HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ツノマタ粘質物の結晶豚ペプシン作用の阻害について
Author(s)	米田, 義昭; 石原, 義雄; 斉藤, 恒行
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 13(1), 1-7
Issue Date	1962-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23147
Type	departmental bulletin paper
File Information	13(1)_P1-7.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ツノマタ粘質物の結晶豚ペプシン作用の阻害について

米田義昭・石原義雄・斉藤恒行
(北海道大学水産学部水産化学教室)

Inhibiting Action of Carrageenin on Crystalline Swine Pepsin

Yoshiaki MAITA, Yoshio ISHIHARA and Tsuneyuki SAITO

Abstract

In a recent investigation concerning the inhibition of sulfated polysaccharides against peptic action it was found that heparin, chondroitin sulfate and various sulfated polysaccharides inhibit pepsin proteolytic action.

We prepared carrageenin from a red alga (*Chondrus ocellatus f. typicus*) and examined the effect of it on proteolytic and milk clotting action of crystalline swine pepsin. The present data confirmed that the proteolytic action is highly inhibited by the cold water extract of this alga and also by κ-carrageenin at equal rate as compared with the action of hot water extract and of λ-carrageenin. Moreover, concerning the milk clotting activity of pepsin, remarkable difference was observed between the cold water extract and the hot one, the former was inhibitory, while the latter was accelerative.

緒　　言

硫酸基を有する所謂 Sulfated polysaccharide のペプシン作用に及ぼす影響については既に若干の報告が見られる。即ち Placer 等[1] はヘパリン，コンドロイチン硫酸，及び硫酸基を導入した種々の Sulfated polysaccharide がペプシンの蛋白分解作用及び凝乳作用を阻害する事，Marini 等[2] はヘパリン及びコンドロイチン硫酸のペプシン凝乳作用に及ぼす影響を調べ，前者が阻害作用，後者が促進作用のある事を報告している。又 Bonfilis 等[3,4] は α-, β-ヘパリン，コンドロイチン硫酸，及び海藻中の低分子成分が胃液，結晶ペプシンの作用を著るしく阻害する事を報告している。

我々は紅藻類ツノマタより水溶性粘質物を調製し，ペプシンの蛋白分解作用，凝乳作用に及ぼす影響を検討し，ペプシン作用に著るしい阻害効果を与える事が判ったのでここに報告する。

試　　料

ツノマタ粘質物　函館市近郊七重浜にて採集したオオツノマタ *Chondrus ocellatus f. typicus* より Haas[5] 及び森，土屋[6] の方法に準じツノマタ冷浸出物，熱浸出物を下記の如く調製した。

i) ツノマタ冷浸出物—試料採集後速やかに水道水で洗滌後風乾する。この磨細物 150 g に 3 l の水を加え室温で振盪6時間浸出する。ガーゼ濾過して浸出液を集め，残査に 3 l の水を加え 18 時間静置し浸出する。更に同じ操作を一度行って得た浸出液を合せて遠心分離し，少量の沈澱を除く。上

澄液に活性炭 50 g/l と少量のセライトを加えて吸引濾過し殆んど無色透明な濾液を得る。これを約 500 ml 迄減圧濃縮後，無水エタノール 3 倍量を加えて生ずる沈澱を集め，エタノール及びエーテルで脱水後真空乾燥する。

上記の様にして得た粉末は着色し，灰分量が大きいので再び水に溶かし，吸引濾過，エタノール分別を 3 度繰り返した後，セロファンを用いて流水及び蒸溜水に対し 3 昼夜透析後エタノールで再沈澱，エタノール及びエーテルで脱水後，真空乾燥し白色粉末 5.5 g を得た。

ii) ツノマタ熱浸出物—冷浸出物浸出後の残滓を流水で 3 日間洗滌して冷浸出物を完全に除く。この残滓に水 3 l を加えて沸騰水中 30 分間浸出，冷却後ガーゼで濾過して浸出物を集める。これを 3 度繰り返して得た浸出液を合せ，冷浸出物精製の際と同じ操作を行い熱浸出物の白色粉末 7.0 g を得た。

iii) κ, 及び λ-カラゲニン—Smith 等[7] の方法に従って調製した。ツノマタ乾燥物 100 g より κ-カラゲニン 2.5 g, λ-カラゲニン 11.0 g を得た。

上記の如く調製した各成分の灰分量，結合硫酸量及び粘度は Table 1 に示す通りである。なお結合硫酸量は n- 塩酸で 100°C, 120 分間加水分解した後遊離硫酸基をバリウム塩として定量，粘度は Ostwald viscosimeter を用い 26°C で測定した値を示した。

Table 1. Content of ash and combined sulfuric acid, and viscosity of extracts

	Ash (%)	Combined sulfuric acid (%)	Viscosity at 26°C	
			0.1%-soln. (sec.)	0.5%-soln. (sec.)
Cold extract	17.6	20.6	11	117
Hot extract	17.9	18.6	7	108
κ-carrageenin	11.6	19.2	12	84
λ-carrageenin	18.2	24.2	9	55

その他本実験に用いた試料は次の通りである。

ヘパリン 東京化成工業 K.K. のヘパリン (ナトリウム塩), 1 mg=100 I.U.

コンドロイチン硫酸 東京化成工業 K.K. 及び 和光純薬 K.K. の市販品

寒天 市販品を熱水に溶かし，活性炭で脱色後，透析，エタノール分別せるもの

ペプシン Worthington Chemical Sales Ltd., U. S. A. の豚ペプシンの再結品，$[PU]^{Hb}_{mg\,N}=0.23$

ヘモグロビン Anson 法[8] に準じ牛血液より調製

ミルク 雪印乳業 K.K. の脱脂粉乳

方 法

Proteolytic activity の測定 Anson 法[9] に準じ次の通り行った。酵素液 1 ml を試験管にとり，阻害剤水溶液 1 ml を加え一定時間 pre-incubate する。次にあらかじめ 35.5°C に保ってある基質 2%-塩酸ヘモグロビン (pH 2.0) 溶液 5 ml を酵素液に加え，同温度にて 10 分間酵素反応を行った後，5% トリクロル酢酸 10 ml を急速に加えて反応を停止，未消化蛋白質を沈澱せしめ，20 分間放置後濾過，濾液 1 ml に 0.4 M-炭酸ソーダ 5 ml と 3 倍稀釈フオリン試薬 1 ml を加え 35.5°C に 20 分間保った後，660 mμ に於ける吸光度を分光光度計を用いて測定した。阻害剤の代りに水 1 ml

を加え同様に処理して得た値を標準とし，酵素液にトリクロル酢酸，基質の順に加えたものをブランクとした。阻害率は吸光度の比より算出した。なお preincubation の際の pH は 4.4 でペプシンの安定域にある。

Milk clotting activity の測定　凝乳作用測定には種々異った方法があるが，ここでは Herriott の方法[10] に準じて次の通り行った。30 g の脱脂粉乳を 180 ml の水に溶かし，これに酢酸緩衝液 (pH 5.0) を 200 ml 加える。その 5 ml を試験管にとり 2.5%-塩化カルシウム 0.25 ml を加え激しく振る。他の試験管にペプシン 0.5 ml と阻害剤水溶液 0.5 ml をとってよく振り混ぜ，水浴中にて 25°C, 10 分間 pre-incubate する。次に基質溶液を急速に加えて激しく振り，明るい光源下で試験管内を観察する。酵素液に基質を加えた瞬間から管壁に微粒子が現われる迄の時間を測定する。阻害剤溶液の代りに水 0.5 ml を加えて同様に行ったものを標準とする。

実　験　結　果

1. ツノマタ粘質物のペプシン蛋白分解作用に及ぼす影響

Pre-incubation 時間と阻害作用の関係　酵素溶液と阻害剤の pre-incubation 時間がペプシン蛋白分解作用にどの様な影響を与えるかを最初に検討した。ペプシン 1%-stock solution を n/500-塩酸で適宜 (この場合は 30 μg/ml) 稀釈して用いた。之は冷所に保存すれば約 1 週間活性の変化なしに使用できる。

Fig. 1 の如く pre-incubation せずに阻害剤と基質を同時に酵素液に加えた時には阻害作用を全く認める事ができず 1~2 分の pre-incubation で急速な阻害が現れ，以後漸増し 30 分で maximum に達した。更に時間を延長しても阻害の増加は認められなかった。

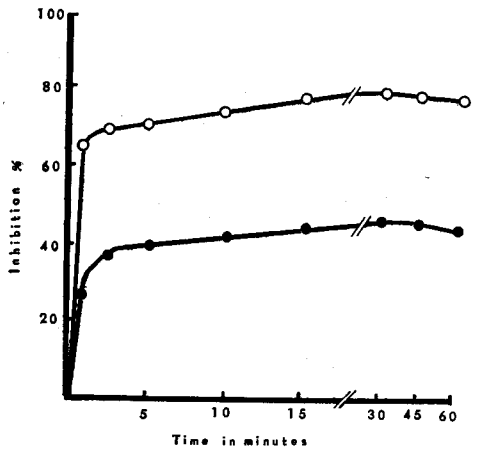

Fig. 1. Relation between inhibiting action and pre-incubation period of enzyme solution and extracts
○, cold water extract;
●, hot water extract.
Enzyme concentartion and extracts used were each 30 μg and 5 mg per incubation mixture at 35.5°C.

阻害剤の量と阻害作用の関係　上記の結果より酵素濃度を 30 μg/ml, pre-incubation の時間を 10 分に限定して各種ツノマタ粘質物，寒天，ヘパリン，及びコンドロイチン硫酸などのペプシン活性に与える影響を検討した。結果を Fig. 2, 3 及び Table 2 に示した。Fig. 2 はツノマタ冷及び熱浸出物，κ- 及び λ-カラゲニンの阻害効果を比較したものである。ツノマタ冷浸出物と κ-カラゲニンはツノマタ熱浸出物と λ-カラゲニンに比べかなり高い阻害効果を与えている事が分る。Fig. 3 はヘパリンと寒天をツノマタ冷浸出物と比較したものであるが，ヘパリンはかなりの阻害作用を示すが多量に

供試した時にはむしろ減少する傾向が見られる。寒天はペプシン活性に殆んど影響を及ぼさない。コンドロイチン硫酸は Table 2 に示す如くペプシンの蛋白分解作用を阻害せず，むしろ幾分促進作用が認められた。

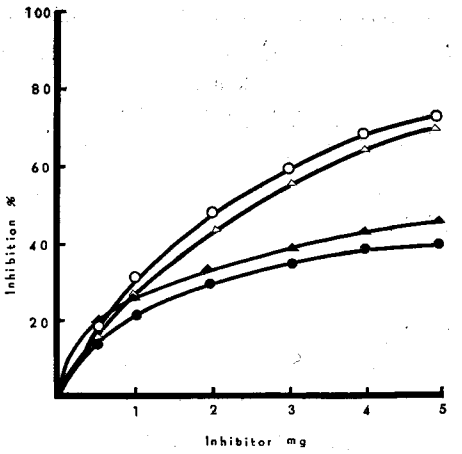

Fig. 2

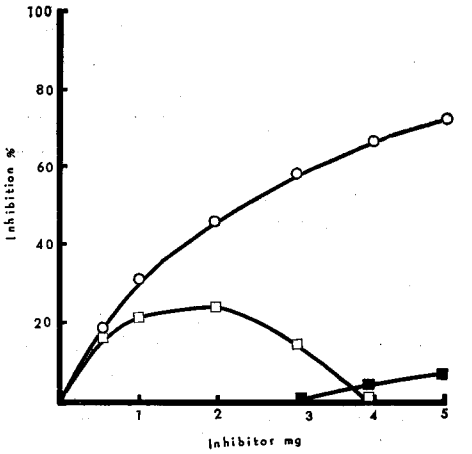

Fig. 3

Fig. 2. Effects of varying concentrations of extracts on crystalline swine pepsin
○, cold water extract; ●, hot water extract; △, κ-carrageecin; ▲, λ-carrageenin

Fig. 3. Effects of varying concentrations of various sulfated polysaccharides on swine pepsin
○, cold water extract; □, heparin sodium; ■, agar

Table 2. Acceleration of chondroitin sulfate on pepsin proteolytic action

mg	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
Chondroitin sulfate	100.0	108.1	112.0	112.4	113.7	116.5	116.0 (%)

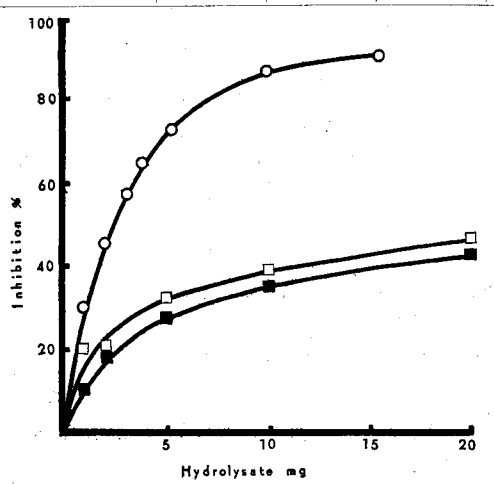

Fig. 4. Effect of acid hydrolysate of cold water extract
○, original extract; ■, hydrolysate of N/10-HCl, 5 min., at 100°C; □, hydrolysate of N/100-HCl, 10min., at 100°C

ツノマタ粘質物の酸分解物のペプシン活性に及ぼす影響　ツノマタ粘質物の結合硫酸量は Table 1 に示す通りであるが，この硫酸基が，阻害作用に関係ありとすれば部分加水分解による硫酸基の脱離が阻害作用に当然影響すると考えられる。我々はツノマタ冷浸出物を用い，n-塩酸，n/10-塩酸，及び n/100-塩酸で短時間，沸騰水中にて加水分解を行い，脱離硫酸基を透析して除去した分解生成物についてペプシンの蛋白分解作用に及ぼす影響を検討した。結果を Table 3 及び Fig. 4 に示した。

Table 3. Relation between acid hydrolysis and inhibition of cold water extract on pepsin proteolytic action

Hydrolysis		Released sulfuric acid %	Inhibition
N-HCl,	120 min	20.6	0
	60 min	19.5	0
	30 min	12.5	0
	10 min	7.0	0
	5 min	5.9	0
N/10-HCl,	15 min	5.9	0
	5 min	3.5	+
N/100-HCl,	30 min	7.8	0
	10 min	less than 1	+

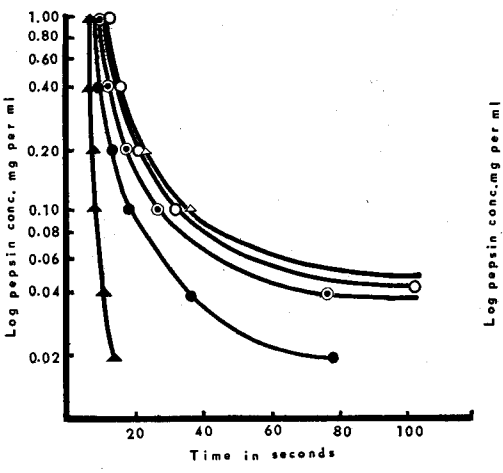

Fig. 5

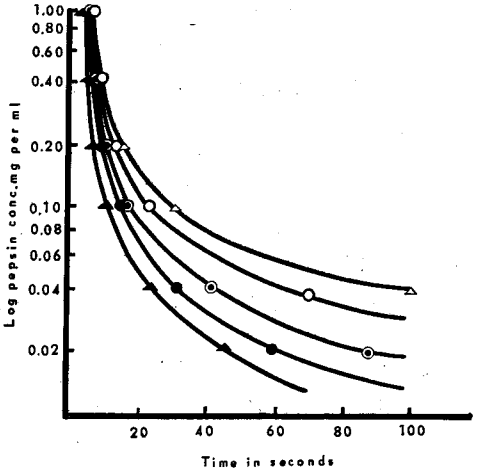

Fig. 6

Fig. 5. Effect of extracts on milk clotting action of crystalline swine pepsin ○, 0.5 mg of cold water extract; △, 2.5 mg of cold water extract; ⊙, normal pepsin milk clotting curve; ●, 0.5 mg of hot water extract; ▲, 2.5 mg of hot water extract

Fig. 6. Effect of heparin sodium and chondroitin sulfate on milk clotting action of crystalline swine pepsin at 25°C
△, 10 mg of heparin sodium; ○, 5 mg of haparin sodium; ⊙, normal pepsin milk clotting curve; ●, 5 mg of chondroitin sulfate; ▲, 10 mg of chondroitin sulfate

硫酸基の脱離が 6%，即ち全結合硫酸の約 30% が失われると阻害作用は全く認められず，3.5% 即ち全結合硫酸の約 18% が失われた時には阻害作用が幾分認められるが，未分解物に比べると著るしく低下している事が分る。

2. ツノマタ粘質物の凝乳作用に及ぼす影響

脱脂粉乳を基質として用いて，ツノマタ粘質物のペプシン凝乳作用に及ぼす影響を検討した。**Fig. 5** はツノマタ冷及び熱浸出物の一定量を各種濃度のペプシン溶液に加えて凝乳時間を測定した結果である。標準曲線を中心として上側に見られる時は阻害作用，下側に見られる時は促進作用を示す訳である。冷浸出物は阻害作用，熱浸出物は促進作用を与える事が分った。 **Fig. 6** はヘパリン及びコンドロイチン硫酸のペプシン凝乳作用に及ぼす影響を示す結果である。ヘパリンは阻害作用，コンドロイチン硫酸は促進作用を与えている。 **Fig. 5** 及び **Fig. 6** に於いて標準曲線が若干異っているが，これは脱脂粉乳の製品の相違に依るものである。

考　　察

ツノマタ粘質物については森，土屋[6] 及び Smith 等[7] の詳細な研究により明らかにされている通り，これを二成分に分別する事ができる。即ち冷浸出物と熱浸出物とでは化学的性質，物理的性状に若干の相違が認められるし，κ-カラゲニンと λ-カラゲニンとでは少くとも硫酸含量，比施光度，及びカリウムに対する **sensitivity** に於いて異っている。我々はこの様な観点より両成分について詳しくペプシン作用に及ぼす影響をしらべた結果，蛋白分解作用に対しては両成分共阻害作用を示すが，その程度にはかなり差異が認められる。又 κ- 及び λ-カラゲニンについても同様である。この実験では酵素液に対して 0～5 mg の阻害剤を加えた結果について比較したが，更に冷浸出物を 10 mg, 15 mg 供試した場合には阻害率は 90% 及び 95% に達する (**Fig. 4**)。

ツノマタ粘質物は高粘性物質であり，又凝固性も大であるので酵素反応の際，基質と酵素との一様な接触を妨げる事が考えられるが，凝固性の大きい寒天が殆んど阻害作用を示さないという事実より，少くともツノマタ粘質物による阻害は凝固性には関係なく，ヘパリン及びコンドロイチン硫酸の結果と考え合せ，それぞれの分子構造殊に硫酸基の結合様式に関連がある様に思われる。本物質による阻害作用は 1～2 分の **pre-incubation** により極めて速やかに現われるが基質と阻害剤を同時に酵素液に加えると全く阻害作用が認められないという事実はペプシンの活性部位が基質との接触以前に先ずブロックされる為に阻害されるものと考えられる。

ヘパリンについては既に報告されている通りペプシンの蛋白分解作用を阻害する事がここでも示されたが，コンドロイチン硫酸は僅かに促進作用のある事を認めた。これは **Placer**[1], **Bonfilis**[3,4] の結果と矛盾するものであるが，これは恐らくコンドロイチン硫酸標品の相違によるものと考える。

ツノマタ冷浸出物の塩酸加水分解の結果，結合硫酸基の約 30% の脱離は阻害効果を全く喪失し，約 5～18% の脱離は阻害効果を半減する事は **Table 3** 及び **Fig. 4** より明らかである。塩酸加水分解を行えば当然 **depolymerization** が起ると思われるが，5～18% 程度の硫酸基の脱離では阻害作用が認められる故，より低分子の **Sulfated polysaccharide** がペプシン作用を阻害する可能性もある。

ツノマタ粘質物のペプシン凝乳作用に及ぼす影響については，冷浸出物が阻害作用，熱浸出物が促進作用を示す結果を得た。ヘパリン及びコンドロイチン硫酸について追試した結果，前者は阻害作用，後者は促進作用を示す事が分った。この様に同じ硫酸基を有する多糖類であるにも拘らず，何故相反する影響を与えるのだろうか。ペプシンの活性部位と之等多糖類の構造との関係は今後の興味ある問題点であろう。

要　　約

ツノマタ粘質物のペプシン作用に対する影響を検討した結果，ツノマタ冷浸出物と κ-カラゲニンはペプシン蛋白分解作用を著るしく阻害し，又熱浸出物と λ-カラゲニンもかなりの阻害を示す事が分った。

塩酸加水分解の結果では結合硫酸基がペプシンの阻害作用に関係していると思われるが，分子構造，殊に硫酸基の結合様式が重要であるらしい。

ペプシンの凝乳作用に対してはツノマタ冷浸出物が阻害，熱浸出物が促進作用を示した。

ヘパリンとコンドロイチン硫酸はペプシンの蛋白分解作用，凝乳作用に対して前者は阻害作用，後者は促進作用を示した。

文　　献

1) Placer, Z., Roubal, Z. & Vokac, V. (1956). *Ceskoslov. Farm.*, 5, 588.
2) Marini, M. & Levey, S. (1955). *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, 88, 611.
3) Bonfilis, S., Dubrasquet, M. & Lambling, A. (1960). *Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol.* 5, 71. (*Chem. Abst.* 54, 11116 (1960)).
4) ———————————— (1959). *Med. Expt.*, 1, 239. (*Chem. Abst.* 54, 15672 (1960)).
5) Haas, P. (1939). *Biochem. J.*, 15, 469.
6) 森　高次郎，土屋靖彦 (1939). 農化 15, 1065.
7) Smith, D. B. & Cook, W. H. (1953). *Arch. Biochem. et Biophys.* 45, 232.
8) 江上不二夫外 (1953). 標準生化学実験. 東京；文光堂.
9) Anson, M. L. (1938). *J. Gen. Physiol.*, 22, 79.
10) Herriott, R. M. (1938). *J. Gen. Physiol.* 21, 501.