・七	三二・九	〇・〇四六〇六
一六・六	一九・七	三三・一	〇・〇四六三四
一六・七	一九・七	三五・〇	〇・〇四六二〇
一六・六	一九・七	三三・一	〇・〇四六三四
一六・六	一九・八	三三・二	〇・〇四六四八

次に同一尿素標品にて種々の濃度に就き試験せり。但標品は尿素含量九九%なりしを以て此割合にて補正して供試溶液を製したり其結果次の如し。

第三十表

尿 素(瓦)	用 量(蚝)	濃 度(%)	分解吸収管(0.01) 規定曹達要量(蚝)	對照吸收管(0.01) 規定曹達要量(蚝)	對照吸收管(0.01) 規定曹達要量(蚝)	0.01規定 相當數(蚝)	尿 素 量(實驗數,瓦)
0.002	二	0.1	42.2	19.7	19.7	7.5	0.00225
同	二	0.1	42.4	19.7	19.7	7.3	0.00219
0.01	一	1.0	15.7	19.8	19.8	3.4	0.01023
同	一	1.0	15.9	19.7	19.7	3.3	0.01014
0.015	一	1.5	0.3	19.7	19.7	4.9	0.01482
同	一	1.5	0.6	19.7	19.7	4.9	0.01473
0.015	五	0.3	0.4	19.7	19.7	4.9	0.01479
同	五	0.3	0.3	19.7	19.7	4.9	0.01482
同	五	0.3	0.3	19.7	19.7	4.9	0.01482

次に又 Thomas Mosson 會社製尿素を精製し其一瓦を硫酸にて分解したる後五〇〇蚝となし
 其二五蚝宛に就き數回蒸溜滴定せし結果〇・一規定酸液一六・二蚝に相當せしもの即尿素含量
 九六六%に相當せるものに就き其一・五瓦を五〇〇蚝水に溶し上げ該溶液に就き其五蚝宛を
 取りて定量せし結果次の如し。

第三十一表

尿 素(瓦)	分解吸収管(0.01) 規定曹達要量(蚝)	對照吸收管(0.01) 規定曹達要量(蚝)	0.01規定 酸相當數(蚝)	尿 素 量(實驗數,瓦)
0.01449	2.0	19.7	4.7	0.01431
同	1.8	19.7	4.7	0.01437

同	一・七	一九八	四八・一	〇〇一四四三
同	一・七	一九七	四八・〇	〇〇一四四〇
同	一・八	一九八	四八・〇	〇〇一四四〇

又最精確なりと稱せらるゝ Van Slyke 氏法と上記の新法とを比較せしに兩々孰れも大差無
き結果を得たり但 Van Slyke 氏法の結果は同氏の報告 (J. Biol. Chem., 1914, 19, 211.) より其數
字を引用したり。

第三十二表

尿素(瓦)	用量(耗)	濃度(%)	スライク氏法		新法	
			〇〇二規定酸 相當數(耗)	尿素(瓦)	〇〇一規定酸 相當數(耗)	尿素(瓦)
〇〇一	二	〇・五	一六・五五	〇〇〇九九三	三三・二	〇〇〇九九六
〇〇一	二	〇・五	一六・六二	〇〇〇九九七二	三三・四	〇〇一〇〇二
〇〇〇五	二	〇・二五	八・二七	〇〇〇四九六二	一六・八	〇〇〇五〇四
〇〇〇五	二	〇・二五	八・二八	〇〇〇四九六八	一七・一	〇〇〇五二三
〇〇〇二五	二	〇・一二五	四・一四	〇〇〇二四八四	八・六	〇〇〇二五八
〇〇〇二五	二	〇・一二五	四・一八	〇〇〇二五〇八	八・三	〇〇〇二四九

第三十三表

次に種々の尿水に就きて試験したる結果を表示せん。

十倍稀釋 分解吸收管 〇〇二 對照吸收管 〇〇二 〇〇一 規定酸相
 尿素(瓦) 規定濃度(耗) 規定濃度(耗) 規定濃度(耗) 規定濃度(耗)
 尿素(瓦) スライク氏法に據る尿量(瓦)

十倍稀釋
尿量(瓦)

分解吸收管〇〇一
規定曹達要量(瓦)

對照吸收管〇〇一
規定曹達要量(瓦)

〇〇一規定酸相
當數(瓦)

尿素(瓦)

スライク氏法に據
る尿素量(瓦)

第一號	第二號	第三號	第四號	第五號	第六號	第七號	第八號
五	五	五	五	五	五	五	五
三三・八	二八・四	三〇・九	二五・六	一八・五	三一・六	二八・七	一九・七
一九・〇	一九・〇	一八・九	一八・六	一八・二	一八・九	一八・八	一八・三
一六・二	一六・四	一八・〇	二三・〇	二九・七	一七・三	二〇・一	二八・六
〇〇〇四八六	〇〇〇四九二	〇〇〇五〇四	〇〇〇六〇九	〇〇〇七〇五	〇〇〇五一九	〇〇〇六〇三	〇〇〇八五八
〇〇〇四七一	〇〇〇五八二	〇〇〇五一八	〇〇〇六六二	〇〇〇八六一	〇〇〇五一六	〇〇〇五七四	〇〇〇八五六

次に又尿水に尿素を加へて試験したり。即尿素量を同時に定量せる尿を十倍に稀釋したるもの五瓦を取り之に各種濃度の尿素液一瓦宛を加へて試験し尿水のみ時の結果と比較し

次の表を得たり。但尿水のみに對する分解吸収管には〇〇二規定硫酸二五耗を入れ尿素加用分解吸収管には二五耗の代りに三〇耗を加へ置きたり。

第三十四表

加用尿素濃度(%)	同重量(瓦)	稀釋尿五耗尿素量(瓦)	分解吸收管〇一規定曹達要量(耗)	對照吸收管〇一規定曹達要量(耗)	〇〇一規定酸相當數(耗)	混液中尿素量(計算、瓦)	同(實驗、瓦)	第一號尿	第二號尿	第三號尿	第四號尿	第五號尿
—	〇〇一	〇〇〇四八九	尿のみ三二七	尿のみ一九〇	尿のみ一六三	〇〇一四八九	〇〇一四五五	—	〇三	—	〇五	〇三
			〇〇〇四	〇〇一	三〇四	〇〇〇九二二	〇〇〇九二二		〇〇〇三	〇〇一	〇〇〇五	〇〇〇三
			二八三	一九〇	二〇七	〇〇〇九二二	〇〇〇九二二		二八五	九二	二五六	一九二
			三〇九	一八九	一八〇	〇〇〇九二二	〇〇〇九二二		〇〇〇六二二	〇〇〇五四	〇〇〇六九	〇〇〇八九一
			—	一八七	—	〇〇一五四	〇〇一四八五		〇〇〇五四	〇〇〇五四	〇〇〇六九	〇〇〇八八
			—	一八六	—	〇〇一五四	〇〇一四八五		—	—	—	—
			—	一八三	—	〇〇一五四	〇〇一四八五		—	—	—	—
			—	二九七	—	〇〇一五四	〇〇一四八五		—	—	—	—
			—	—	—	〇〇一五四	〇〇一四八五		—	—	—	—
			—	—	—	〇〇一五四	〇〇一四八五		—	—	—	—
			—	—	—	〇〇一五四	〇〇一四八五		—	—	—	—
			—	—	—	〇〇一五四	〇〇一四八五		—	—	—	—

斯くして附加したる尿素は殆ど合理的に回收せらるゝことを證し得たり。

撮 要

- (一) ウレアーゼを分離するに際しては沈澱劑として一〇倍容のアセトンを賞用する人あるも酒精エーテル混液を以てするに若かず。
- (二) ウレアーゼを分離するに當り其原料を選択すること肝要なり凡て收穫後日淺きものは概して不適當にしてこれより得らるゝものは酵素活力常に弱し少くとも收穫後二ヶ月以後のものを選ぶを良しとす。
- (三) 同植物種子に就て云ふ時は其種類によりてそれより得らるゝ酵素の活力に甚しき差異を認めずと雖も同一種類にしても産地により著しき相違あり九州殊に南九州及び沖縄縣産のものは皆其力劣れり。此事實も亦酵素を應用せんとする場合考察さるべき點なりとす。
- (四) ウレアーゼが尿素にのみ特殊的に作用し類似の構造を有するアミノ化合物に作用せざる事實は大豆に就きては既に一般に承認せらるゝ處なるも亦濱刀豆及び刀豆中の強力なるウレアーゼに就ても同一の作用ある事見出されたり。
- (五) ウレアーゼの作用を充分ならしむるには五〇度内外の温度を最適當とす七〇度に到れば殆ど破壊せらる。
- (六) ウレアーゼは粉末状態に於て注意して保存する時は九年の長期間を經過するも著しく其作用を失ふこと無し。

(七) 高等植物界に於けるウレアーゼの分布に就ては多くの學者により開發されしが予は更に葛田菁、藤及び濱刀豆種子中に之を見出し殊に濱刀豆は大豆代用として遜色無きを證し得たり。

(八) 尿素の分析にウレアーゼを用ふるに際しては刀豆より得らるるものをを用ふるを最適當とす。蓋し從來知られたるもの、内最強力なるに加ふるに換氣圓筒内に於て泡沫の發生すること甚少きの利あればなり。

(九) ウレアーゼによる尿素定量分析方法は Van Slyke 氏法を最完全なるものとす。爾も此方法は磷酸鹽混合液を要し往々誤謬を生ずるの缺點無しとせず予は此方法を改良して磷酸鹽を用ふること無く單に刀豆ウレアーゼを用ふるのみにて精確なる結果を擧ぐるを得たり。