HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	シロサケ幽門蛋白質分解酵素のゲル濾過における挙動
Author(s)	内田, 直行
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 21(4), 305-314
Issue Date	1971-02
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23439
Type	bulletin (article)
File Information	21(4)_P305-314.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

シロサケ幽門垂蛋白質分解酵素のゲル濾過における挙動

内 田 直 行*

Chromatographic Behaviors of Proteolytic Enzymes in Chum Salmon Pyloric Caeca on Sephadex Gel Chromatography.

Naoyuki UCHIDA

Abstract

The proteolytic enzymes in chum slamon pyloric caeca showed different chromatographic patterns on the Sephadex G-100 column (2.5×100 cm) depending upon the buffers used. By using a 0.2 M borate buffer containing 1 mM $CaCl_2$ pH 8.7 (II), two high proteolytic activities were found, whereas by using a 10 mM Tris-HCl buffer containing 5 mM $CaCl_2$ and 0.05 M NaCl, pH 8.8(I), only one major proteolytic activity was observed on gel chromatography.

Chromatographic patterns of the enzyme were observed interconvertibly by replacing two kinds of buffers (Tris, I and borate, II) on the Sephadex gel column. Two fractions of high proteolytic activity (F_2 and F_3 in Fig. 6) obtained from gel chromatography with a borate buffer clearly showed different mobilities on cellulose acetate electrophoresis.

As the corresponding fractions on electophresis were also identified in the original proteolytic enzymes, it was ascertained that both of proteolytic active fractions isolated on gel chromatography would not be artifacts which might be produced during preparating procedure of enzymes.

From these results, it could be assumed that the Sephadex gel chromatography with a borate buffer would be one of the useful methods for purifying the proteolytic enzyme extracted from the chum salmon pyloric caeca.

緒　　言

サケ幽門垂中には，数種類の蛋白質分解酵素が存在していることが知られている[1)2)]。しかし，その各々の性質については未だ充分に明らかにされていない。ただ，それらについて得られた断片的な性質から，牛などの膵臓性蛋白質分解酵素，トリプシンおよびキモトリプシン[3)]などと類似しているものと考えられる。これらトリプシンおよびキモトリプシンの分子量は非常に類似しているのでSephadexによるゲル濾過においては，ほぼ重なった一つのピークとして溶出される[4)]ことが知られている。以上の諸事実から，サケ幽門垂の抽出液から蛋白質分解酵素を分離するに当って，Sephadex ゲルを用いたゲル濾過法はかなりの精製効果を示すものと思われる。しかし，すでに著者が先報[5)]で述べたように，サケ幽門垂蛋白質分解酵素は酸性条件下できわめて不安定なこと，および塩化カルシュームが酵素の安定化に非常に有効なことなどの特異な性質を示すので，Sephadex によるゲル濾過において使用できる溶媒（緩衝液）の種類にはおのづから制約があることになる。本来，Sephadex によるゲル濾過におよぼす各種溶媒の影響については経験的な知見が断片的に述べられているだけで，詳細な報告はない状態である。従って，著者は本酵素のゲル濾過による精製純化を進めるに当って，先ず，従来常用している二種の溶媒，即ち，硼酸およびトリス緩衝液をゲル濾過の溶媒として応用し，本酵素のゲル濾過による挙動を検討した。

* 北海道大学水産学部生物化学講座
(Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

Pyloric caeca

homogenized for 2 min with 3 vol. distilled water.
added $CaCl_2$ to 1 mM.
adjusted pH to 8.0~8.5 with N NaOH.
allowed to stand for 5 hr.
readjusted pH to 8.0~8.5 with N NaOH.
allowed to stand for 15 hr.
added 1/2 vol. of CCl_4 to wet wt. of pyloric caeca and stired for 1 hr.
centrifuged at 50,000xg for 30 min.

Residue

Supernatant

dialyzed against 0.2M borate buffer containing 1 mM $CaCl_2$, pH 8.7.
added $(NH_4)_2SO_4$ to 0.2 saturation.
centrifuged at 20,000xg for 30 min.

Precipitation

Supernatant

added $(NH_4)_2SO_4$ to 0.7 saturation.
centrifuged at 20,000xg for 30 min.

Precipitation

partially purified proteolytic enzymes

Fig. 1 Preparation scheme of partially purified proteolytic enzymes in chum salmon pyloric caeca
All operations were performed at 3-5°C.

実 験 方 法

試料 1969年4~6月南千島沖で捕獲したシロサケ (*Oncorhynchus keta*) の幽門垂 (膵臓を含む以下同じ) を−20°C 以下に保存して適宜実験に供した。

酵素活性の測定 蛋白質分解, エステラーゼおよびペプチダーゼ作用の測定は前報[5] に従って行なった。

ゲル濾過 充分に膨潤させた, Sephadex G-100 ゲルを 2.5×100 cm になるようにカラムに充塡し, 1 mM 塩化カルシュームを含む 0.2 M 硼酸緩衝液, pH8.7 (以下硼酸緩衝液とよぶ) または 5 mM 塩化カルシュームおよび 0.05 M 塩化ナトリュームを含む 10 mM トリス−塩酸緩衝液, pH8.8 (以下トリス緩衝液とよぶ) で平衡化し, それぞれの緩衝液で溶出した。分画は 10 ml とし, 溶出速度は 25 ml/hr で行なった。粒子外水量 (V_0) は Blue Dextran 2000 を溶出させて求めた。

電気泳動 支持体としてセルロースアセテート膜 (Separax : 常光産業KK製) を使用し, 0.07 M ベロナール緩衝液 (pH8.6, μ=0.07) を使用し, 0.5 mA/cm^2 で 120 分間泳動を行ない, アミドシュヴアルツ 10 B で染色した。

酵素液の調製 Fig. 1 に示すごとくシロサケ幽門垂より酵素抽出液を得, さらに硫安塩析 (0.2~0.7 飽和) を行ない, 得られた沈殿物を粗酵素蛋白質とした。粗酵素蛋白質を少量の硼酸緩衝液に溶解し, 同緩衝液に充分透析した。透析中に生ずる沈殿物を 50,000×g で 30 分間遠心分離を行なって除き, 上澄液を以後の実験に供した。

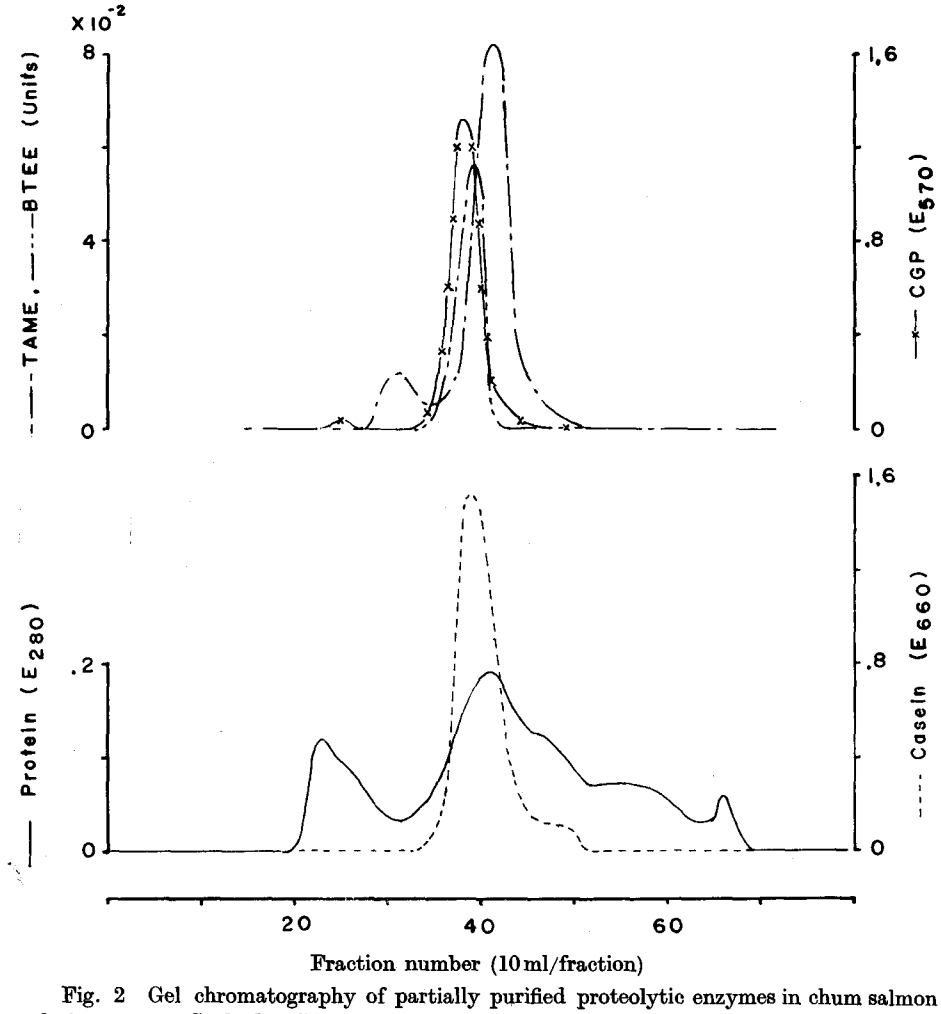

Fig. 2 Gel chromatography of partially purified proteolytic enzymes in chum salmon pyloric caeca on Sephadex G-100 with 10 mM Tris-HCl buffer containing 5 mM $CaCl_2$ and 0.05 M NaCl, pH 8.8.

The protein (10 mg) was dissolved in a 2.5 ml of 0.2 M borate buffer containing 1 mM $CaCl_2$, pH 8.7, precipitation was removed centrifuging and applied to chromatography. The column (2.5×100cm), equilibrated with a 10 mM Tris-HCl buffer containing 5 mM $CaCl_2$ and 0.05 M NaCl, pH 8.8, was operated at a flow rate of 25 ml per hour and fractions of 10 ml were collected. The void volume (V_0) was adjusted to 200 ml. Chromatography was operated at 3-5°C.

実 験 結 果

粗酵素蛋白質溶液 2.5 ml (蛋白質量約 10 mg) をあらかじめ二種の緩衝液 (硼酸およびトリス) で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2.5×100 cm) に重層し，それぞれの緩衝液で溶出した。その結果 Fig. 2 および Fig. 3 に示すごとく，それぞれ異なった溶出図を示した。溶出液がトリス緩衝

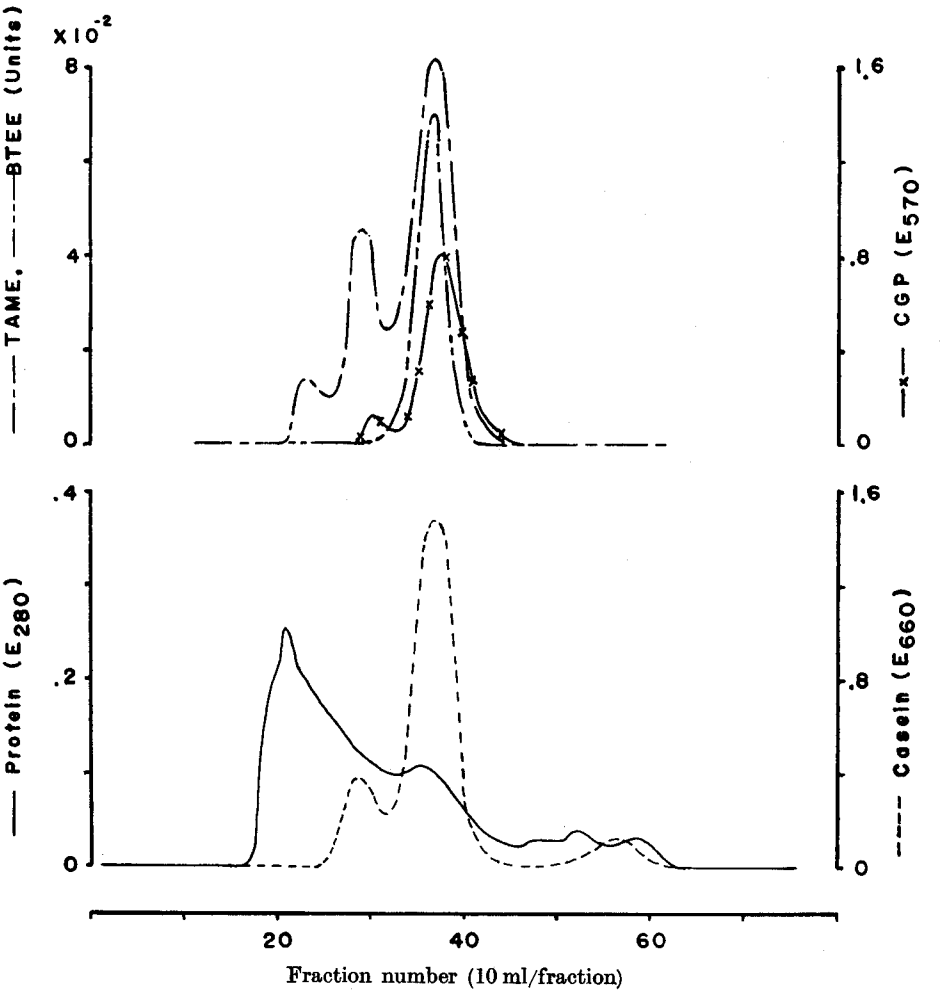

Fig. 3 Gel chromatography of partially purified proteolytic enzymes in chum salmon pyloric caeca on Sephadex G–100 with 0.2 M borate buffer containing 1 mM $CaCl_2$, pH 8.7.

The protein (10 mg) was dissolved in a 2.5 ml of 0.2 M borate buffer containing 1 mM $CaCl_2$, pH 8.7, precipitation was removed by centrifuging and applied to chromatography. The column (2.5×100 cm), equilibrated with a 0.2 M borate buffer containing 1 mM $CaCl_2$, pH 8.7, was operated at a flow rate of 25 ml per hour and fractions of 10 ml were collected. The void volume (V_0) was adjusted to 180 ml. Chromatography was operated at 3–5°C.

液の場合 (Fig. 2) はカゼイン, TAME**, BTEE および CGP 分解作用を示すピークが微かに異なるが, ほぼ同じ位置 (fraction number 35〜45) に溶出された。しかし, 硼酸緩衝液の場合 (Fig. 3) ではカゼイン分解作用を示すピークは明らかに異なる二つの大きなピーク (fraction number 27〜32 と 34〜40) と一つの小さなピーク (fraction number 55〜60) を示した。また TAME 分解作用を示

** 本報告では以下の略称を用いた。
TAME: tosyl-L-argininemethyl ester. BTEE: benzoyl-L-tyrosine ethyl ester.
CGP: carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine.

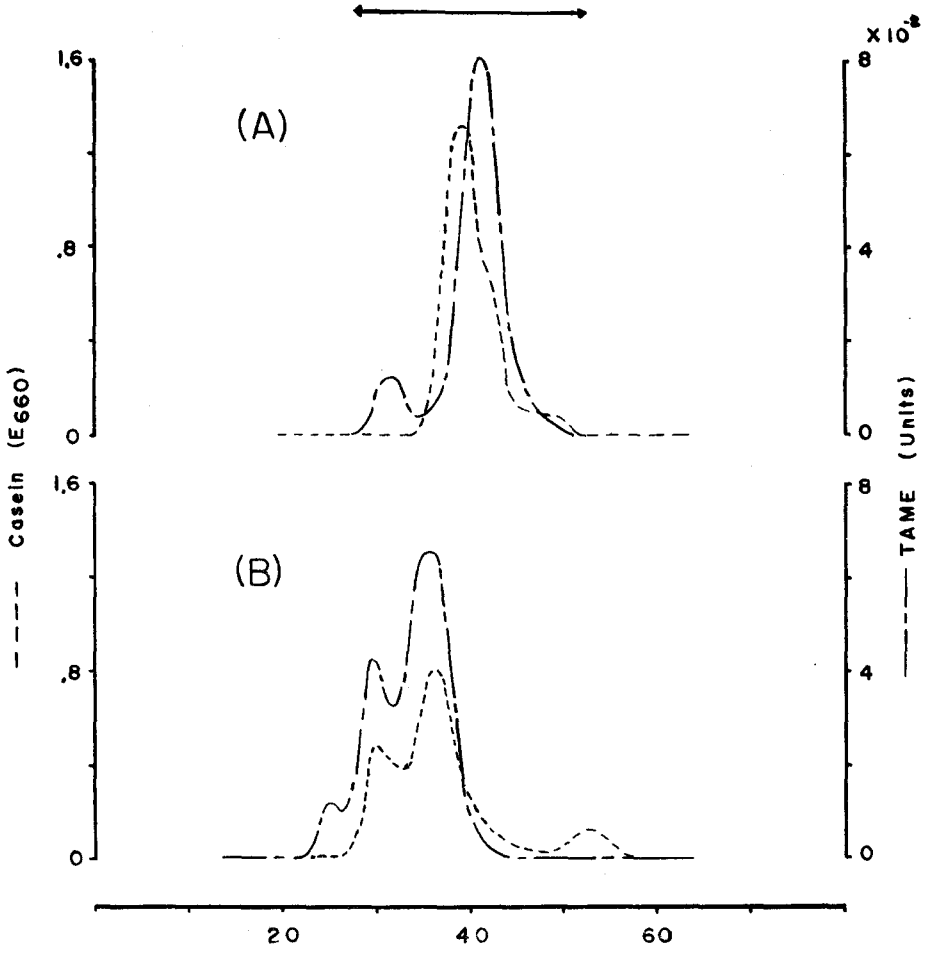

Fig. 4　Change of gel chromatographic pattern of partially purified proteolytic enzymes in chum salmon pyloric caeca with different buffer system.
A: Chromatography with 10 mM Tris-HCl buffer containing 5 mM $CaCl_2$ and 0.05 M NaCl, pH 8.8.
The major parts of fractions (shown under horizontal arrow) were combined, concentrated, and applied to the next column with another buffer system (B).
Other experimental conditions were the same as in Fig. 2.
B: Rechromatography with 0.2 M borate buffer contining 1 mM $CaCl_2$, pH 8.7.
Other experimental conditions, except for the void volume of 200 ml, were the same as in Fig. 3.

すピークも明らかに異なる二つの大きなピーク (fraction number 27～32 と 34～40) を示し，BTEE および CGP 分解作用は fraction number 27～32 にはほとんど認められず，34～40 に認められた。また両者の場合，TAME 分解作用が強く，カゼイン分解作用が非常に弱い小さなピーク（トリス緩衝液で fraction number 28～35. 硼酸緩衝液で 21～26) が同様に存在した。

使用緩衝液により異なった溶出図を示すことが明らかになった。次にこの変化が可逆的なものか不

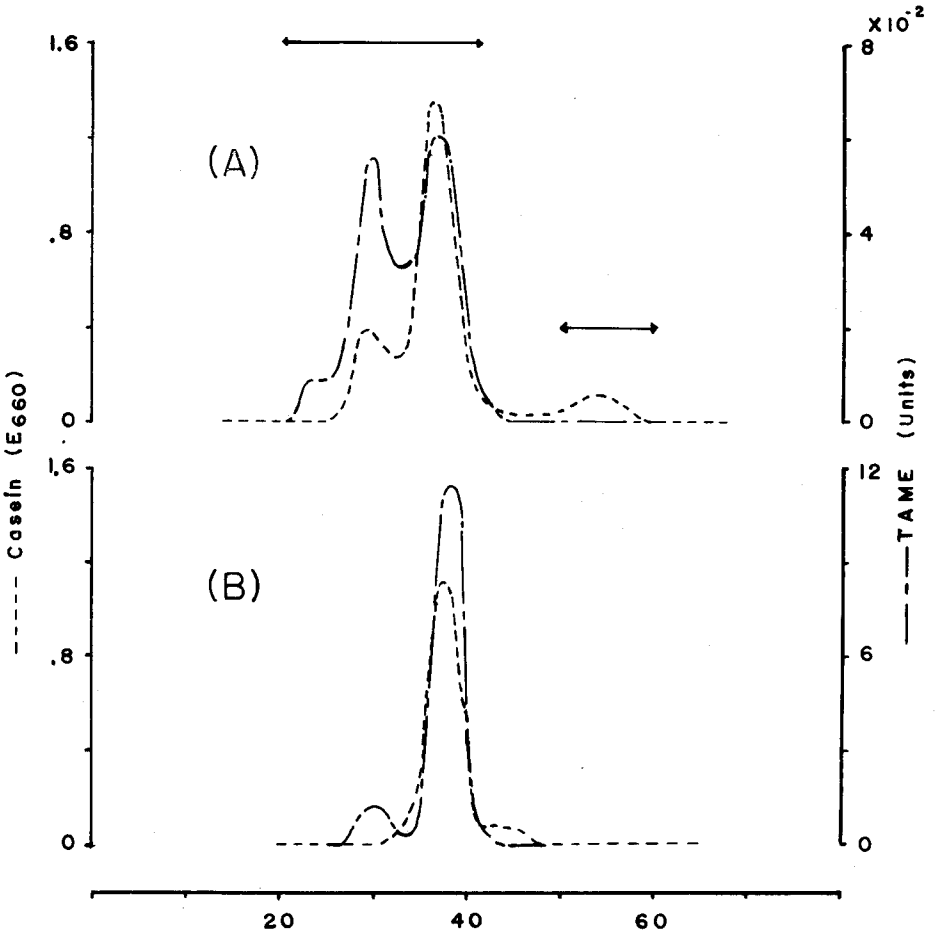

Fig. 5 Change of gel chromatographic pattern of partially purified proteolytic enzymes in chum salmon pyloric caeca with different buffer system.
A: Chromatography with 0.2 M borate buffer containing 1 mM $CaCl_2$, pH 8.7.
The major parts of fractions (shown under horizontal arrow) were combined, concentrated, and applied to the next column with another buffer system (B). Other experimental conditions, except for the void volume of 200 ml, were the same as in Fig. 3.
B: Rechromatography with 10 mM Tris-HCl buffer containing 5 mM $CaCl_2$ and 0.05 M Na Cl, pH 8.8
Other experimental conditions were the same as in Fig. 2.

可逆的なものかを両者の間で違いの著しいカゼインおよび TAME 分解作用について検討した。その結果を Fig. 4および5に示した。先ず，トリス緩衝液によるゲル濾過を行なった後，Fig. 4A に示す矢印の区分を集め，コロジオンバックにより濃縮した酵素液を硼酸緩衝液によりゲル濾過を行なった。その結果は Fig. 4B に示すごとく Fig. 3 とまったく同様な溶出図を示した。次に同様な方法で，硼酸緩衝液によるゲル濾過の後，Fig. 5A の矢印の区分をトリス緩衝液によるゲル濾過を行なったところ，Fig. 5B に示すごとく Fig. 2 と同様な溶出図を得た。

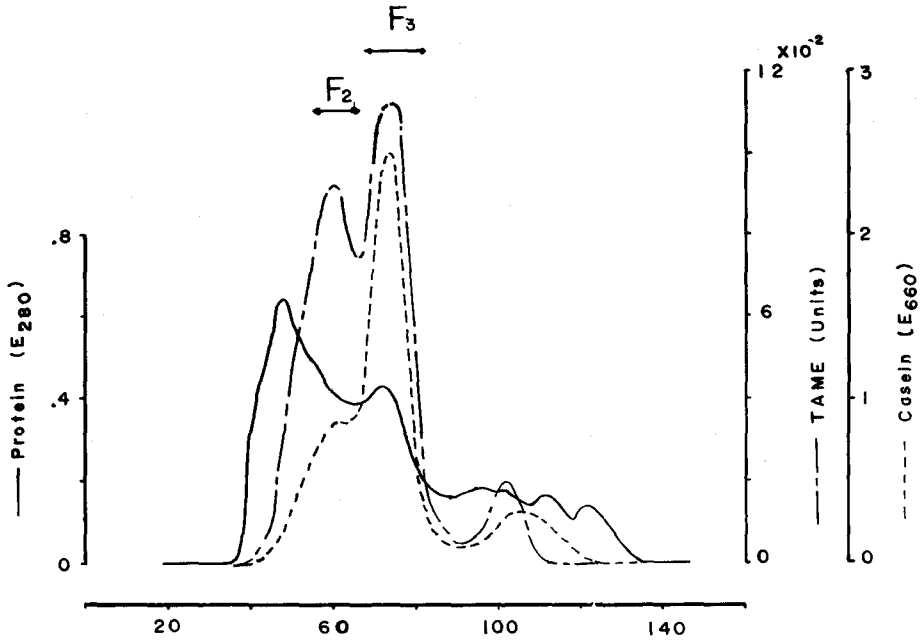

Fig. 6　Gel chromatography of partially purified proteolytic enzymes (50 mg) in chum salmon pyloric caeca on Sephadex G-100 with 0.2 M borate buffer containing 1 mM $CaCl_2$, pH 8.7.
The fractions of 5 ml were collected. The fractions under horizontal arrow (F_2 and F_3) were combined and applied to rechromatography. Other experiments were in the same condition as in Fig. 3.

この結果から2種の緩衝液による溶出図の違いの原因は特定の酵素がトリス緩衝液によるゲル濾過中に失活したためでなく，また硼酸緩衝液により活性化したためではないと思われる。さらに硼酸緩衝液により酵素の分子状態になんらかの変化が起こったとしても，それはゲル濾過的には可逆的なものであることが明らかになった。

このように硼酸緩衝液によるゲル濾過で見い出される蛋白質分解酵素の特異な挙動は単に特定の酵素が硼酸緩衝液の影響により分離し易くなったものか，同一酵素が硼酸緩衝液のなんらかの影響によって，その一部の酵素がゲル濾過的に異なった性質のものに変化したとも考えられる。後者のような現象が起きた場合，その酵素は同一の操作のくりかえしにより一定の割合で常にその影響を受けてゆくことも考えられる。

このような考えに基づき，Fig. 6 に示すごとく粗酵素蛋白質溶液 (17.5 ml, 蛋白質量約 50mg) を硼酸緩衝液を用いてゲル濾過を行ない，その主成分と見なされる二成分 (Fig. 6 の F_2 と F_3) を特に集めて再クロマトグラフィーを行ない，各成分の挙動および電気泳動による態度を検討した。

F_2 および F_3 の再クロマトグラフィーの結果は，それぞれ Fig. 7A および Fig. 7B のようになった。その溶出位置とカゼインおよび TAME 分解作用を示すピークから考えると，F_2 には微量の F_3 が混存することが認められるが，F_3 には F_2 の混存はほとんど認められなかった。即ち，トリス緩衝液から硼酸緩衝液に交換したときに見られる F_3 から F_2 への新らたな変化はもはや起こらなかった。さらに Fig. 7A および Fig. 7B の矢印の区分を集め，コロジオンバックにより濃縮した後，セル

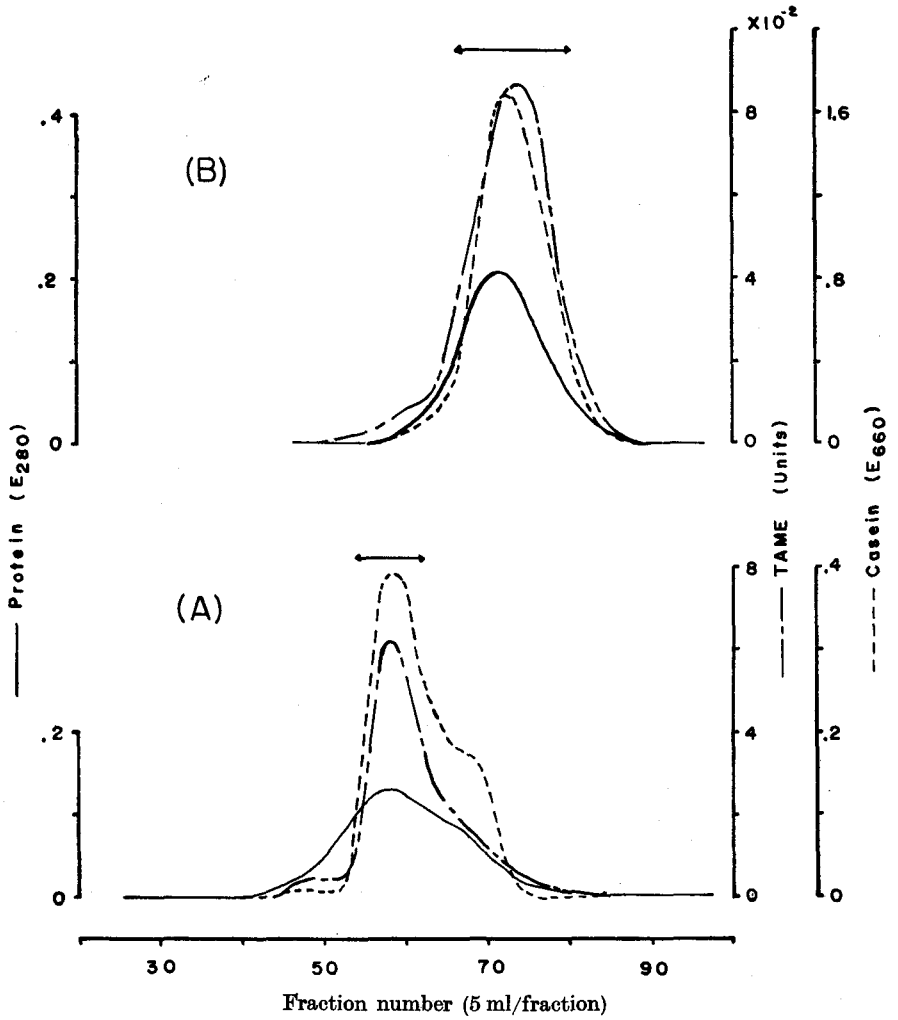

Fig. 7 Rechromatography of fraction (F_2 and F_3 in Fig. 6) on Sephadex G-100 with 0.2 M borate buffer containing 1 mM $CaCl_2$, pH 8.7.
A: Rechromatography of fraction F_2 in Fig. 6 on Sephadex G-100
B: Rechromatography of fraction F_3 in Fig. 6 on Sephadex G-100
Each fraction (F_2 and F_3 in Fig. 6) was concentrated to 5 ml by collodion bags and applied to rechromatography. The fractions shown under horizontal arrow were combined and used for electrophoresis. Other experiments were operated in the same condition as in Fig. 6.

ロースアセテート膜を支持体として電気泳動を行なったところ，Fig. 8 のごとく，その主成分をなす蛋白質はそれぞれ異なった移動度を示し，またそれぞれの成分に相当する蛋白質はゲル濾過を行なうまえの粗酵素蛋白質にも含まれているものである。

以上の結果から，F_2 および F_3 はゲル濾過やその他の処理操作によって人為的に生じたものではなく，元来，粗酵素液中に存在する酵素が硼酸緩衝液によるゲル濾過によって分離したものであると言える。

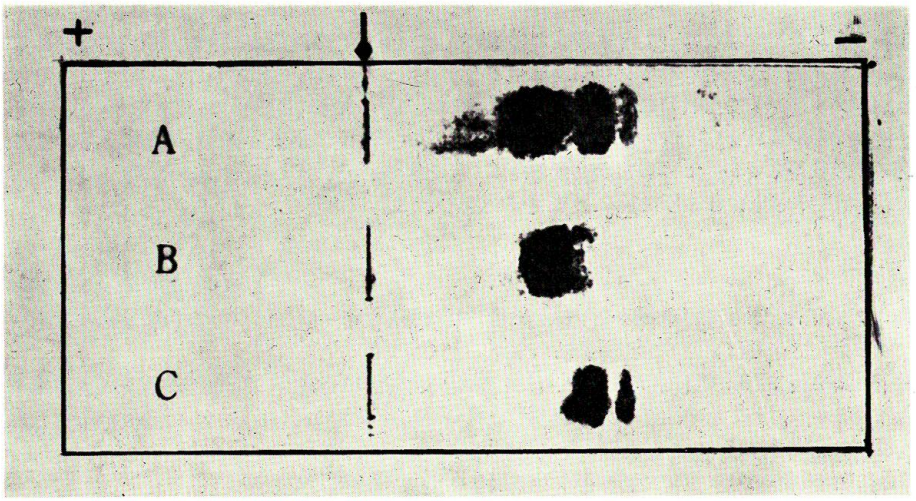

Fig. 8 Cellulose acetate electrophoretic pattern of proteolytic enzymes in chum salmon pyloric caeca.
A: Original enzymes (ammonium sulfate precipitation, 0.2–0.7 saturation)
B: Fraction F_2 shown by horizontal arrow in Fig. 7A.
C: Fraction F_3 shown by horizontal arrow in Fig. 7B.
Electrophoresis was carried out by a pH 8.6 veronal buffer (μ=0.07), 0.05 mA/cm for 120 min. The arrows shows the start.

考　　察

ゲル濾過における使用緩衝液の影響は緩衝液が Sephadex ゲルと試料蛋白質の両者に影響し，その結果が溶出された試料蛋白質の挙動として現われるものと思われる。

ゲル自体におよぼす電解質の影響については，従来経験的な知見が2，3報告[6),7)]されている。それによると分子ふるい効果以外の異常現象であるイオン排斥に基づく溶質の分配係数の低値や吸着に基因する分配係数の高値はイオン強度を0.05以上にすることにより防ぐことができるとされている。本実験に使用した二種の緩衝液（トリス緩衝液; μ= 0,065，硼酸緩衝液; μ = 0.113）はいずれもイオン強度0.05以上ありこれらの問題はないと思われる。さらに，使用した緩衝液はイオン強度に差があるが，トリス緩衝液に塩化ナトリュームをさらに加え，イオン強度を 0.115 とした場合でもイオン強度0.065 の場合とまったく同じ溶出図を示した。また二種の緩衝液の pH はほとんど同じであるので，本実験で見られた現象は緩衝液の pH やイオン強度によるものではなく，緩衝液の種類によるものと思われる。松本ら[8),9)]によると電解質の種類により Sephadex ゲルの保水量等に差が生ずるとしていることから，緩衝液の違いによりゲル自体の性質になんらかの差が生じたことも考えられる。

蛋白質におよぼす影響については i) 蛋白質におよぼす電解質の影響についてはあまり報告されていない。ii) サケ幽門垂蛋白質分解酵素の性質が充分に明らかにされていない。iii) 本酵素の安定 pH および安定化における塩化カルシュームの必要性から種々の緩衝液を使用し，さらに検討を加えられない。などの点から明らかでない。

現在，シロサケ幽門垂蛋白質分解酵素の各々の分子量が明らかにされていないので，トリス緩衝液の場合が正常な分子ふるい効果を示し，硼酸緩衝液により分子ふるい効果以外の異常現象が起きて，分子量的に同一のものが分離しやすくなったのか，またその逆に硼酸緩衝液で正常な分子ふるい効果を示した結果分離し，トリス緩衝液によりその効果が妨げられて分離し難くなったものかは明らかで

ない。

しかしながら，いずれにしても本実験の結果から，シロサケ幽門垂抽出液から蛋白質分解酵素を分離するために硼酸緩衝液によるゲル濾過法はかなり有効な方法になると思われる。しかし，電気泳動の結果，ゲル濾過で得られた二成分（Fig. 7A および 7B の矢印の区分）にいくつかの蛋白質が混在し，活性をもつ成分もいくつか見られることから，シロサケ幽門垂蛋白質分解酵素はさらに分離精製を進める必要があるが，その酵素の主成分はすでに報告されているように anionic なものでなく，等電点が pH8.6 以上のむしろ cationic なものと思われる。

要　　約

シロサケ幽門垂から硫安塩析により部分精製した粗蛋白質分解酵素について Sephadex G-100 カラムによるゲル濾過を行ない，溶出緩衝液の違いによる挙動の変化を検討した。

溶出緩衝液が 5 mM $CaCl_2$ および 0.05 M NaCl を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液，pH 8.8 (I) の場合，ほぼ一つの大きな活性ピークを示し，また 1 mM $CaCl_2$ を含む，0.2 M 硼酸緩衝液，pH 8.7 (II) の場合は，明確な二つの活性ピークを示した。

この二種類の溶出パターンは溶出液を相互に変えることにより可逆的に変換させうることができた。また II で分離した二成分は再クロマトグラフィーの結果および電気泳動的性質から互いに異なる性質の酵素であって，酵素の調製又は精製処理中に人為的に生成されたものではないことがわかった。

以上の事実から，硼酸緩衝液を使用する Sephadex ゲル濾過法はシロサケ幽門垂蛋白質分解酵素を精製する一手段として応用できるものである。

本研究を行なうにあたり御指導ならびに御校閲を賜わった本講座斎藤恒行教授ならびに新井健一博士，サケ幽門垂の採集に御協力いただいた本学部助教授上野元一氏に厚く感謝の意を表する。

文　　献

1) Croston, C.B. (1995). *Arch. Biochem. Biophys.*, **112**, 218.
2) 牛山寛 (1968). 北大水産彙報 **19**, 147.
3) Paul D., (1960). *The Enzymes*, **4**, 93p, Academic Press.
4) 加藤好雄 (1969). 化学と生物 **7**, 485.
5) 内田直行 (1970). 北大水産彙報 **20**, 313.
6) Lathe, G.H., & Ruthven, C.R.J. (1956). *Biochem. J.*, **62**, 665.
7) Gelotte, B. (1960). *J. Chromxtog.*, **3**, 330.
8) 松本潮・長瀬雄三・棚田成紀 (1970). 薬誌 **90**, 236.
9) 松本潮・棚田成紀・長瀬雄三 (1970). 同誌 **90**, 486.