



Title	サケ幽門垂蛋白分解酵素の研究：第1報 部分的精製とその性質
Author(s)	吉村, 克二; YOSHIMURA, Katsuji; 柴田, 猛 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 14(4), 262-269
Issue Date	1964-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23197
Type	departmental bulletin paper
File Information	14(4)_P262-269.pdf



サケ幽門垂蛋白分解酵素の研究

第1報 部分的精製とその性質

吉村克二・柴田 猛・牛山 寛
(北海道大学水産学部水産生物化学教室)

Studies on Proteolytic Enzymes of Salmon Pyloric Caeca

I. Partial purification and some properties

Katsuji YOSHIMURA, Takeshi SHIBATA and Hiroshi USHIYAMA

Abstract

Studies were made of the partial purification and some properties of proteolytic enzymes of salmon (*Oncorhynchus keta*) pyloric caeca.

(1) The proteolytic enzymes were purified about 26-fold by extraction at pH 4.8-5.0, autocatalytic activation at pH 8.0-8.5, decolorization with Duolite A-2 and fractionation with acetone (Table 2).

(2) The enzymes have an optimum pH of 8.7 and temperature of 44°C and are stabilized with calcium and manganese ions. The enzymes possess a broader specificity to casein hydrolysis than bovine trypsin.

精 言

魚類幽門垂の酵素化学的研究は以前より多くの研究者によって行なわれ、哺乳類の脾臓に存在するトリプシンに類似する蛋白分解酵素が存在することが報告されている¹⁾²⁾³⁾。そしてこれら魚類のトリプシン類似酵素が哺乳類同様、組織内においては不活性の zymogen として存在することが推定されている⁴⁾。しかしこの zymogen が分泌される時、あるいは自家消化中にある酵素によって活性化されることに関しては、まだ確認されていない。

そこで著者等はこの機構と蛋白分解酵素の構成を究明する第一段階として、シロサケ幽門垂を用いて酵素の精製とその酵素化学的性質について研究を行なった。

実 験

1. 試料

1961年6月南千島近海で北海道大学練習船北星丸が捕獲したシロサケ (*Oncorhynchus keta*) の幽門垂を用いた。捕獲後直ちに海水で洗滌し、-15°C以下に凍結して実験室に持ち帰り、-20°Cのストッカー中に貯蔵して実験に供した。

2. 酵素活性測定方法

酵素液：各段階の酵素液を任意に希釈して最終的に比色計の吸光度が0.1~0.8の範囲内に調節した。希釈液には0.2M 硼酸緩衝液 (pH 8.7) を用いた。

基質溶液：Max S. Dunnの方法⁵⁾により調製したカゼインを0.2M 硼酸緩衝液に懸濁し、2N

苛性ソーダで pH 8.7 に調節して最終的に 2% 濃度となる様に調製した。

測定操作： Anson の方法⁶⁾を改良した萩原の方法⁷⁾に基いて行った。

3. 酵素単位表示法

pH 8.7, 35°C, 10 分反応において 1 分間に生成する三塩化酢酸可溶物の量がチロシン 1mg 当量に相当する場合の活性度を 1 チロシン単位の蛋白分解酵素とし、酵素純度は蛋白態窒素 1mg 当りのチロシン単位で表した。

4. 蛋白加水分解度の測定

Northrop 等の方法⁸⁾に準じて行なわれた蛋白加水分解液 5ml について casein-formol 滴定法⁹⁾により測定した。測定結果は基質蛋白 100mg より生成する遊離 COOH 基のマイクロ当量数で表した。

5. イオン交換クロマトグラフィー

イオン交換樹脂として Duolite C-10 (Chemical Process Co.), および Duolite A-2 (Chemical Process Co.) を塩酸, および苛性ソーダで洗い, 最後に Duolite C-10 は塩酸で, Duolite A-2 は酢酸で洗い, 水洗後夫々の緩衝液で緩衝化して使用した。

6. 比色

日立分光光度計 EPO-A, および島津分光光度計 QR-50 を使用した。

7. pH 測定

島津 pH メーター HH-IA 型を使用した。

実験結果および考察

I. 酵素の精製

1. 抽出条件

Kunitz および Northrop は牛の脾臓のトリプシンおよびキモトリプシンが低い pH で安定であることを発見し, これが酵素の精製に非常に好都合であったことを報告している¹⁰⁾。そこで著者等はこれをサケ幽門垂蛋白分解酵素の精製に応用する目的で, 種々の pH で抽出を行ない, その抽出液を pH 8.0~8.5 に調節して冷室に放置し, 抽出液の活性を測定した。その結果は第一図で示される。pH 1~3 の抽出液では殆ど活性が見られないが, pH 4 抽出液では時間の経過と共に活性が上昇し, pH 6 抽出液に比べ約 40% の活性を示し, 一方 pH 5 抽出液は約 80~90% の活性を示す。従って Croston 等¹¹⁾も述べている様に, 魚類幽門垂蛋白分解酵素は哺乳類の様に低い pH では安定ではないが何らかの形の前駆体が存在するものと推定される。しかし抽出液中に既に相当量の活性酵素が含まれているため未だ確認されていない。pH 5 抽出液は pH 6 抽出液に比べ夾雑する蛋白量も少く, また粘質物も比較的少ない。従って pH 5 で本酵素を抽出するのが好適と思われる。

2. 酵素活性化

次に酵素活性化におよぼす pH の影響を調べるために, pH 5 抽出液を三角フラスコに取り, 2N 苛性ソーダで各 pH に調節して冷室に保ち, 数時間毎にその活性を測定した。第二図に示される様に本酵素の至適 pH である pH 8~9 に調節した酵素液が最も活性が高かった。従って幽門垂中に既に存在する活性酵素がこの活性化に何らかの影響をおよぼすものと推定されるが, 詳細は不明である。故に以下の実験には, pH 5 抽出液を pH 8.0~8.5 に調節して一日放置後, 生ずる沈殿を除去したものをを用いた。

3. 硫酸分画

活性化した酵素液の濾液について硫酸分画を行なった。即ち, 酵素液 1ml に飽和硫酸溶液と 0.2

M 硼酸緩衝液 (pH 8.7) の混合液 4 ml を加え、一夜冷室放置後濾過して、その濾液について酵素活性、および蛋白量を測定した。その結果、本酵素は硫酸濃度 35~60% 飽和の区分で殆ど塩析されることが判明した。

4. 脱色

前項の如く再塩析を行ない、その沈殿を 0.001 M 塩化カルシウムに溶解した。しかしこの段階

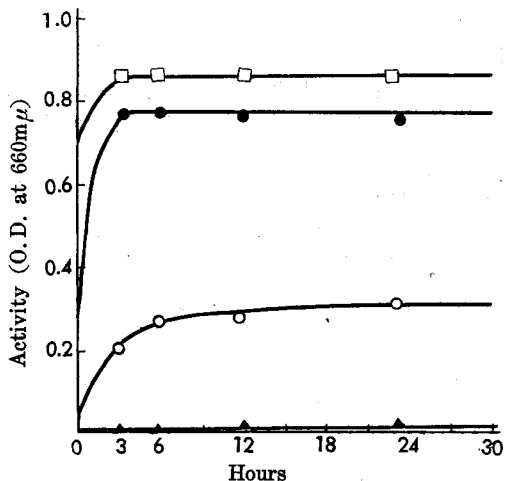


Fig. 1. Effect of pH in extraction on the activity of proteolytic enzymes of salmon pyloric caeca

Frozen salmon pyloric caeca was ground with chopper and extracted with 3 times its weight of 0.001 M calcium chloride at various pH. The extracts were adjusted to pH 8.0-8.5 with 2 N sodium hydroxide, and allowed to stand at 4°C. At the times specified in the figure, enzymatic activity was assayed according to the modified method of Hagihara⁷⁾.

Substrate: 2% casein in 0.2 M borate buffer (pH 8.7), at 35°C, 10 min.

▲: pH 3; ○: pH 4; ●: pH 5; □: pH 6.

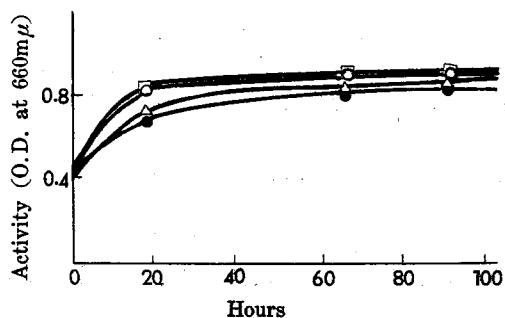


Fig. 2. Effect of pH on the autocatalytic activation of proteolytic enzymes of salmon pyloric caeca at 4°C

Enzyme solutions extracted at pH 4.8-5.0 were adjusted to various pH with 2 N sodium hydroxide, and allowed to stand at 4°C. At the times specified in the figure, enzymatic activity was assayed as in Fig. 1.

▲: pH 7; □: pH 8; ○: pH 9; ●: pH 10

Table 1. Decolorization of enzyme solution with ion exchanger

10 ml of enzyme solution which was prepared by salting out was applied on a column (1.0×10.0 cm) bufferized at pH 7.5. After enzyme solution was passed, 10 ml of buffer solution was passed. The effluent was assayed. Initial enzyme solution has 0.026 PU_{35°}/ml, absorption of 13.1/ml at 230m μ and 0.63/ml at 470 m μ . Values are expressed as the per cent to initial enzyme solution applied to the column.

Ion exchanger	Type	Buffer solution	Recovery of protein (%)	Recovery of enzymatic activity (%)	Rate of decolorization (%)
Duolite C-10	H ⁺	0.2 M phosphate	7.2	0.5	95.8
Duolite C-10	H ⁺	0.2 M phosphate + M ammonium sulphate	6.0	0	98.6
Duolite A-2	OH ⁻	0.2 M phosphate	47.2	89.4	95.8
Duolite A-2	CH ₃ COO ⁻	0.2 M acetate-0.2 M ammonia	38.4	94.0	95.8

の酵素液は相当着色しているために脱色を試みた。各種脱色方法を試験してみたが、イオン交換樹脂による方法が最も良かった。即ち、カチオン交換樹脂として Duolite C-10、アニオン交換樹脂として Duolite A-2 を用いた。前者は 0.2 M 磷酸緩衝液 (pH 7.5) で、後者は 0.2 M 酢酸-アンモニア緩衝液 (pH 7.5)、および 0.2 M 磷酸緩衝液 (pH 7.5) で緩衝化してカラムに詰め、同じ緩衝液でよく洗った後、一定量の酵素液を流し、その後同じ緩衝液を流した。この結果は第一表に示される。Duolite A-2 のカラムでは両方とも酵素は素通りして殆ど脱色されたが、Duolite C-10 のカラムでは流過液は完全に脱色されてはいるが、酵素活性は全くなかった。その上、この吸着した酵素の溶出には 0.1 N 苛性ソーダを必要とし、その際色素も相前後して溶出されるので不適當である。またこのような場合、溶出液の塩濃度が高いと色素のみが吸着され易いことが報告されているので¹²⁾、M 硫酸を含む 0.2 M 磷酸緩衝液 (pH 7.5) を用いてみたが余り効果がなかった。従って脱色には Duolite A-2 の樹脂が非常に効果的であることが判明したが、その際の緩衝液としては以後の操作上、塩類の析出を防ぐために酢酸-アンモニア緩衝液を用いることにした。

5. アセトン分画

脱色した酵素液を更にアセトン分画を行なった。即ち、酵素液 1ml に -20°C に冷却したアセトンと 0.2 M 硼酸緩衝液 (pH 8.7) との混合液 4ml を加えて生ずる沈殿を濾別して、その濾液について酵素活性、および蛋白量を測定した。その結果、アセトン濃度 45~65% の区分で本酵素は殆ど

Table 2. Specific activity of each preparation of proteolytic enzymes of salmon pyloric caeca in various stages of purification

Preparation	Volume (ml)	Enzymatic activity			Yield	Specific activity
		PU _{35°} /ml	PU _{35°} /mg PN	Total PU _{35°}		
Extract from 1kg of salmon pyloric caeca at pH 5	3200	0.0022	0.0032	6.80	—	1.0
Activated solution	3190	0.0049	0.020	15.47	100	6.2
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.35-0.60 satd.	750	0.0188	—	14.11	91.4	—
Decolorized solution	415	0.0273	—	11.59	75.0	—
Acetone, 45-65% ppt.	32	0.288	0.085	9.22	59.6	26.5

沈殿した。次に試料 1kg を用いて、以上の精製過程によって本酵素の部分的精製を行なった。その精製の各段階の比活性と収量は第二表で示される。この結果、シロサケ幽門垂蛋白分解酵素は約 26 倍精製され収量は約 59% であった。なおサケ幽門垂蛋白分解酵素は数種類の酵素より構成されていることが判明したので¹³⁾¹⁴⁾、各酵素の分画は次報で報告する予定である。

II. 部分的精製した酵素の性質

上記の如く精製した酵素について、二三の性質を調べた。

1. 至適 pH

Sørensen の磷酸緩衝液 (pH 5.5~7.7), 第一磷酸カリ-硼砂緩衝液 (pH 8.0~9.0), 硼砂-炭酸ソーダ緩衝液 (pH 9.4~11.0) を用いて酵素活性におよぼす pH の影響を測定した。その結果は第三図で示される。この図より至適 pH は約 8.7 であり、マグロ幽門垂蛋白分解酵素¹⁵⁾の pH 7.6 よりも相当高かった。一方、牛トリプシン¹⁶⁾では pH 7.5~9.5 に、ペニサケ⁸⁾ およびマスノスケ¹¹⁾幽門垂蛋白分解酵素では pH 9.0 に夫々至適 pH が存在することを報告している。なお本実験で用いた酵素は数種の混合物であるが、分離した個々の酵素について行なった実験でも大体 pH 9 前後に至適 pH が存在することが判明した¹³⁾。

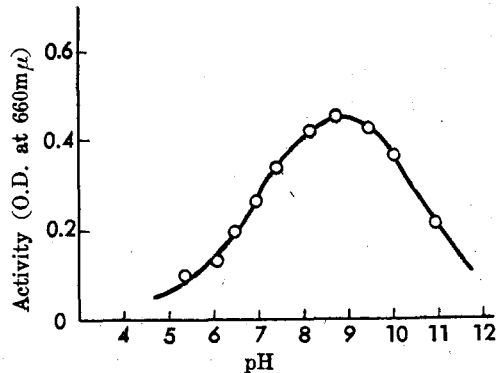


Fig. 3. Relation between pH and activity of partially purified proteolytic enzymes of salmon pyloric caeca

Buffer: 0.1 M phosphate buffer (pH 5.5-7.7), 0.1 M phosphate-0.05 M borax (pH 8.0-9.0), 0.05 M borax-0.05 M carbonate (pH 9.4-11.0).

Substrate: 2% casein, at 35°C, 20 min.

2. 至適温度

次に温度の影響について測定した。その結果は第四図に示される。シロサケ幽門垂蛋白分解酵素は 44°C に至適温度を有し、マグロペプシン¹⁷⁾の 42°C に類似し、他の魚類の蛋白分解酵素同様に陸上哺乳類動物に比べて相当低く、かつ温度に対して非常に敏感である。

3. 金属イオンの効果

各種金属イオンの効果を測定し、その結果は第三表に示される。Ca⁺⁺, Mn⁺⁺, Li⁺⁺ を添加したものは無添加のものに比べ酵素安定作用を示し、中でも Ca⁺⁺ は特に効果大であった。これはトリプシン¹⁸⁾や細菌蛋白分解酵素¹⁹⁾の Ca⁺⁺ による安定化に似ている。一方 Zn⁺⁺ や Fe⁺⁺ はむしろ不活性化剤としての作用を示す。

4. 蛋白質の加水分解度

起源を異にする各種の蛋白分解酵素は夫々特有の基質特異性を有し、蛋白質を構成するアミノ酸の

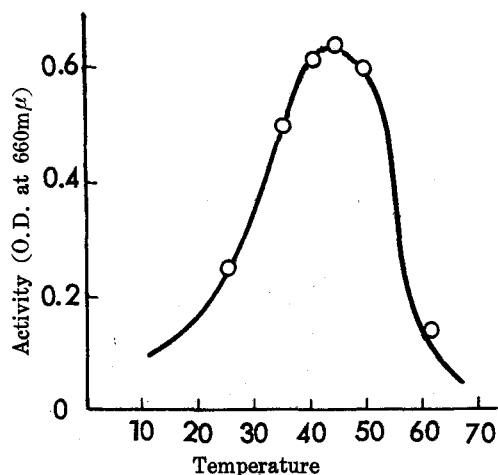


Fig. 4. Relation between temperature and activity of partially purified proteolytic enzymes of salmon pyloric caeca
Substrate: 2% casein in 0.2 M borate buffer (pH 8.7), for 10 min.

Table 3. Effect of metal ions on the activity of partially purified proteolytic enzymes of salmon pyloric caeca

The enzymes were preincubated with various metal ions an hour at 35°C before addition of substrate.

Added metal salts	Conc. (M)	Enzymatic activity (PU _{35°} /ml)		
		Initial	After	Remaining (%)
NaCl	1/500	1.48 × 10 ⁻³	0.47 × 10 ⁻³	31.7
ZnCl ₂	1/1000	1.67 "	0.45 "	26.9
CaCl ₂	1/1000	1.43 "	0.91 "	63.6
KCl	1/500	1.68 "	0.55 "	32.7
MnCl ₂	1/1000	1.77 "	1.00 "	56.5
MgCl ₂	1/1000	1.74 "	0.41 "	23.5
LiCl ₂	1/1000	1.51 "	0.62 "	41.1
FeCl ₂	1/1000	1.33 "	0.15 "	11.3
No salt	0	1.71 "	0.54 "	31.5

多種多様のペプチド結合のうち特殊な結合のみを切断する。従って特定の基質蛋白に対して特定の加水分解度を示す。既に Northrop 等⁸⁾によって指摘されている様に、ある一種の蛋白分解酵素を蛋白に作用させ、その加水分解度がほぼ最高に達したのち、更に別種の蛋白分解酵素を反応液に添加すると、両者の基質特異性が異なる場合には新たな分解反応が進行するが、両者の基質特異性が相似する場合には分解反応はそれ以上進行しない。著者等はこの方法を利用してシロサケ幽門垂蛋白分解酵素と既知の牛トリプシン(東京化成)との交叉実験を行ない、その特異性の比較を行なった。この結果は第五図に示される。この図よりも明らかな如く、シロサケ幽門垂蛋白分解酵素はトリプシンの分解し

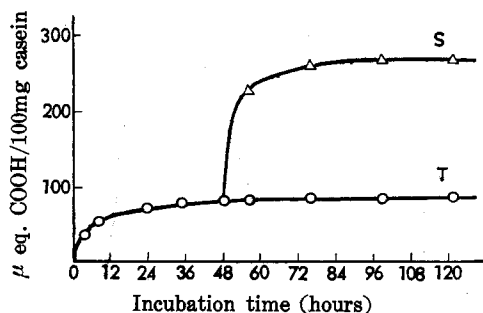


Fig. 5. Digestion at 35°C of casein by trypsin followed by partially purified proteolytic enzymes of salmon pyloric caeca

- : Reaction mixture was the solution of 100 ml of 5% casein in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) containing 45 mg bovine trypsin and 5 ml of 99% ethanol.
- △: After 48 hours 18 mg partially purified proteolytic enzymes of salmon pyloric caeca was further added to 40 ml of above reaction mixture.

得ないペプチド結合の多くを加水分解する。しかし本酵素が数種の蛋白分解酵素より構成されているので、この様に多くのペプチド結合が切断されるものと推定されるが、トリプシン加水分解物にキモトリプシンを添加した際に切断される割合はこの値の約 2/3 である⁹⁾。従ってシロサケ幽門垂蛋白分解酵素は哺乳類よりも相当基質特異性が低い、または特異性の異なる別種の酵素が存在するものと思われる。

要 約

シロサケ幽門垂を用いて蛋白分解酵素の部分的精製とその酵素化学的性質が研究された。

1. シロサケ幽門垂の pH 4.8~5.0 の抽出液を pH 8.0~8.5 に調節して酵素を活性化し、塩析および脱色をくり返し、更にアセトン分画を行なうことにより、蛋白分解酵素は約 26 倍比活性が増した。

2. この部分的精製した酵素の至適 pH は 8.7, 至適温度は 44°C である。また Ca⁺⁺ および Mn⁺⁺ により安定化される。また牛トリプシンよりも相当基質特異性が低い。

本研究に当り、試料の採集に御協力願った北海道大学練習船北星丸乗組員並びに調査員各位に感謝する。

文 献

- 1) 大島幸吉 (1940). 酵素化学工業全集. 17 水産動物酵素化学 58p 東京; 厚生閣.
- 2) 藤井実 (1955). 水産講習所研究報告 5, 103.
- 3) Joseph, A.S. & Ernest, E.L. (1953). *J. Fish. Res. Bd. Canada* 10, 590.
- 4) Barrington, E.J.W. (1957). *The Physiology of fishes* (Brown, M.E., ed.). 1, 136 p. New York; Academic Press.
- 5) Max S. Dunn (1949). *Biochemical Preparation*. 1, 22 p. New York; John Wiley & Sons, Inc.

- 6) Anson, M.L. (1938). *J. Gen. Physiol.* **22**, 79.
- 7) 萩原文二 (1953). 標準生化学実験. 207p. 東京;文光堂.
- 8) Northrop, J.H., Kunitz, M. & Herriott, R.M. (1952). *Crystalline Enzymes*. 120 p. New York; Columbia Univ. Press.
- 9) 山崎 誠 (1958). 実験化学講座. **24**, 319 p. 東京;丸善.
- 10) Northrop, J.H. & Kunitz, M. (1932). *J. Gen. Physiol.* **16**, 267.
- 11) Croston, C.B. (1960). *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 202.
- 12) 奥貫一男・萩原文二・浮田富蔵 (1961). 化学特許総覧. **20**, 2196.
- 13) 吉村克二・柴田 猛・牛山 寛 (1963). 昭和38年度日本水産学会秋季大会講演.
- 14) Croston, C.B. & Halver, J.E. (1961). *Federation Proc.* **20**, 241.
- 15) 斗ヶ沢宣久・勝又梯三 (1957). 日水誌 **23**, 157.
- 16) Northrop, J.H. & Kunitz, M. (1932). *J. Gen. Physiol.* **16**, 295.
- 17) Norris, E.R. & Mathies J.C. (1953). *J. Biol. Chem.* **204**, 673.
- 18) Gorini, L. (1951). *Biochim. Biophys. Acta* **7**, 318.
- 19) Hagihara, B. (1955). *Ann. Rep. Scient. Works Fac. Sci. Osaka Univ.* **2**, 35.