HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	結晶鯨Pepsin：第5報 変性とActivityとの関係
Author(s)	石原, 義雄
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 8(3), 233-237
Issue Date	1957-11
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23008
Type	bulletin (article)
File Information	8(3)_P233-237.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

結晶鯨 Pepsin

第5報 変性と Activity との関係

石原義雄
(北海道大学水産学部水産化学教室)

Studies on Crystalline Whale Pepsin

V. Relation between denaturation and activity

Yoshio ISHIHARA

Abstract

1. Effect of urea or guanidine on the activity of whale pepsin.

As demonstrated in Tab. 1, a marked loss of enzymic activity is noticed if whale pepsin is exposed to urea or guanidine. After being stored in 5.0 M urea at 40°C. for 10 hours, the proteolytic activity was reduced to 40% of its initial value; whereas when stored in 8.0 M urea for 5 hours or 3.0 M guanidine for 20 hours complete inactivation resulted.

It may be concluded that, unlike ribonuclease, whale pepsin does not retain activity after treatment with urea or guanidine. Moreover, the rate of inactivation of whale pepsin by the denaturants is much higher than that of swine pepsin.

2. Digestion of denatured proteins with whale pepsin.

As shown in Figs. 1 ~ 3, the ability of whale pepsin to digest urea-denatured hemoglobin or heat-coagulated fish meat is much inferior to that of swine pepsin; however, the ability to digest raw fish meat of the former is much superior to that of the latter. The proteolytic activity of whale pepsin on denatured proteins was reduced to 30–50% of its value for raw materials.

緒言

前報[1]では鯨 pepsin の pH と安定度との関係に就て観察し豚 pepsin とは pH の安定域をかなり異にする事を示したが，ここに変性処理に対する挙動を基質の側と酵素の側とより両 pepsinの性質を比較し，尿素・グアニヂン変性に対する安定度が若干異なる事，又専ら生食を行つている鯨の食餌性から見て基質蛋白の熱変性・尿素変性による消化能への影響は興味を惹く所であるが，両 pepsinを同一条件下に観察し鯨 pepsinの未変性蛋白に対する消化能の大なるを認めた。

原則的に protease は 'denatured' form を良く消化する事は周知の所，鯨 pepsinが魚類pepsin 同様に 'native' form を良く分解する事は，水解初期に於てこれら熱変性・尿素変性とは性質を異にする様な denaturase 作用が特に大きいのであろうか？

試料及方法

鯨 Pepsin

前報[1]の鰮鯨 (*Balaenoptera borealis* LESS.) の結晶 pepsin 3回再結。

豚 Pepsin

Worthington Chemical Sales Co., New Jersey, U.S.A. 製のもの3回再結。

Activity 測定

前報同様 Anson 法[2]に準じ消化液の TCA 溶存部の Folin 値を比色定量。

Pepsin の尿素・グアニヂン処理

3.0～8.0M 尿素乃至はグアニヂン含有の pH4.4 の acetate buffer に pepsin を溶解（最終濃度0.3%）40°C に放置後一定時間毎に activity 測定（基質は hemoglobin)。

消化試験

牛 hemoglobin 調製及その尿素変性処理・activity 測定は共に Anson法[2] に準ず。

魚肉消化は鰯・イカの筋肉部を肉挽器で磨細せるもの2gにつき水 20ml. を加え HCl で pH 調節後 pepsin は 0.1% 'stock solution' 1.0ml. 添加35°C 60分間消化後 Anson の hemoglobin 法同様に処理しTCA溶存部に就て光電比色計で比色定量。熱変性は100°C 10分間加熱により行つた。pH測定は前回同様硝子電極pH-meter によつた。

実験結果並に考察

I. 鯨 pepsin の尿素 並にグアニヂン変性

豚 pepsin に対する尿素変性の影響に就ては Steinhardt[3] (1938) が3°Cの低温下では1.0～6.0M の濃度に於て15日間にわたり activity が保持される事を認めているが，一方 Perlman[4] (1956) によると，8.0M 濃度で37°C 24時間で全く activity 喪失，25°C では40% を残存するのみなる事を示し，比較的高温下ではかなり不安定である事を述べている。

ここに豚，鯨両 pepsin の尿素及グアニヂン変性による activity への影響を同一条件下で観察した結果，第1表に示す如く明かに activity の低下を来し，この点 ribonuclease[5] とは明瞭に態度を異にする。両 pepsin 共に尿素よりもグアニヂンによる影響の方が大であるが，何れも鯨 pepsin の方が変性の程度大きく，尿素は 3.0M 60時間では約30%減，5.0M 60時間では全く喪失，8.0M では5時間で殆んど喪失するに至る。グアニヂンでは3.0M 20時間で既に喪失してしまうが豚 pepsin は60時間でも約20%残存す。

Table 1. Dependence of pepsin activity on time of exposure to urea or guanidine at 40°C

Conc. of denaturants used			Relative specific proteolytic activity							
			hr. 0	3	5	10	15	20	30	60
Urea	3.0M	Swine pepsin	100%	98	95	91	88	87	84	80
		Whale pepsin	〃	95	90	88	83	80	75	68
	5.0M	Swine pepsin	〃	86	74	64	60	43	32	18
		Whale pepsin	〃	69	58	48	37	25	15	0
	8.0M	Swine pepsin	〃	50	13	0				
		Whale pepsin	〃	30	2	0				
Guanidine -HCl	3.0M	Swine pepsin	〃	92	88	83	80	64	60	20
		Whale pepsin	〃	80	64	46	25	0		

これに関して Haurowitz *et al.*[6] (1944), Steinhardt[3] (1938), Burk *et al.*[7] (1930) 等は hemoglobin の尿素変性・アルカリ変性が由来する動物の種により異にする事を述べているが鯨 pepsin は豚 pepsin よりもこれら変性剤の作用を受け易い二次構造を有する様に思われる。

II. 基質蛋白質の変性と鯨 pepsin 消化能との関係

一般に pepsin,[8,9] trypsin,[11)12)] papain[13)]（これは特に著しい差を示す）等の protease は何れも天然蛋白よりも変性蛋白質の方が分解度大とされ，これは酵素の inhibitor の熱による破壊の場合を除いて，変性作用により基質蛋白分子の 'unfolding or uncoiling' が行われ基質・酵素両分子の接触可能性増大がその理由と考えられ，従つて 'native' form が分解される場合も一旦変性されてから分解するものとされる。これに就て Christensen[9)]（1952）は ovalbumin が pepsin によりよく分解されるが trypsin では分解されないのに対し，β-lactoglobin は逆に trypsin で良く分解されるが pepsin にはあまり分解されない事（変性後は良く分解されるに至る）を示し，ovalbumin は低い pH で β-lactoglobin は高い pH でそれぞれ変性されやすい事よりこれを説明している。

然しながらこの関係は酵素の種類により，又同一酵素に対しても蛋白質の種類によりその程度を異にし，例えば Hanrowitz[11)]（1945）は trypsin について ovalbumin・serumglobulin は差大，fibrinogen・myosin 等は差小なる事を認め，豚 pepsin については Christensen[10)]（1955）が egg albumin の熱変性の場合は両者殆んど同一なるも，これの尿素変性の場合反応初期に於ては約 50% も変性蛋白の方が消化能大なる事を示し，変性の方法による差も認められこの問題の複雑性が想像される。

ここに鯨・豚両 pepsin について同一基質を同一条件下で消化試験を行い基質蛋白の変性と pepsin 消化度との関係を観察した。

a. 尿素変性 hemoglobin

Hemoglobin は edestin 等と共に強酸による変性速度大で pepsin の作用域では当然酸による変性状態に在るわけであるが，Anson 法の尿素変性処理により第1図に示す如き大きな相違が両 pepsin の間に見られた。即ち，豚 pepsin に於ては強酸側の消化度低下し，反対に pH 3～4 の消化能上昇して opt. pH は1.8から3～3.5と移動，且つ尿素変性により消化能の上昇（約50% 増）が見られるのに対し，鯨 pepsin では強酸性側の消化能喪失して 'narrow curve' を与え，豚 pepsin とは逆に尿素変性により消化能の低下（約50% 減）が認められる。この場合，反応液中に尿素が存在する故に酵素自身の尿素による影響も考慮しなければならぬが，35°C 10分間の消化初速度の測定なるを以て，主として基質側の変性処理による構造の変化に起因するものと考える。

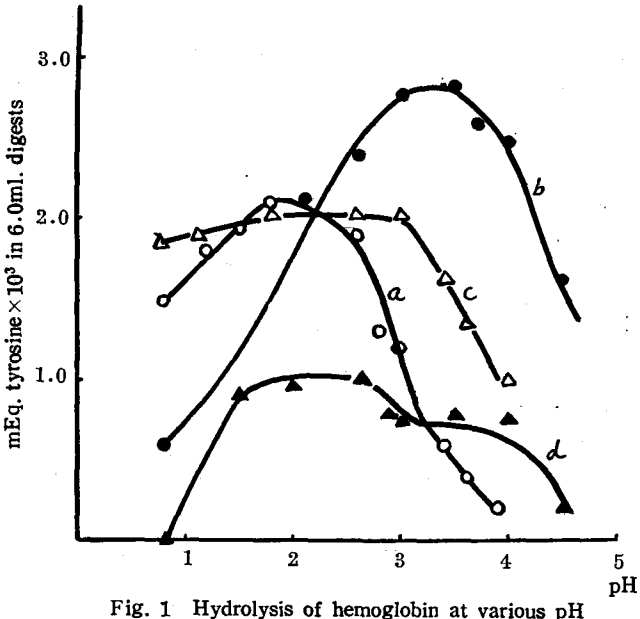

Fig. 1 Hydrolysis of hemoglobin at various pH for 10 min., 35°C
Curve a: swine pepsin on native Hb.
Curve b: swine pepsin on urea-denatured Hb.
Curve c: whale pepsin on native Hb.
Curve d: whale pepsin on urea-denatured Hb.

b. 熱変性魚肉

イワシ及イカ肉に就て生と熱変性せる場合の消化能はそれぞれ第2図並に第3図に示す如くである。

イワシ肉の場合，鯨 pepsin は生の方が約35%消化度大且 opt. pH 2～3 の 'broad curve' を与えるのに対し豚 pepsin では熱変性せる方が約10% 消化度大で opt. pH 1.5～2.0を示す。熱凝固せるものに対して鯨 pepsin は

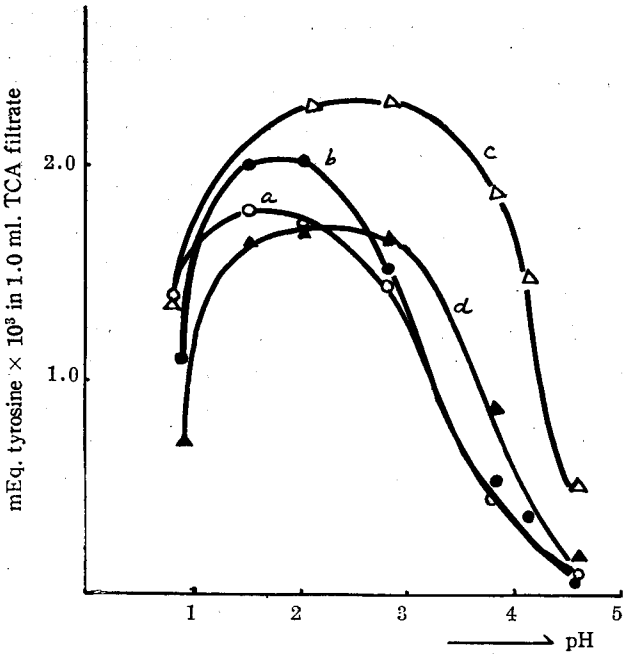

Fig. 2 Hydrolysis of sardine meat at various pH for 60 min., 35°C
Curve a: swine pepsin on native meat
Curve b: swine pepsin on heat-coagulated meat
Curve c: whale pepsin on native squivd meat
Curve d: whale pepsin on heat-coagulated meat

相当劣るも（但し pH 3 以上では稍優る）生肉に対しては豚pepsinよりも遙かに消化能大で特に pH 2～4 に於ける差が大きい。

イカ肉の場合はイワシ肉とは肉質の状態が生・熱凝固の何れに於ても多少異る為両 pepsin共に消化能若干劣るが大体同様の傾向を示す。即ち鯨 pepsin は生肉の方が約 50%大で opt. pH 2～3 の 'broad curve' を与えるのに対し，豚 pepsin では生・凝固共に同程度の消化能（イワシ肉のときより差小となる）で opt. pH 1.8～2.0を示す。この場合も熱凝固せるものに対しては鯨 pepsin は豚 pepsin に劣るも（但しpH3以上では稍優る）生肉に対しては遙かに優る消化力を示す。

一般に魚類 pepsinは蛋白の加熱凝固により消化能低下する事が認められている。即ち，古く Young (1899), Decket (1887) 等は煮洗凝固蛋白が pike 胃 pepsinにより極めて消化し難い事を報じているのを始めとして Hammarsten[14] はnative fibrin を pike 胃 pepsin が速やかに消化するも，加熱変性せる fibrin 及凝固卵白は極めて消化し難い事を示し，Bodansky & Rose[15] は種々の魚胃 pepsin が gelatine を容易に消化するも凝固卵白は分解し難い事，高橋・広沢[16] はウナギの胃 pepsin に就てイワシ肉が加熱凝固により著しく消化し難くなる事（対照に用いた腸 protease はあまり差なし）を示し，何れも加熱凝固蛋白の消化し難い事を認めている。

鯨 pepsin も図示の如くこれら魚類 pepsin 同様加熱凝固により消化能低下す（対照の豚 pepsin は 'native' form ≦ 'denatured' form なるに対し）。

Linderström-Lang[17] の schema $N \rightleftharpoons D \xrightarrow{E}$ hydrolysis products

よりすると鯨 pepsin は魚 pepsin 同様 'native' protein に対する denaturase 作用大なるべし。

Christensen (1952)[9] (1955)[10] によると蛋白質の酵素水解の第1歩は 'native' 分子の 'uncoiling' に始まるが，これは単なる 'denatured' form とは若干異る（例えば coiling-up arrangement 維持に重要な特殊な peptide bonds の解裂などを伴う）ものなる事を想像しているが，鯨 pepsin の場合，尿素変性・熱変性とは異る型式の denaturase 作用が行われるものであろう。或いは 'native' form の方に直接接触しやすい構造を有するものであろうか？

要　　約

1. 尿素並にグアニヂン変性の鯨 pepsin activity に対する影響は豚 pepsin よりも大で，尿素に於ては 3.0

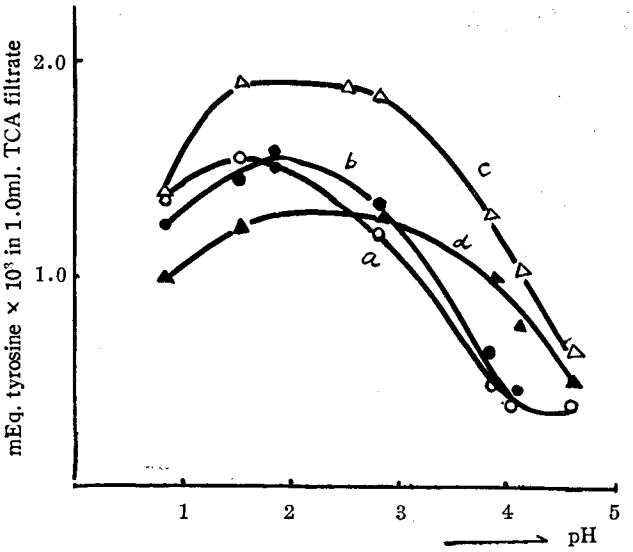

Fig. 3 Hydrolysis of squid meat at various pH for 60 min., 35°C
Curve a: swine pepsin on native meat
Curve b: swine pepsin on heat-coagulated meat
Curve c: whale pepsin on native meat
Curve d: whale pepsin on heat-coagulated meat

M 60時間で約30%減，5.0M 60時間で全く喪失，8.0M では10時間で喪失してしまう。グアニヂンに於ては3.0M 20時間で activity 全く喪失するのに対し豚 pepsin は60時間でも約20%残存す。

2．基質蛋白の変性と鯨 pepsin 消化度との関係は，hemoglobin に於ては尿素変性により分解度約½となり且つ強酸性側に於ける activity 全く喪失するに対し，対照の豚 pepsin では hemoglobin の尿素変性により消化度約50%増大し且つ opt. pH 3.0～3.5へ移動す。魚肉消化に於ては加熱凝固により消化能約30～50%減少し魚類 pepsin 同様 'native' form の消化能大なるを認めた。(対照の豚 pepsin では 'native' form ≦ 'denatured' form)。

本実験遂行に当り御指導御鞭撻を頂いた本学部斎藤恒行教授に厚く感謝の意を表す。

文　　献

1. 第2報，斎藤・石原 (1956). 北大水産彙報 7, 147.
2. Anson, M. L. (1938). *J. Gen. Physiol.* 22, 79.
3. Steinhardt, J. (1938). *J. Biol.* Chem. 123, 548.
4. Perlmann, G. E. (1956). *Arch. Biochem. Biophys.* 65, 210.
5. Anfinsen, C. B., Harrington, W. F., *et al.* (1955). *Biophys. Biochem. Acta* 17, 471.
6. Haurowitz, F., Yurd, N., *et al.* (1944) (*Istanbul Seriyati* 26, 4) *C. A.* (1946). 40, 5082.
7. Burk, W. F., Greenberg, O. M. (1930). *J. Biol. Chem.* 87, 197.
8. Kumitz, M. (1947). *J. Gen. Physiol.* 30, 291.
9. Christensen, L. K. (1952). *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. Chim.* 28, 37.
10. ———— (1955). *Arch. Biochem. Biophys.* 57, 163.
11. Haurowitz, F., Tunka, M., et al. (1945). *J. Biol. Chem.* 157, 621.
12. Bernheim, F., Neurath, H. & Erickson, J. O. (1942). *J. Biol. Chem.* 144, 259.
13. Lineweaver, H., & Hoover, S. R. (1941). *J. Biol. Chem.* 137, 325.
14. Hammarsten, O. (1908). *Z. physiol. Chem.* 56, 47.
15. Bodansky, M. & Rose, W. C. (1922). *Am. J. Physiol.* 62, 482.
16. 高橋・広沢 (1936). 日水誌 5, 109.
17. Linderstrøm-Lang, K., Hotchkiss, R. Q. & Johansen, G. (1938). *Nature* 142, 996.