



Title	サケ幽門垂炭水化物分解酵素の研究
Author(s)	牛山, 寛; USHIYAMA, Hiroshi; 藤盛, 健 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 16(3), 183-188
Issue Date	1965-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23258
Type	departmental bulletin paper
File Information	16(3)_P183-188.pdf



サケ幽門垂炭水化物分解酵素の研究

牛山 寛・藤盛 健・柴田 猛・吉村克二

Studies on Carbohydrases in the Pyloric Caeca of the Salmon, *Oncorhynchus keta**

Hiroshi USHIYAMA, Takeshi FUJIMORI, Takeshi SHIBATA
and Katsuji YOSHIMURA**

Abstract

For the purpose of obtaining some informations on the function of the pyloric caeca and the culture of salmonoid fishes, a study was made of carbohydrases in the extracts from the pyloric caeca of the salmon, *Oncorhynchus keta*.

(1) The activities of α -amylase (EC 3.2.1.1) and α -glucosidase (EC 3.2.1.20) were demonstrated in the extracts, but not β -glucosidase (EC 3.2.1.21), β -fructofuranosidase (EC 3.2.1.26) and cellulase (EC 3.2.1.4). That of β -galactosidase (EC 3.2.1.23) was slightly.

(2) The amylase was fractionated on DEAE-cellulose column. The partially purified enzyme has an optimal pH of 8.5 and temperature of 20°C, but is very thermo-labile.

(3) A comparison was made of the amylase activities of the extracts from the digestive organs of various fishes. The ratio of the activity of the pyloric caeca of the Salmon, *Oncorhynchus keta*: the intestine of the Carp, *Cyprinus carpio*: the pyloric caeca of the Cod, *Gadus macrocephalus*: the intestine of the Flounder, *Kareius bicoloratus* was 1 : 411 : 29.5 : 9.5.

結 言

サケ、マス類の消化酵素の研究において、蛋白分解酵素については現在までかなり行なわれているが^{1)~7)}、炭水化物分解酵素に関する報告はきわめて少ない⁸⁾⁹⁾。その中で北御門らのニジマスの炭水化物分解酵素の研究⁹⁾によると、草食性の度合の強いコイ、アユに比較すると非常に活性が低いながらも、amylase および α -glucosidase は存在するが β -galactosidase, β -fructofuranosidase および cellulase などは存在しないことを報告している。一方回游中のサケ、マス類の炭水化物分解酵素に関する報告はほとんどない。そこで著者らはサケ、マス類の消化器管中で炭水化物消化力がもっとも強い脾臓および幽門垂を用いて炭水化物分解酵素の研究を行なうことにより、サケ、マス類の養殖の際の餌料についてなにか有用な知見を得る目的でこの研究を行なった。

実 験

1. 試 料

サケ幽門垂：1962年6月中部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の幽門垂を

* 北海道大学水産学部北洋水産研究施設 業績第5号 (Contribution No. 5 from the North Pacific Fisheries Research Unit, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

** 北海道大学水産学部生物化学教室

使用した。

他種魚の消化器管：市販の養殖コイの腸および新鮮なマダラの幽門垂および砂ガレイの腸を使用した。

上記の各消化器管はそれぞれ摘出後、内容物を除去して -20°C のストッカー中に貯蔵して実験に供した。

2. 酵素液の調製

各消化器管を冷所で少量の海砂とともに乳鉢中で磨細し 5 倍量の 1% 食塩水で抽出し、濾過助剤を用いて吸引濾過して得た濾液を酵素液として使用した。

3. 酵素活性の測定

(1) 糖化力測定法

生成する還元糖を Somogyi-Schaffner-Hartman の方法¹⁰⁾ に基いて行なった。

基質溶液：maltose, lactose, sucrose および salicin (いずれも和光純薬製) はそれぞれ 0.013 M に調製し、また soluble starch, glycogen および dextrin (いずれも和光純薬製) は 1% 溶液に、CM-cellulose (Pharmacia 社製) は 1% 懸濁液に調製した。

活性の測定：基質溶液 2 ml および 0.2 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 4 ml を試験管に採り、 35°C の恒温槽に 5 分間 preincubation し、酵素液 2 ml 加え各時間毎に反応液について還元糖を定量した。

(2) 澱粉糊精化力測定法

Amylase の糊精化力を blue value 法¹¹⁾ により測定した。

測定：試験管に 1% soluble starch 2 ml および 0.2 M 磷酸緩衝液 (pH 8.0) 1 ml 採り、これに酵素液 1 ml 加え 30°C で 30 分間反応させた後、萩原の改良法¹¹⁾ に基いて blue value を測定した。

4. クロマトグラフィー

市販の DEAE-セルローズイオン交換体 (Pharmacia 社製) を常法通り苛性ソーダおよび塩酸で洗浄し最後に充分水洗した後、0.005 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.6) で緩衝化して用いた。溶出は食塩濃度の stepwise gradient elution によって行なった。なお、クロマトグラフィーの全操作は冷室中で行なった。

実験結果および考察

1. 炭水化物分解酵素活性

シロサケ幽門垂の炭水化物分解酵素活性に及ぼす各種塩類溶液による抽出効果を測定した結果、対照の水に比べ顕著な効果を示さなかったが、その中でも食塩および塩化マグネシウムが比較的效果を示したので、以下の実験には 1% 食塩水抽出液を酵素液として用いた。つぎに各種基質を用いて炭水化物分解酵素の存在を還元力の増加により測定した。その結果は第 1 表に示される。表より明らかごとく amylase および α -glucosidase は存在するが、 β -glucosidase および β -fructofuranosidase および cellulase は確認されなかった。しかし β -galactosidase はわずかながらその存在が確認された。

2. Amylase の精製および性質

(1) Amylase の精製

シロサケ幽門垂炭水化物分解酵素のうちもっとも活性の強い amylase の性質を検討するために DEAE-セルローズによりクロマトグラフィーを行なった。まず凍結中の幽門垂から常法に従いアセトン粉末を調製し、その粉末に 10 倍量の 0.005 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.6) を加え充分抽出後遠心分離して、その上澄液 10 ml を 0.005 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.6) で緩衝化した DEAE-セ

Table 1. Digestion of various carbohydrates with the extract of salmon pyloric caeca.

Enzyme solution was obtained by extracting the ground salmon pyloric caeca with 5 times its weight of 1% NaCl. Reaction mixtures contained 4 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0), 2 ml of substrate solution and 2 ml of enzyme solution. They were incubated at 35°C for 30 min., and the amounts of reducing sugar produced were measured by the Somogyi-Schaffner-Hartman's method¹⁰⁾. The substrate was used concentration of 0.013 M for maltose, lactose, sucrose and salicin, and that of 1% for soluble starch, glycogen and dextrin. CM-cellulose was used as fine suspension of concentration of 1%

Substrate	Activity	Enzyme responsible for hydrolysis
<i>Polysaccharides:</i>		
Soluble starch	+	Amylase
Glycogen	+	Amylase
Dextrin	+	Amylase
CM-cellulose	-	
<i>Disaccharides:</i>		
Maltose	+	α -Glucosidase β -Galactosidase
Lactose	weak +	
Sucrose	-	
<i>Glycoside:</i>		
Salicin	-	

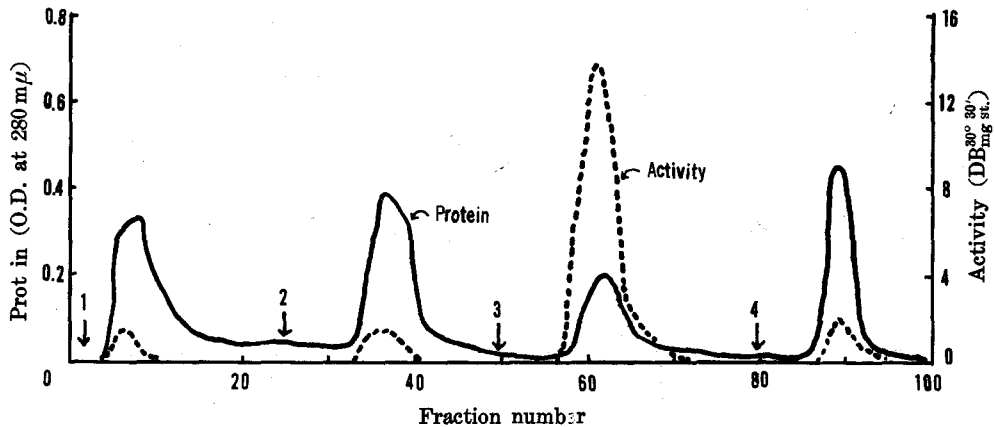


Fig. 1. Chromatography of the amylase of pyloric caeca on DEAE-cellulose

Acetone powder of salmon pyloric caeca was extracted with 10 times its weight of 0.005 M Tris-HCl buffer (pH 8.6) and centrifuged. 10 ml of the supernatant was applied to the column (2×15 cm) equilibrated against 0.005 M Tris-HCl buffer (pH 8.6). Elution was accomplished by the successive application of 0.005 M Tris-HCl buffer (pH 8.6) having (1) 0 M, (2) 0.1 M, (3) 0.3 M and (4) 0.5 M NaCl at the points indicated by the vertical arrows. 4-ml fractions collected at a flow rate of 20 ml/hour; temperature, 4°C

ルローズカラムに吸着させた。溶出は食塩濃度の *stepwise gradient elution* によって行なった。第 1 図に示されるように溶媒 3 の区分に強い *amylase* 活性が認められた。また各溶媒で溶出した区分にもごくわずかながら活性が認められた。このクロマトグラフィーの操作によって *amylase* の比活性は約 7 倍増加し、*amylase* 活性の収率は 75.5% であった。

(2) *Amylase* の性質

つぎに上記の溶媒 3 により溶出した区分を用いて酵素化学的性質を検討した。

至適 pH: *Amylase* 活性に及ぼす pH の影響を調べた。その結果は第 2 図に示される。この図より至適 pH は約 8.5 であり、蛋白分解酵素の至適 pH とほぼ同様である⁷⁾。なお、谷は還元力の増加により至適 pH は約 7.0 であると報告しているが⁹⁾、著者らも同じ方法により測定した場合には同様の結果を得ている¹²⁾。また α -glucosidase の至適 pH は約 7.0 であるので還元力の増加によって測定した場合の至適 pH は *amylase* のみではなく α -glucosidase の影響も受けているものと推定される。

至適温度: つぎに温度の影響について測定した。第 3 図より明らかなごとく 20°C 近辺に至適温度を有する。本研究において反応温度を 30°C に定めたのは粗酵素液について行なった至適温度が 30°C であったためであるが、この結果から酵素が精製されたために非常に不安定になり、至適温度が 20°C に変化したものと推定される。また精製したシロサケ幽門垂 *amylase* は熱に対して非常に不安定であり、50°C に 30 分間 *expose* するとその活性の大部分が失なわれることが観察された。

3. 他種魚との *amylase* 活性の比較

従来サケ、マス類は肉食性の度合の非常に強い魚類に属しているが、北御門らの研究によればニジマスの消化器管には相当強い α -glucosidase および *amylase* が存在し、それらの活性度は草食性の

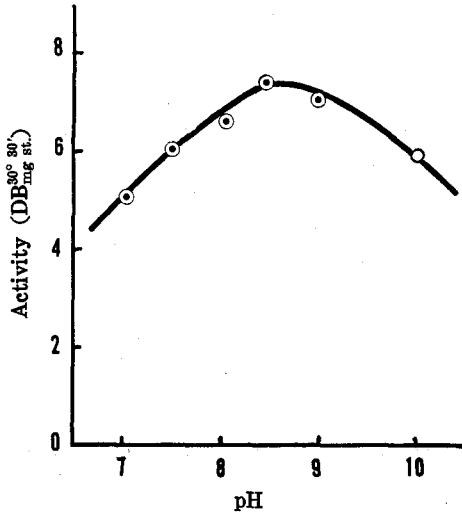


Fig. 2. Relation between pH and activity of partially purified *amylase* of salmon pyloric caeca

Activity was assayed at 30°C for 30 min. on 1% soluble starch

◎: 0.05 M Tris-HCl buffer

○: 0.1 M NaHCO₃-0.1 M Na₂CO₃ buffer

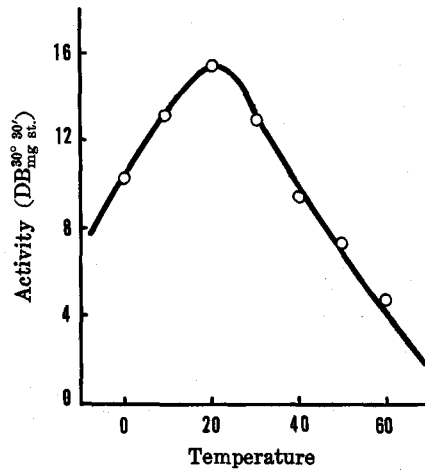


Fig. 3. Relation between temperature and activity of partially purified *amylase* of salmon pyloric caeca

Activity was assayed on 1% soluble starch for 30 min. The buffer was used 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0)

度合の強いコイやアユに比べると弱いものであるが、肉食性のウナギよりも強いことを報告している⁴⁾。著者らは回游中のサケマス類の食性を確かめるために、二三の魚種との *amylase* 活性の比較を行ない、同時に至適 pH および至適温度をも測定した。*amylase* 活性の測定には各消化器管からの 1% 食塩水による抽出液を用い、35°C、至適 pH における酵素活性を blue value 法によって求め、各器管の重量当りの活性度として表した。第 2 表から分るようにシロサケ幽門垂の *amylase* はコイの約 400 分の 1 以下であり、マダラ、イシガレイよりも著しく弱い。したがってシロサケ幽門垂の *amylase* 活性は北御門らの報告⁴⁾ 中のウナギの *amylase* 活性よりも弱い。また至適 pH は測定した魚種では一番アルカリ性であり、至適温度も著しく低い。以上の結果からシロサケ幽門垂の *amylase* は他の魚類と比較すれば非常に弱いものであり、これが稚魚から成魚に成長するに従い徐々に退化して行くものであるかどうかまだ不明であるが、これら酵素量の季節的变化および餌料による変化など外部的环境による適応現象が把握されれば興味ある点が見い出されるかも知れない。

Table 2. Comparison of the *amylase* activities of the extracts from the digestive organs of various kinds of fishes

Enzyme solution was obtained by extracting the digestive organ of each fish with 5 times its weight of 1% NaCl, and diluted with 1% NaCl as required prior to use. Reaction mixtures contained 2 ml of 1% soluble starch, 1 ml of 0.2 M phosphate buffer and 1 ml of enzyme solution. They were incubated at 35°C and respective optimal pH for 30 min., and the activities were measured by the blue value method¹¹⁾.

Fish	Digestive organ	Optimal pH	Optimal temperature °C	Activity DE _{mg st./g} ^{35° 80'} / organ wet wt.
Salmon <i>Oncorhynchus keta</i>	Pyloric caeca	8.5	20	72.8
Carp <i>Cyprinus carpio</i>	Intestine	7.0	35	30,000
Cod <i>Gadus macrocephalus</i>	Pyloric caeca	7.5	45	2,150
Flounder <i>Kareius bicoloratus</i>	Intestine	8.0	35	700

要 約

サケ幽門垂の生物化学的研究の一環として炭水化物分解酵素の研究が行なわれた。

1. シロサケ幽門垂抽出液中に *amylase* および α -glucosidase の存在が確認されたが、 β -glucosidase、 β -fructofuranosidase および cellulase は認められなかった。一方 β -galactosidase はわずかながら認められた。

2. DEAE-セルローズによって部分的に精製された *amylase* の至適 pH は 8.5、至適温度は 20°C であり、熱に非常に不安定である。

3. 他種魚の各消化器管の *amylase* 活性の比はつぎのごとくであった。シロサケ幽門垂: コイ腸: マダラ幽門垂: イシガレイ腸 = 1:411:29.5:9.5

終りに臨み、試料の採集にご協力願った北海道大学練習船北星丸乗組員ならびに調査員各位に感謝します。

文 献

- 1) 大谷武夫・中井甚二郎 (1937). 日水誌 **6**, 45.
- 2) Norris, E. R. & Elam, E. W. (1940). *J. Biol. Chem.* **134**, 443.
- 3) Joseph, A. S. & Ernest, E. L. (1953). *J. Fish. Res. Bd. Canada* **10**, 590.
- 4) 北御門学・立野新光 (1960). 日水誌 **26**, 685.
- 5) Croston, C. B. (1960). *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 202.
- 6) Croston, C. B. & Halver, J. B. (1961). *Federation Proc.* **20**, 241.
- 7) 吉村克二・柴田 猛・牛山 寛 (1964). 北大水産集報 **14**, 262.
- 8) 谷 正二 (1940). 日水誌 **9**, 121.
- 9) 北御門学・立野新光 (1960). 日水誌 **26**, 679.
- 10) 大槻虎男 (1953). 標準生化学実験. 17 p. 東京; 文光堂.
- 11) 萩原文二 (1958). 実験化学講座. **24**, 272 p. 東京; 丸善.
- 12) 吉村克二・柴田 猛・牛山 寛・藤盛 健・佐野好幸 (1963). 昭和 38 年度日本農学大会水産部会講演.