

ラットトリプシノーゲン キモトリプシノーゲンの活性化法

川崎医療短期大学 栄養科
川崎医科大学附属病院栄養給食部*

小野章史 *小野尚美 松枝秀二 守田哲朗

(昭和62年8月21日受理)

A Modified Fashion, Spectrophotometric Determination of Trypsin and Chymotrypsin Activated from Proenzymes

Akifumi ONO, Hisami ONO*, Shyuji MATSUEDA and Tetsuro MORITA

*Department of Nutrition, Kawasaki College of Allied Health Professions,
Department of Nutrition, Kawasaki Medical School Hospital
Kurashiki, 701-01, Japan*

(Received on Aug. 21, 1987)

Key words : トリプシノーゲン, キモトリプシノーゲン、活性化法

概 要

微量に採取されるrat bile-pancreatic juice(BPJ)に含まれるtrypsinogen, chymotrypsinogenの活性化について試みた。その結果trypsinogenの活性化の条件としてBPJ400 μ l(160 μ g protein)に500 μ lの100mM Tris-HCl buffer, pH8.1,100mM CaCl₂を加え100 μ lのbovine serum albumin (BSA, 1mg/ml)と1.0mlのenterokinase(500 μ g/ml)を加えた後0℃, 2時間以上のincubateで十分でありこの状態で24時間は安定であった。chymotrypsinの場合は, 400 μ lのBPJに1.0mlの80mM Tris-HCl buffer, pH7.8, 100mM CaCl₂を加え200 μ lのBSAと400 μ lのbovine trypsin (100 μ g/ml)を加えた後, 0℃で2時間以上のincubateで十分であり, 安定性もまたtrypsinと同様24時間維持していた。

はじめに

膵外分泌と消化管腔内刺激とは直接的 (nerve) あるいは, 間接的 (digestive hormone) な関係がある。しかし, その調節機構解明の歴史は浅く今盛んに研究されている¹⁾。

消化管の胃及び小腸に fat, protein, amino acidやcarbohydrateが入ると壁細胞を刺激しgastrin, CCK, secretin, GIP, VIPなどのdigestive hormone (gut-brain peptides)が血中へ分泌して標的器官や組織を刺激する。この時膵からは, lipase, trypsinogen, chymotrypsinogen, amylaseなどの消化酵素が分泌されて十二指腸腔に

でてくる。しかし, その分泌応答は, parallelともnonparallelともいわれている²⁾。

現在までに行なわれている膵外分泌応答試験の手段は1)酵素活性法2)免疫活性法³⁾3)isotope法²⁾4)蛋白, bicarbonate⁴⁾の量を測定するものなどであり, このうちよく用いられるのが酵素活性法である。特にamylase⁵⁾⁶⁾⁷⁾, lipase値あるいは蛋白やbicarbonate量などと組み合わせて測定している報告が多い。それはamylaseやlipaseが測定に先だって活性化を要しないからであろう。しかし, よりいっそう分泌状態を把握するには多くの酵素について測定する必要がある。そのため何人かの研究者により, trypsinogenやchymotrypsinogenの活性化法のkineticsが報じられている。(Table 1)

事実Table 1,2のいくつかの方法に従った
 が十分な結果が得られなかった。

そこでratのBPJに含まれている
 trypsinogen, chymotrypsinogenの活性化
 について検討した。

Table 1 Some references described about Kinetics in formation
 of trypsin and chymotrypsin from their inactive precursors

Animal source	Zymogen		Reference
	Trypsinogen	Chymotrypsinogen	
Bovine (crystalline)	○	/	KUNITZ 1938 (8)
Bovine (crystalline)	○	○	KUNITZ 1939 (9)
Bovine (crystalline)	○	/	NORDSTROM 1971(10)
Bovine (crystalline)	○	/	BARATTI et al. 1973(11)
Guinea pig (lobules)	○	○	SCHEELE et al. 1975(12)
Rabbit (pancreatic juice)	○	○	GLAZER et al. 1977(13)

○: described; /: not described

材料及び方法

試料：動物は体重200~220gのSprague
 Dawley ratを1晩絶食し、10時よりNem-
 butal(40mg/kg, BW)麻酔下にて開腹後総
 胆管の十二指腸側開口部よりpolyethylene
 tube(OD 0.97mm, ID 0.58mm,
 Intramedic PE50)を挿入し、氷冷下のstock
 tubeにBPJを採取した。

採液後サンプルはただちに凍結保存し、
 続く活性化試験の試料とした。

活性化：まずはTable 1,2のいくつかに従い
 活性化を試みた。そして摸索の中から我々
 の修正活性化法を見出した。trypsinogenは
 BPJ中の蛋白量が400 μ g/mlになるよう蒸留
 水にて希釈し希釈液400 μ lに500 μ lの100mM
 Tris HCl buffer, pH8.1, 100mM CaCl₂を
 加え、更に1mg/mlのBSAを100 μ l加えた。最
 後に1mlのenterokinaseを添加し0℃ある
 いは30℃で活性化した。このときentero-
 kinaseは25, 50, 500 μ g/mlのいずれかを用
 いた。chymotrypsinogenの場合は400 μ lのB
 PJに1mlの80mM Tris-HCl buffer, pH7.8,
 100mM CaCl₂を加え200 μ lのBSAを加えた。
 最後に400 μ lのbovine trypsinで活性化した。
 trypsinの濃度は1, 10, 100 μ g/mlについて行
 なった。

測定：サンプル液の希釈はBPJに含まれる
 蛋白量をBSAをstandardとするLowryらの
 方法²⁹⁾に従い蛋白含量が400 μ g/mlになるよ
 うに調整した。trypsin, chymotrypsinの酵
 素活性はRickの方法³⁰⁾に従った。trypsin活
 性としてtrypsinの特異的な合成基質である
 N α -p-toluenesulfonyl-L-arginine methyl
 esterを用い247nmで、また同様に
 chymotrypsin活性にはN-benzoyl-L-
 tyrosine ethyl esterを用いて256nmで測定

Table 2 Some reports used various or resemble techniques of activation

Animal source	Zymogen	Acti- vator	pH	Temp.	Time	Ion	Reference
Rat P.T.H.	Try.,Chy.	B.T.	8.1	4	24hr	Ca	SNOOK 1965 (14)
Rat P.T.H.	Try.,Chy.	B.T.	7.0	0	24hr	/	ROBBERECHT et al.1971 (15)
Rat B.P.J.	Chy.	B.T.	8.1	0	15min	Ca	GREEN et al. 1972 (16)
Dog P.J.	Try.	Ent.	7	37	30min	/	ROHEU et al. 1972 (17)
Rabbit P.J.	Try.,Chy.	Ent.	7.4	37	30min	/	ROTHMAN et al. 1974 (18)
Bovine (crystal)	Try.	Ent.	5.6	R	15min	Ca	KWONG et al. 1978 (19)
Rat P.T.H.	Try.	Ent.	8.0	37	5hr	Ca,K	SOLOMON et al. 1978 (20)
Rat P.J.	Try.	Ent.	8.0	25	2hr	Ca	INSE 1979 (21)
Rat P.J.	Try.,Chy.	Ent.	7.8	0	24hr	Ca,K	GREEN et al. 1980 (22)
Rat P.T.H.	Try.,Chy.	Ent.	4.0	37	30min	/	STOCKMANN et al. 1981 (23)
Rat P.T.H.	Try.	Ent.	/	25	45min	/	LEE et al. 1982 (24)
Feline P.J.	Chy.	Ent.	/	25	1hr	Ca	LAYER et al. 1982 (25)
Rat P.T.H.	Try.	Ent.	/	0	1hr	/	BRAND et al. 1982 (26)
Rat P.J.	Chy.	B.T.	7.8	37	3hr	Ca	BRUZZONE et al. 1984 (27)
Rat acini	Try.	Ent.	5.6	R	15min	Ca	HAJUNDAR et al. 1985 (28)

Abbreviations:
 1) P.T.H.,pancreatic tissue (or gland) homogenate; 2) Try.,trypsinogen; 3) Chy.,
 chymotrypsinogen; 4) B.T.,bovine trypsin;5) B.P.J.,bile-pancreatic juice;6) P.J.,
 pancreatic juice; 7) Ent.,enterokinase; 8) R.,room temperature

そして、それらを利用して今日まで多くの
 研究者により異種動物zymogenの活性化法
 が試みられている。(Table 2)しかし、Table
 2に示しているように、animal, activator,
 pH, temperature, ionなどの条件により活
 性化が一定していないのも事実である。特
 に、rat, mouse, guinea pigなどの小動物
 では試料が少なく活性化に十分な注意が払
 わなければならない。

した。活性値は測定条件下において分当たりのoptical densityの変化量を1 unitとして示した。

試薬：酵素活性の合成基質は半井化学薬品, BSAは和光純薬工業, bovine trypsinはSigma Chemical Company, enterokinaseはMiles Laboratories, その他の試薬は全て生化学用あるいは特級試薬を用いた。

結 果

trypsinogenをtrypsinに活性化するのに必要な温度及びenterokinaseの濃度依存性

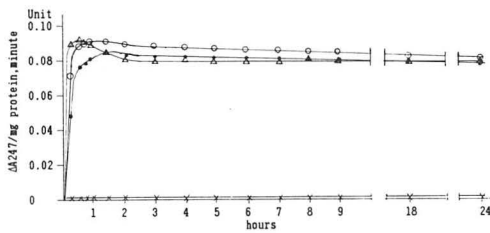


Fig. 1. Time courses on activation of trypsinogen by varying concentrations of purified enterokinase at 30°C. Bile-pancreatic juice was diluted to 400 μ g of protein/ml with cold distilled water. 400 μ l of diluted juice was added to 500 μ l of a mixture containing 100mM CaCl₂, 100mM Tris-HCl, pH8.1, and mixed with 100 μ l of 1mg/ml BSA, and activated by addition of 1.0ml of purified enterokinase varying from 25 to 500 μ g/ml. After incubation at 30°C for varying periods, samples were assayed for trypsin activity. Trypsin activities are defined as the initial rate of hydrolysis of substrate and in this communication will be expressed as the changes in absorbance per minute. Added enterokinase concentration(μ g/ml) : •, 25; ○, 50; ▲, 500 and ×, none.

について経時的に調べた結果をFig.1,2に示す。活性化は30°Cあるいは0°Cの温度に於いてもenterokinaseの濃度に依存するが30°Cの場合各濃度とも1時間以内にmaximumに達する。しかし, enterokinaseの添加濃度が高いほど活性化されたtrypsinが経時的に不安定であった。(Fig.1) 一方, trypsinogenを0°Cで活性化した場合, 活性化に時間を要するもののmaximumに達した後30°Cで活性化した場合に比べ非常に安

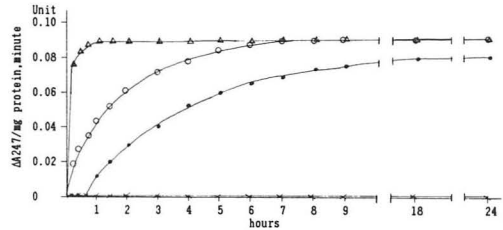


Fig. 2. Time courses on activation of trypsinogen by varying concentrations of purified enterokinase at 0°C. Bile-pancreatic juice was diluted to 400 μ g of protein/ml with cold distilled water. 400 μ l of diluted juice was added to 500 μ l of a mixture containing 100mM CaCl₂, 100mM Tris-HCl, pH8.1, and mixed with 100 μ l of 1mg/ml BSA, and activated by addition of 1.0ml of purified enterokinase varying from 25 to 500 μ g/ml. After incubation at 0°C for varying periods, samples were assayed for trypsin activity. Trypsin activities are defined as the initial rate of hydrolysis of substrate and in this communication will be expressed as the changes in absorbance per minute. Added enterokinase concentration(μ g/ml) : •, 25; ○, 50; ▲, 500 and ×, none.

定であった。また, enterokinaseの濃度が500 μ g/mlに於いて約2時間でmaximumに達することが分かる。しかも, 24時間後に於いてもなおmaximumを維持していた。また, enterokinaseを含まないBPJ mixtureはどちらの温度に於いても活性化されることはなかった。

chymotrypsinogenの活性化については0°Cの場合についてのみ示した。活性化systemに於いて添加したbovine trypsinの濃度が10 μ g/mlの場合1 μ g/mlに比べdramaticに活性化された。また, trypsinが100 μ g/mlに至ってもmaximum値を維持していた。chymotrypsinogenの場合もtrypsinogenの場合と同様にactivatorがなければ活性化されることはなかった。(Fig. 3)

考 察

我々は先にrat intestinal contentsについて今回と同様酵素に特異的な合成基質を用いてtryptic及びchymotryptic activityを

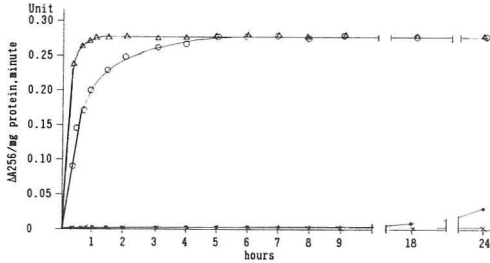


Fig.3. Time courses on activation of chymotrypsinogen by varying concentrations of purified bovine trypsin at 0°C. Bile-pancreatic juice was diluted to 400 μg of protein/ml with cold distilled water. 400 μl of diluted juice was added to 1.0 ml of a mixture containing 100 mM CaCl₂, 80 mM Tris-HCl, pH 7.8, and mixed with 200 μl of 1 mg/ml BSA, and activated by addition of 400 μl of purified bovine trypsin varying from 1 to 100 μg/ml. After incubation at 0°C for varying periods, samples were assayed for chymotrypsin activity. Chymotrypsin activities are defined as the initial rate of hydrolysis of substrate and in this communication will be expressed as the changes in absorbance per minute. Added bovine trypsin concentration (μg/ml) : •, □, ○, △, 100 and ×, none.

求めた³¹⁾。intestinal contents の場合 trypsinogen 及び chymotrypsinogen はすでに活性化を受けているが総胆管から得た BPJ の場合には全く受けていない。(Fig. 1~3 の activator を含まない場合と同様) しかし、*in vivo* において、ひとたび小腸管腔に放出された BPJ 中の protease は dramatic に活性化され基質を消化する。この *in vivo* の結果を *in vitro* で再現するため、多くの研究者が kinetics を求め、そして測定に修正が加えられた。(Table 1,2) しかし、Table 1, 2 に示したように現代に於いてもなお同一 animal ですら活性化法が一定していないのも事実である。

Kunitz⁸⁾⁹⁾ は、すでに活性化されている trypsin あるいは moldkinase, 更には今回のように enterokinase を活性化 system 中に加えると intact trypsinogen が trypsin に活性化されることを報告している。またこの時、活性化が十分におこらない場合についても述べ、不完全な活性化では活性を示さない inert protein を生じることも報告している。

また、Carne³²⁾ らは犬の膵外分泌蛋白質中に 3 タイプの pretrypsinogen を発見しており、ヒトでも 2 種類存在することを確認している³³⁾。

これら inert protein や異種タイプ pro-enzyme が trypsinogen の活性化に際し、直接的な妨げになっているかは分からないが、活性化を十分に成し得ない理由のひとつかもしれない。しかし、多くの報告をもとに修正見出した本活性化法は極微量の BPJ であっても juice 中の zymogen 測定を容易にした。(データは示していないが希釈 BPJ 中に 50 μg の protein があれば測定できる。)

今回我々が注意した点は次の点である。

in vitro では失活を極力防ぐため protease (trypsin, chymotrypsin) による自己消化を抑制することであった (0°C で活性化)。また活性化の pH については table 2 に示しているように酸性~アルカリ性域と異なっているが我々は Rick³⁰⁾ の酵素活性測定時と同じにした。これは enterokinase の stability¹⁰⁾¹⁹⁾ よりもむしろ一度活性化された trypsin が残っている trypsinogen を活性化する場合の至適 pH がアルカリ性域であることと、更に *in vivo* の rat intestinal contents がアルカリ性域である³¹⁾ ことを考慮したためである。この他では、反応 tube 壁に zymogen が吸着するのを防ぐ目的で BSA を添加¹³⁾ した点である。

文 献

- 1) 亀田治男, 山中学, 桃井宏直, 松橋直. 消化とホルモン-病態と検査一, 富士レビオ, 1984.
- 2) MILLER, P. E., AND ADELSON, J. W. Proteins are secreted from heterogeneous prestored sources in the exocrine pancreas. Am. J. Physiol., 252 : G768-G775, 1987.
- 3) ENSLEV, L., ANDERSEN, B. N., FAHRENKRUG, J., MAGID, E., AND THORSGAARD-PEDERSEN, N. Serum immunoreactive trypsin, pancreatic polypeptide, and pancreatic isoamylase as diagnostic tests for chronic pancreatitis. Scand. J. Gastroenterol., 19 ; 204-208, 1984.

- 4) CHARIOT, J., DE LA TOUR, J., ANGLADE, P., AND ROZE, C. Cholinergic mechanisms in the pancreas after extrinsic denervation in the rat. *Am. J. Physiol.*, 252 : G755-G761, 1987.
- 5) SALUJA, A., SAITO, I., SALUJA, M., HOULIHAN, M. J., POWERS, R. E., MELDOLESI, J., AND STEER, M. In vivo rat pancreatic acinar cell function during supramaximal stimulation with caerulein. *Am. J. Physiol.*, 249 : G702-G710, 1985.
- 6) HONDA, T., ADACHI, H., NOGUCHI, M., SATO, S., ONISHI, S., AOKI, E., AND TORIZUKA, K. Carbachol regulates cholecystokinin receptor on pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol.*, 252 : G77-G83, 1987.
- 7) SINGH, M., AND BANDISODE, M. S. Effect of neurotensin on amylase secretion from rat pancreas in vivo and in vitro. *Dig. Dis. Sci.*, 32 : 65-70, 1987.
- 8) KUNITZ, M. Formation of trypsin from crystalline trypsinogen by means of enterokinase. *J. Ger. Physiol.*, 22 : 429-446, 1939.
- 9) KUNITZ, M. Kinetics of the formation of chymotrypsin from crystalline chymotrypsinogen and of trypsinogen from crystalline trypsinogen. *Enzymologia*, 7 : 1-20, 1939.
- 10) NORDSTOM, C., AND DAHLQVIST, A. Rat enterokinase : The effect of ions and the localization in the intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, 242 : 209-225, 1971.
- 11) BARATTI, J., MAROUX, S., AND LOUVARD, D. Effect of ionic strength and calcium ions on the activation of trypsinogen by enterokinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 321 : 632-638, 1973.
- 12) SCHEELE, G. A., AND PALADE, G. E. Studies on the guinea pig pancreas : Parallel discharge of exocrine enzyme activities. *J. Biol. Chem.*, 250 : 2660-2670, 1975.
- 13) GLAZER, G., AND STEER, M. Requirements for activation of trypsinogen and chymotrypsinogen in rabbit pancreatic juice. *Anal. Biochem.*, 77 : 130-140, 1977.
- 14) SNOOK, J. T. Dietary regulation of pancreatic enzyme synthesis, secretion and inactivation in the rat. *J. Nutrition*, 87 : 297-305, 1965.
- 15) ROBBERECHT, P., DESCHODT-LANCKMAN, M., CAMUS, J., BRUYLANDS, J., AND CHRISTOPHE, J. Rat pancreatic hydrolases from birth to weaning and dietary adaptation after weaning. *Am. J. Physiol.*, 221 : 376-381, 1971.
- 16) GREEN, G. M., AND LYMAN, R. L. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 140 : 6-12, 1972.
- 17) ROMEO, F., PAIRENT, F. W., APPERT, H. E., AND HOWARD, J. M. Urinary excretion and metabolism of trypsin and trypsinogen : Experimental study. *Ann. Surg.*, 176 : 149-153, 1972.
- 18) ROTHMAN, S. S. Molecular regulation of digestion : short term and bond specific. *Am. J. Physiol.*, 226 : 77-83, 1974.
- 19) KWONG, W. K. L., SEETHARAM, B., AND ALPERS, D. H. Effect of exocrine pancreatic insufficiency on small intestine in the mouse. *Gastroenterology*, 74 : 1277-1282, 1978.
- 20) SOLOMON, T. E., PETERSEN, H., ELASHOFF, J., AND GROSSMAN, M. I. Interaction of caerulein and secretion on pancreatic size and composition in rat. *Am. J. Physiol.*, 235 : E714-E719, 1978.
- 21) IHSE, I., LILJA, P., AND LUNDQUIST, I. Trypsin as a regulator of pancreatic secretion in the rat. *Scand. J. Gastroent.*, 114 : 873-880, 1979.
- 22) GREEN, G. M., AND NASSET, E. S. Importance of bile in regulation of intraluminal proteolytic enzyme activities in the rat. *Gastroenterology*, 79 : 695-702, 1980.
- 23) STOCKMANN, F., AND SOLING, H. D. Regulation of biosynthesis of trypsinogen and chymotrypsinogen by nutritional and hormonal factors in the rat. *Eur. J. Clin. Invest.*, 11 : 121-132, 1981.
- 24) LEE, P. C., BROOKS, S., AND LEBENTHAL, E. Effect of fasting and refeeding on pancreatic enzymes and secretagogue responsiveness in rats. *Am. J. Physiol.*, 242 : G215-G221, 1982.
- 25) LAYER, P., HOTZ, J., SCHMITZ-MOORMANN, H. P., AND GOEBELL, H. Effects of experimental chronic hypercalcemia on feline exocrine pancreatic secretion. *Gastroenterology*, 82 : 309-316, 1982.
- 26) BRAND, S. J., AND MORGAN, R. G. H.

- Stimulation of rat pancreatic secretion and growth in the rat after feeding cholestyramine, *Gastroenterology*, 83 : 851-859, 1982.
- 27) BRUZZONE, R., TRIMBLE, E. R., GJINOVCI, A. AND RENOLD, A. E. Glucose-insulin interactions on exocrine secretion from the perfused rat pancreas, *Gastroenterology*, 87 : 1305-1312, 1984.
- 28) MAJUMDAR, A. P. N., DAVIS, G. A., DUBICK, M. A., AND GEOKAS, M. C. Nicotine stimulation of protein secretion from isolated rat pancreatic acini. *Am. J. physiol.*, 248 : G158-163, 1985.
- 29) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. AND RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275. 1951.
- 30) RICK, W. Chymotrypsin, trypsin, pepsin, in *Methods of Enzymatic Analysis I*, ed by Bergmeyer, H. U., Academic Press, New York : 138-146. 1974.
- 31) AKIFUMI, O., HISANORI, M., MAKI, K., AND HIROSHI, H. Changes in the intraluminal protein digestion of pancreatic duct-ligated rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 31 : 53-68. 1985.
- 32) CARNE, T., AND SCHLEELE, G. Amino acid sequences of transport peptides associated with canine exocrine pancreatic proteins. *J. Biol. Chem.*, 257 : 4133-4140. 1982.
- 33) BORULF, S., LINDBERG, T., BENEDIKTSSON, D., AND MANSSON, M. Immunochemical determination of to trypsins in human duodenal juice. *Clinica. Chimica. Acta*, 94 : 51-62. 1979.