



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	サケのトリプシン類似酵素による $\alpha$ -キモトリプシノーゲンの活性化：第1報 活性化反応の基礎的研究
Author(s)	牛山, 寛; USHIYAMA, Hiroshi; 柴田, 猛 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 18(2), 81-87
Issue Date	1967-08
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/23306">https://hdl.handle.net/2115/23306</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	18(2)_P81-87.pdf



# サケのトリプシン類似酵素による $\alpha$ -キモトリプシノーゲンの活性化

## 第1報 活性化反応の基礎的研究

牛山 寛\*・柴田 猛\*・吉村 克二\*

Studies on the activation of  $\alpha$ -chymotrypsinogen with trypsin-like enzyme from the pyloric caeca of the salmon, *Oncorhynchus keta*.

### I. Fundamental studies in the activation reaction

Hiroshi USHIYAMA, Takeshi SHIBATA and Katsuji YOSHIMURA

#### Abstract

An attempt was made to investigate the activation process of bovine  $\alpha$ -chymotrypsinogen with partially purified trypsin-like enzyme from the pyloric caeca of the salmon, *Oncorhynchus keta*. It was found that the salmon trypsin-like enzyme as bovine trypsin (EC 3.4.4.4.) could activate the zymogen.

With the ratio of salmon trypsin-like enzyme to bovine  $\alpha$ -chymotrypsinogen 1:40, the optimum conditions of the activation were obtained at a temperature of 0–10° C and a pH of 8.0–9.0 (in 0.1 M borate or phosphate buffer).

The activation process was analysed electrophoretically and chromatographically. It was observed that, in the former, the active component formed appeared to be heterogeneous and on the contrary, in the latter, as the activation process proceeded, the zymogen peak gradually decreased and only one active component peak increased.

#### 緒 言

魚類の膵臓には哺乳類と同様に種々な zymogen が存在すると一般に考えられている<sup>1)</sup>。最近, Prah1 等<sup>2,3)</sup> は魚類のうちでも膵臓が充実性である板鰯類のツノザメの膵臓にキモトリプシノーゲン, トリプシノーゲン及びプロカルボキシペプチダーゼ等の存在を報告している。しかし, 大部分の硬骨魚類の膵臓は哺乳類などと異り瀰慢性又は散布性で腸管周囲, 腸間膜, 脾門部及びその周囲, 肝門部及びその周囲に血管を支柱として分布しておくこと<sup>4)</sup>, 存在する zymogen が pH 4 以下では完全に失活すること, 及び通常の稀薄塩溶液による抽出を行なうと操作中に幽門垂や腸液に含まれる活性酵素によって活性化されることなどの困難性のため, 未だその存在が確認されていない<sup>5,6)</sup>。この腸液や幽門垂に含まれている活性酵素には哺乳類のトリプシンに類似する酵素が存在することが知られている<sup>7)</sup>。サケ幽門垂のトリプシン類似酵素はアニオン性蛋白質であること, 基質特異性が低いこと, 及び酸性域で非常に不安定であることなど既知のトリプシンとはいくつかの点で異なっていることが報告されている<sup>8,9)</sup>。

このような基質特異性の低いサケ幽門垂トリプシン類似酵素が既知のトリプシンと同様に  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンに対し局限蛋白分解を行い活性を有する蛋白を生成するか否か大変興味がある。今まで  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンを活性化する酵素が色々な起源から得られている。即ち, その活性化機

\* 北海道大学水産学部生物化学教室  
本報告をサケ幽門垂蛋白分解酵素の研究—第 III 報をす。

構が既に明らかにされている哺乳類のトリプシン<sup>10)</sup>の外、トロンボキナーゼ<sup>11)</sup>、トロンピン<sup>12)</sup>や数種の微生物の産生する蛋白分解酵素<sup>13-16)</sup>によっても活性化されることが報告されている。これらの酵素による zymogen の活性化機構は多少異なるが、起源を異にする酵素によっても活性化されることは興味あるがその中でも微生物の産生する酵素は別として脊椎動物の内です系統発生的にも最も下等な魚類の酵素によって最も高等な哺乳類の zymogen が活性化されるか否か系統発生的にも比較生化学的にも特に興味があるので部分的に精製したサケ幽門垂トリプシン類似酵素により  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンの活性化を試みたところ、殆ど既知のトリプシンと同様に活性化することがわかったのでその結果を報告する。

## 実 験

### 1. 実験材料

$\alpha$ -キモトリプシノーゲン：函館市営と場より分与された新鮮な牛脾臓から Northrop 等の方法<sup>17)</sup>により調製し、硫酸により 6 回再結晶を行い最終的に  $10^{-3}$ M 塩酸に対し透析したのち、凍結乾燥して実験に供した。

サケトリプシン類似酵素：1965 年 6 月中部千島近海で捕獲したシロサケの幽門垂及び脾臓を直ちに凍結して実験室に持ち帰り、著者等の方法<sup>5)</sup>を変法して調製した。即ち、凍結中のシロサケ幽門垂及び脾臓を  $10^{-3}$ M 塩化カルシウム (pH 5.0) で抽出し、抽出液を pH 8.0 に調節したのち、塩析、続いて Duolite A-2 による脱色精製を行った酵素液を  $10^{-3}$ M 塩化カルシウムを含む 0.005M トリシューム塩酸緩衝液 (pH 8.6) に対して透析したのち、凍結乾燥して実験に供した。このように調製したサケトリプシン類似酵素の比活性は萩原の方法<sup>18)</sup>で 0.08 単位の蛋白分解酵素活性を、又合成基質ベンゾイルアルギニンアミド (BAA) を用いた場合には標準法<sup>19)</sup>で 320 単位のトリプシン活性を有した。

又次の市販品を用いた。

トリプシン (2 回再結晶)：Worthington Biochem. Co., カゼイン (acc. to Hammarsten)：和光純薬工業及び Amberlite CG-50: Rohm & Hass Co.

### 2. 実験方法

$\alpha$ -キモトリプシノーゲンの活性化：氷冷下で  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンを 0.1M 硼酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、これに予め同じ緩衝液に溶解したサケトリプシン類似酵素を加えて反応させた。反応液では  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンが 1% 濃度になるように調製した。この反応液より各時間ごとにその一部をとり蛋白分解酵素活性の測定、Tiselius の電気泳動分析及びイオン交換クロマトグラフィーに供した。

蛋白分解酵素作用の測定：ドライアイス-アセトン中で凍結した反応液 (0.2ml) を  $10^{-3}$ M 塩酸で 1000 倍に希釈して、その 1ml について Northrop 等の方法<sup>17)</sup>に基いて酵素活性を測定した。

蛋白質の定量： $\alpha$ -キモトリプシノーゲン及びトリプシンの濃度は 280m $\mu$  における吸光度より  $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 20.0$  を用いて定量した。一方サケトリプシン類似酵素は Lowry の方法<sup>20)</sup>により定量した。

電気泳動<sup>21)</sup>：活性化反応液 (3ml) を N 硫酸で約 pH 3.5 に調節したのち、酢酸緩衝液 (pH 3.65, イオン強度：0.1) に対して 48 時間透析した。この透析液を約 4°C で  $50 \times 15 \times 2$ mm のセルを用いて 8.18volt/cm で 2 時間電気泳動を行った。泳動装置は日立 HIB-2 型を使用した。

イオン交換クロマトグラフィー：Amberlite CG-50 樹脂 (100~200 mesh) を用い Hirs の方法<sup>22)</sup>に基いて行った。即ち、活性化反応液 (2ml) を N 硫酸で約 pH 5.0 に調節し、0.1M クエン酸緩衝液 (pH 5.65) に対して 48 時間透析した。この透析液 1ml を予め同上緩衝液で平衡化した Amberlite CG-50 カラム ( $1 \times 30$  cm) に吸着させ同一緩衝液で溶出し、1ml ずつ分取して蛋白質量及び蛋白分解酵素活性を測定した。

## 結 果

## 1. 活性化反応の至適条件

$\alpha$ -キモトリプシノーゲンの活性化: 氷冷した 0.1M 硼酸緩衝液 (pH 8.0) 中で 6 回再結晶を行った  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンに部分的精製したサケトリプシン類似酵素を種々な割合で添加して活性化を試みた。活性度は結晶トリプシンで rapid activation を行った時に得られる最大活性に対する百分率で示した。Fig. 1 に示されるようにサケトリプシン類似酵素は牛膵臓の  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンを活性化することは明らかである。なお、対照に  $\alpha$ -キモトリプシノーゲン及びサケトリプシン類似酵素のみを単独に incubate した場合には何ら活性の増加は認められなかった。

pH の影響: 次に活性化に及ぼす pH の影響を調べその結果を Fig. 2 に示した。0.1M 硼酸緩衝液を用い zymogen とサケトリプシン類似酵素を 40:1 の割合で反応させた場合、pH 10 では最も速かに活性化が進行するが時間の経過と共に活性の著しい低下が見られた。これは多分アルカリ域での autolysis によるものと推定される。又、pH 8 では pH 9 よりも少し遅くても活性化される以外は両者には余り差が見られなかったが長時間放置した場合には pH 8 の方が比較的安定であった。zymogen を活性化させる場合の至適 pH としては zymogen を局限蛋白分解し、かつ生成された活性酵素が安定である pH が好ましい。従ってサケトリプシン類似酵素の蛋白分解作用の至適 pH<sup>9)</sup> よりアミダーゼ作用の至適 pH<sup>8)</sup> の方が適していると考えられる。なお、この場合使用する緩衝液としてはト

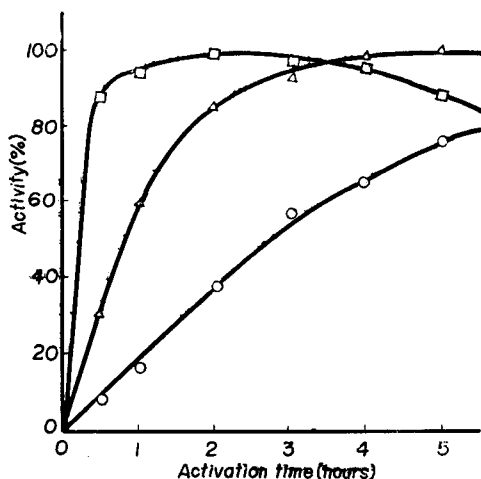


Fig. 1. Activation of  $\alpha$ -chymotrypsinogen with partially purified salmon trypsin-like enzyme

The zymogen concentration was 10mg/ml. The ratios of partially purified salmon trypsin-like enzyme to  $\alpha$ -chymotrypsinogen were (○): 1/100, (△): 1/40 and (□): 1/10 w/w. Activation was carried out in 0.1M borate buffer, pH 8.0, at 0°C. Activity was determined as usual<sup>7)</sup>, and expressed as per cent of the maximum activity obtained in the rapid activation with crystalline bovine trypsin.

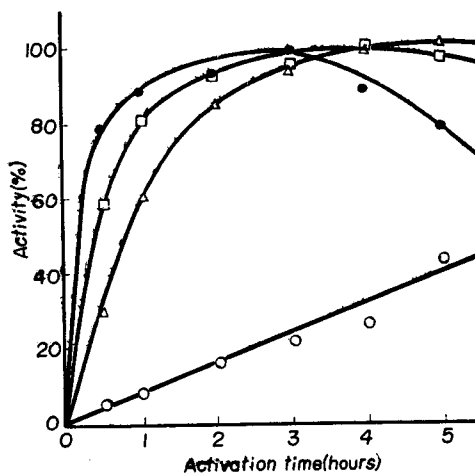


Fig. 2. Effect of pH on the activation

The ratio of salmon trypsin-like enzyme to the zymogen was 1/40 w/w. Activation was carried out at 0°C in 0.1M borate buffer of (○): pH 7, (△): pH 8, (□): pH 9 and (●): pH 10. Other details are as in Fig. 1.

リス緩衝液よりも磷酸緩衝液及び硼酸緩衝液の方が優っていたのでこの実験では後者の緩衝液を使用した。

温度の影響: 次に活性化に及ぼす温度の影響を調べるために 0.1M 硼酸緩衝液 (pH 8.0) に zymogen と サケトリプシン類似酵素を 40:1 の割合で加え、0°, 10°, 20° 及び 35°C で反応させた。Fig. 3 に示されるように 35°C 以上の高温で活性化を行うと 30 分以内に最大活性値 (約 65%) に達するが、その後急速に減少し、生成された活性酵素も殆んど消化され局限蛋白分解は行なわれない。一方 20°C 以下では局限蛋白の分解が認められるが 20°C では長時間反応を行なうと蛋白の消化が認められた。従ってこの実験では 10°C 以下で活性化反応を行うのが望ましい。

## 2. 活性化過程の追跡

電気泳動法による追跡: 活性化過程を明確に知るために、Tiselius の電気泳動法によつて追跡した。0.1M 硼酸緩衝液 (pH 8.0) に zymogen と サケトリプシン類似酵素を

40:1 の割合で加え最終的に zymogen が 1% 濃度になるように調製し、氷冷下で反応を行った。0, 0.5, 1, 3, 6 及び 24 時間の各反応時間ごとにその反応液の一部を取り各々について電気泳動法により分析し、その結果を Fig. 4 に示した。活性化の進行に伴ない  $\alpha$ -キモトリプシノーゲの main peak は少し低くなりそれと同時に main peak より僅かに遅い peak が main peak の肩の部分に現れ、その slow peak は反応 1 時間後、 $\alpha$ -キモトリプシノーゲンの 2/3 が活性化された時が最も明瞭に現れ次第に減少した。しかし活性度が 100% に達した時にでも slow peak の存在が認められた。従って反応

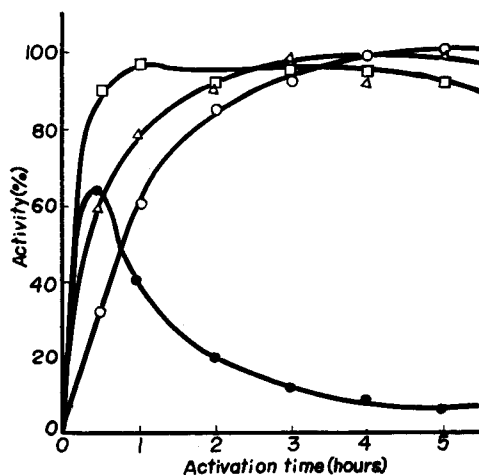


Fig. 3. Effect of temperature on the activation

The ratio of salmon trypsin-like enzyme to the zymogen was 1/40 w/w. Activation was carried out in 0.1M borate buffer, pH 8.0, at (○): 0°, (△): 10°, (□): 20° and (●): 35°. Other details are as in Fig. 1.

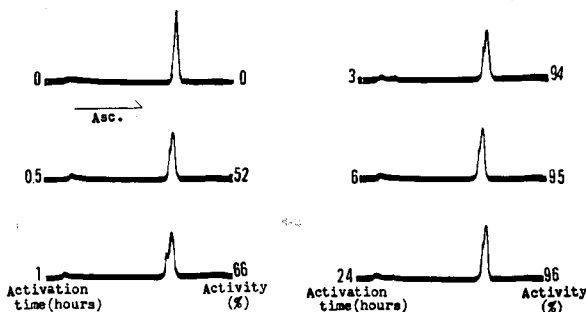


Fig. 4. Electrophoretic pattern changes during the activation process

The activation mixtures containing 1% zymogen and 0.025% salmon trypsin-like enzyme were incubated in 0.1M borate buffer, pH 8.0, at 0°C, 3 ml of the solution was adjusted to pH 3.0, and dialyzed against acetate buffer (pH 3.65, ionic strength: 0.1) and analysed electrophoretically for 7,200 seconds at 8.18 volt/cm.

1時間後の main peak は既に 66% の活性を有しているので peak の大半は何らかの活性の形 (例えば  $\pi$ -キモトリプシン<sup>23)</sup>) に変っているものと思われる。又 slow peak は  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンから  $\alpha$ -キモトリプシンに変る途中の活性を有するある種のキモトリプシン (例えば  $\delta$ -キモトリプシン) であるかも知れない。なお, main peak と slow peak の易動度はそれぞれ  $-5.47 \times 10^{-6}$  及び  $-5.27 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{volt. sec.}$  であった。以上, 電気泳動の結果から生成されたキモトリプシンが単一な物質でなくて, heterogeneous な物質より構成されているものと推定される。

イオン交換クロマトグラフィー: Tiselius 電気泳動法では  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンと活性酵素の peak が重なり活性化機構が不明瞭なためにイオン交換クロマトグラフィーによって活性化過程を追跡した。活性化試料は電気泳動の場合と同様にして調製した。0, 0.5 及び 3 時間の各反応時間ごとにその反応液の一部をとり各々について Amberlite CG-50 カラムによるイオン交換クロマトグラフィーを行った。その結果 Fig. 5 に示されるように活性化が進行するに従い,  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンの peak は減少し,  $\alpha$ -キモトリプシンの溶出位置に新しい蛋白の peak が現れた。活性化がほぼ完了した 3 時間後には  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンの peak は全く認められなかった。一方  $\alpha$ -キモトリプシンの溶出位置に現れた蛋白の peak はキモトリプシン活性を有し蛋白の増加とキモトリプシン活性の増加はほぼ比例した。しかしこの方法では  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンの peak と活性を有する 1 つの peak を分離したのみで活性を有する個々の中間体の確認は出来なかった。

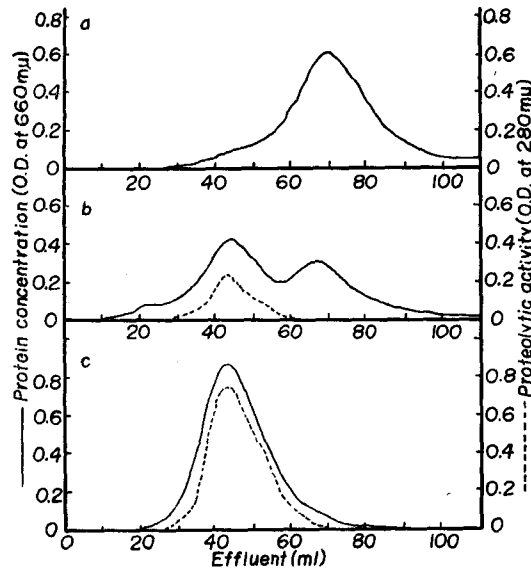


Fig. 5. Chromatographic pattern changes during the activation process

One ml of the activation mixture was analysed chromatographically according to the method of Hirs<sup>23)</sup>. a, b and c are the chromatograms of the activation mixture for 0, 0.5 and 3 hours respectively. Other details are as in Fig. 4.

#### 考 察

サケ幽門垂及び膵臓より部分的に精製したトリプシン類似酵素によって牛膵臓の  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンを活性化することが出来た。この実験に使用した酵素標品を 0.005M トリス緩衝液 (pH 8.6) で平衡化した DEAE-セルロースカラムで分画すると蛋白分解酵素活性を有する区分が 4 ヶ所現れる

が、そのうちトリプシン活性は非吸着区分に 僅か見出しされる以外は、大部分が 0.1~0.3M 食塩溶出区分に見い出された<sup>24)</sup>。この両区分の酵素は共に  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンを活性化することが出来るがその外のサケ幽門垂及び 隣臓中の蛋白分解酵素活性を有する区分では活性化することが出来なかった。サケ幽門垂及び隣臓中に存在する 2 種類のトリプシン類似酵素のうちカチオニックな酵素 (非吸着区分) はアニオニックな酵素 (吸着区分) に比べて量的に非常に少なく  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンを活性化した場合最大活性値は約 50% にしか至らなかった。しかしアニオニックな酵素は完全に活性化することが出来た。アニオニックなトリプシン類似酵素は今までサケ、ツノザメ<sup>25)</sup> 及びネズミ<sup>26)</sup> しか見い出されていないが、この実験において  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンの活性化に関与した酵素は以上の理由から大部分がアニオニックなトリプシン類似酵素によるものと考えられる。又 Tiselius の電気泳動図において最後まで残っていた slow peak はカチオニックなトリプシン類似酵素によって生成された別のキモトリプシンであるかも知れない。サケ幽門垂及び隣臓中に存在する 2 種類のトリプシン類似酵素 (或は 3 種類……アニオニックなトリプシン類似酵素は更に 2 成分に分れる<sup>26)</sup>) の比較は目下研究中である。

$\alpha$ -キモトリプシノーゲンを活性化する場合には slow activation と rapid activation との 2 方法<sup>27)</sup> があり、それぞれ別の機作によって活性化され  $\alpha$ -キモトリプシンが生成されることが知られているが、この実験では slow activation を行うと活性度が 100% に達しないため rapid activation 法を用いた。既知のトリプシンによって rapid activation を行った場合先ず比活性の高い  $\pi$ -キモトリプシンが生成され、続いて少し比活性の低い  $\delta$ -キモトリプシンが生成されることが知られているが、サケトリプシン類似酵素による場合にも活性度が最大値に達した後少し減少して平衡状態を保つこと及び  $\alpha$ -キモトリプシンの阻害剤である  $\beta$ -フェニールプロピオン酸<sup>28)</sup> の存在下で活性化が進行することから  $\pi$ -キモトリプシンの段階を経て活性化されるものと推定されるが Tiselius の電気泳動法及びイオン交換クロマトグラフィー法では活性化機構の詳細はわからなかった。なお、イオン交換クロマトグラフィーと電気泳動の結果の差異についての詳細は不明である。

そこで活性化の際切断されるペプチド結合の検索を DNP 法によって追跡した結果、活性の発現に比例して DNP イソロイシンの生成が認められ、一方カルボキシペプチダーゼ B による C 末端の検索の結果アルギニンが認められたことからサケトリプシン類似酵素の場合も既知のトリプシンと同様アルギニン-イソロイシンのペプチド結合の切断が活性発現に関係すると考えられるが詳細は目下研究中である。

## 要 約

1. サケ幽門垂及び隣臓より部分的精製したトリプシン類似酵素によって牛の  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンの活性化を試みた結果、哺乳類トリプシンとほぼ同様に活性化した。
2. 活性化反応の至適条件は  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンに対してサケトリプシン類似酵素を 1/40 量加えた場合、0°~10°C で 0.1M 硼酸或は磷酸緩衝液 (pH 8.0~9.0) 中で活性化した場合に得られた。
3. 活性化過程を Tiselius の電気泳動法及び Amberlite CG-50 によるイオン交換クロマトグラフィーによって追跡した結果、前者では活性化生成物が heterogeneous であることを示したが、後者では zymogen の peak の減少につれて新たに活性を有する 1 つの peak が現れた。

本研究に当り、御助言と御校閲を賜った北海道大学水産学部斎藤恒行教授、ならびにサケ幽門垂の採集に御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深甚なる謝意を表する。

## 文 献

- 1) 例えば Barrington, E. J. W. (1957) in "The physiology of fishes" (Brown M. E. ed) 1, 136 P. New york; Academic Press.

- 2) Prahl, J. W. & Neurath, H. (1966) *Biochemistry* **5**, 2131.
- 3) ————— (1966) *ibid* **5**, 4137.
- 4) 未広恭雄 (1951) 魚類学 62 P 東京; 岩波書店.
- 5) 吉村克二, 柴田 猛, 牛山 寛 (1964) 北大水産彙報 **14**, 262.
- 6) Crostone, C. B. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 202.
- 7) 大島幸吉 (1940) 酵素化学工業全集 **17** 水産動物酵素化学 58 P. 東京; 厚生閣.
- 8) 吉村克二, 柴田 猛, 牛山 寛 (1964) 昭和39年度日本水産学会秋季大会講演.
- 9) Crostone, C. B. (1965) *Arch. Biochem. Biophys.* **112**, 218.
- 10) 例えば Desnuelle, P. (1960) in "The enzymes" (Boyer, P. D. et al ed.) **4**, 93 P. New York; Academic Press.
- 11) Milston, J. H. & Milstone, V. K. (1964) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **117**, 290.
- 12) Engel, A & Alexander, B. (1966) *Biochemistry* **5**, 3590.
- 13) Bronfenbrenner, A. Linderström-Lang, K & Ottesen, M. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 408.
- 14) Gabeloteau, C. & Desnuelle, P. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 230.
- 15) Awad, W. M. & Wilcox, P. E. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 285.
- 16) Hashizume, H. & Imahori, K. (1964) *J. Biochem.* **56**, 128.
- 17) Northrop, J. H., Kunitz, M. & Herriott, R. M. (1952) in "Crystalline enzymes 262 P. New York; Columbia Univ. Press.
- 18) 萩原文二 (1952) 標準生化学実験 207 P. 東京; 文光堂.
- 19) 田宮信雄訳 (1963) 酵素名・酵素反応記号一覧 7 P. 東京; 共立出版.
- 20) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. chem.* **193**, 265.
- 21) Sakota, N. (1954) *J. Biochem.* **41**, 797.
- 22) Hirs, H. W. (1955) *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5743.
- 23) Bettelheim, F. R. & Neurath, H. (1955) *J. Biol. Chem.* **212**, 241.
- 24) 吉村克二, 柴田 猛, 牛山 寛, 久保田宏明 (1965) 昭和40年度日本農学大会水産部会講演.
- 25) Marchis-Mouren, G., Paséro, L. & Desnuelle, P. (1963) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **13**, 262.
- 26) 吉村克二, 柴田 猛, 牛山 寛 (1964) 昭和39年度日本農学大会水産部会講演.
- 27) 赤堀四郎, 迫田直一, 岡田吉美 (1956) 蛋白質・核酸・酵素 **1**, 14.