



Title	サケ幽門垂蛋白分解酵素の研究：第2報 トリプシン類似酵素の精製とその性質
Author(s)	牛山, 寛; USHIYAMA, Hiroshi
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 19(2), 147-155
Issue Date	1968-08
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/23357">https://hdl.handle.net/2115/23357</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	19(2)_P147-155.pdf



# サケ幽門垂蛋白分解酵素の研究

## 第2報 トリプシン類似酵素の精製とその性質\*

牛 山 寛\*\*

### Studies on the Proteolytic Enzymes of the Salmon Pyloric Caeca

#### II. Purification and some properties of trypsin-like enzymes

Hiroshi USHIYAMA

#### Abstract

Two proteolytic enzymes hydrolyzing benzoyl-L-arginineamide (BAA) to benzoyl-L-arginine and ammonia were obtained from the pyloric caeca of the salmon, *Oncorhynchus keta*, by following procedure: (1) extraction at pH 5.0, (2) autocatalytic activation at pH 8.0~8.5, (3) fractionation with ammonium sulphate, (4) decolorization with Duolite A-2 and (5) chromatography on DEAE-cellulose. These enzymes were designated as salmon trypsin-like enzyme 1 and 2 (ST<sub>1</sub> and ST<sub>2</sub>), and purified about 25 and 16 fold respectively.

With the electrophoresis on cellulose acetate strips (Separax), ST<sub>1</sub> migrated at pH 8.6 toward the cathode at a slower rate than bovine  $\alpha$ -chymotrypsin and trypsin.

Both enzymes were unstable below pH 5.5 at 35°C. ST<sub>1</sub> and ST<sub>2</sub> exhibited maximum activity at pH 8.2 and 8.5, and were unstable at a temperature above 40 and 30°C. Michaelis constant was 1.57 and 1.45 mM for BAA. Both enzymes were slightly activated by Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> and some reducing agents, but strongly inhibited by Cu<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> and Hg<sup>2+</sup>, and practically unaffected by EDTA and PCMB.

In experiments with the natural trypsin inhibitors, soybean trypsin inhibitor (12  $\mu$ g/ml) inhibited ST<sub>1</sub> and ST<sub>2</sub> to the extent of 95 and 77%, and ovomucoid (3  $\mu$ g/ml), 97 and 77% respectively. From these results, it was concluded that the enzymes were a proteinase of the trypsin type.

#### 結 言

牛スイ液中の蛋白分解酵素の Zymogen としてキモトリプシノーゲン A 及び B, トリプシノーゲン, プロカルボキシペプチダーゼ A 及び B が含まれることが Keller ら<sup>1)</sup> によって研究されて以来, 同じ方法を用いて多くの哺乳類<sup>2),3),4)</sup>, 鳥類<sup>5),6)</sup> 及び板鰓類<sup>7),8)</sup> のスイ臓中の蛋白分解酵素に関する研究が行なわれて来た。これらの研究によると動物の種類によりキモトリプシノーゲンとして cationic な A しか含まないものや, また逆に anionic な B しか含まないものも存在し比較生化学上非常に興味がある。

\* 本報告は 1964 年 4 月 2 日 日本農学大会水産部会 (於東水大) で講演発表した。

\*\* 北海道大学水産学部生物化学講座 (著者は昭和 43 年 6 月 10 日急逝されたが, 本論文原稿は同年 5 月 28 日に受理されていたものである。)

(Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

最近, Prahl<sup>7)</sup>はスイ臓が充実性であるツノザメのスイ臓にも哺乳類に存在するすべての Zymogen が存在することを報告している。

大部分の硬骨魚類のスイ臓は幽門垂の周囲などに散布しているために、この方面の研究は他の脊椎動物より相当遅れている。今まで硬骨魚類幽門垂の蛋白分解酵素はその最適 pH が 9 附近<sup>9)</sup>にあることからトリプシン類似酵素が存在していると考えられていた。斗ヶ沢ら<sup>10), 11)</sup>はマグロ及びカツヲ幽門垂からある種の蛋白分解酵素を結晶状に分離することに成功したがこれらの酵素の性質については報告されていない。最近, Crostone ら<sup>12), 13)</sup>はマスノスケ幽門垂の蛋白分解酵素の研究を行ない合成基質を用いて、トリプシン及びキモトリプシン活性を有する酵素の存在とそれらのいくつかの性質について報告している。しかし、硬骨魚類幽門垂にどのような蛋白分解酵素が含まれ、どのような性質を有するかについては殆ど研究されていない。そこで著者はこれらの目的のためにシロサケ幽門垂を用い、存在する蛋白分解酵素を分離精製した結果、牛トリプトシンとは等電点の大きく異なる2種のトリプシン類似酵素を分離したのでこの結果を報告する。

## 実 験

### 1. 材 料

実験試料は1963年6月中部千島南方海域で北海道大学練習船北星丸が捕獲したシロサケ幽門垂(スイ臓を含む。以下同じ)を使用した。捕獲後直ちに海水で洗滌し、急速凍結を行ない実験室に持ち帰り、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下のフリーザー中に貯蔵して実験に供した。大豆トリプシンインヒビターは脱脂大豆粉末より Kuniz の方法<sup>14)</sup>により、またオボムコイドは新鮮な鶏卵より Lineweaver の方法<sup>15)</sup>によりそれぞれ当教室で調製したものを使用した。

基質として次の市販品を使用した。

カゼイン……acc. to Hammarstem (和光純薬 KK), BAA (Nutritional Biochem, Corp) 及び ATEE (Sigma Chem., Co.)

また次の市販の牛スイ臓酵素標品を標準品として使用した。

トリプシン及び $\alpha$ -キモトリプシン (Worthington Biochem, Corp.), カルボキシペプチダーゼ A (Sigma Chem., Co.)

### 2. 蛋白濃度の測定

酵素液に等量の10%トリクロール酢酸を加え、生じた沈澱を0.1N NaOHに溶解してLowryらの方法<sup>16)</sup>に基いて測定した。標準蛋白質としては牛血清アルブミン FrV (Armour Lab.)を使用した。

### 3. 酵素活性の測定

蛋白分解酵素活性は前報<sup>17)</sup>同様に測定した。トリプシン活性はBAAを基質としてニンヒドリン法<sup>18)</sup>で測定した。即ち0.05M BAA (pH 8.0) 0.3mlと等量の酵素液を含む混合液を $35^{\circ}\text{C}$ で反応せしめ、20分後、そのうちから0.2mlを採り、生成したアンモニヤをニンヒドリン法で測定し1分間に $1\mu\text{mole}$ の基質を分解する時の酵素活性を1単位とした。また、キモトリプシン活性は1mM ATEEを基質とし Schwert らの方法<sup>19)</sup>に基いて測定した。

### 4. DEAE-セルロースクロマトグラフィー

DEAE-セルロースイオン交換体は米国 Brown 社製を使用した。微粒子を除いた後0.5M NaOH+

本報告においては次の略語を使用する。

ST<sub>1</sub>, Salmon trypsin-like enzyme 1

ST<sub>2</sub>, Salmon trypsin-like enzyme 2

BAA, benzoyl-L-arginine amide

ATEE,  $\alpha$ -N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester

0.25M NaCl の混液, 水, 0.1M HCl, 水及び 0.5M NaOH+0.25M NaCl 混液の順に洗滌して最終的に 0.001M  $\text{CaCl}_2$  を含む 0.005M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8) で平衡化して実験に供した。

#### 5. セルロースアセテート膜電気泳動

市販のセルロースアセテート膜 (Separax...常光産業 KK 製) を使用し, 小川の方法<sup>20)</sup> に基づいて 0.07M Veronal 緩衝液 (pH 8.6) を使用し, 0.5mA/cm, 60 分泳動を行ないボンソー 3R で染色を行なった。

### 実 験 結 果

#### 1. トリブシン類似酵素の精製

凍結中のサケ幽門垂 (1kg) を肉挽器で磨細し, 31 の 0.001M  $\text{CaCl}_2$  に懸濁し, 溶液を攪拌しながら 5N- $\text{H}_2\text{SO}_4$  を滴下して pH 5.0 に調節し, 一夜冷室に放置後濾過した。濾液を 5N NaOH で pH 8.0~8.5 に調節して酵素の活性化を行なうと共に生じた沈澱を濾別した。濾液を硫酸で塩折し, 硫酸濃度 35~60% 飽和沈澱区分を集め前報<sup>16)</sup> に従い Duolite A-2 カラムを通過させ脱色精製した。更に塩折及び脱色を繰り返し行ない最終的に塩折物を 0.001M  $\text{CaCl}_2$  に溶解し, 0.001M  $\text{CaCl}_2$  を含む 0.005M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8) に透折した。透折物も予め前述の緩衝液で平衡化した DEAE-セルロースカラム ( $\phi 2 \times 45\text{cm}$ ) に吸着させた。非吸着区分が流出したのち, Fig. 1 に示すような NaCl による濃度勾配法で吸着蛋白の溶出を行なった。

非吸着区分には全体の約半分の蛋白分解酵素が流出し, それらはキモトリブシンの基質である ATEE を分解したがトリブシンの基質である BAA は殆んど分解しなかった。一方吸着区分からは Fig. 1 に示すように BAA 分解作用を有する 2 つの Fraction が溶出された。そこでこれらトリブシン活性を有する Fraction のうち先に溶出する酵素をサケトリブシン類似酵素 1 (ST<sub>1</sub>) 及び後に溶出する酵素を ST<sub>2</sub> と命名した。

Table 1 は精製各段階での比活性と収量を示した。この表で粗抽出液を pH 8.0~8.5 に調節して蛋白分解酵素の活性化を行なった場合にカゼイン分解酵素は約 2 倍に上昇しているが, BAA 分解作用

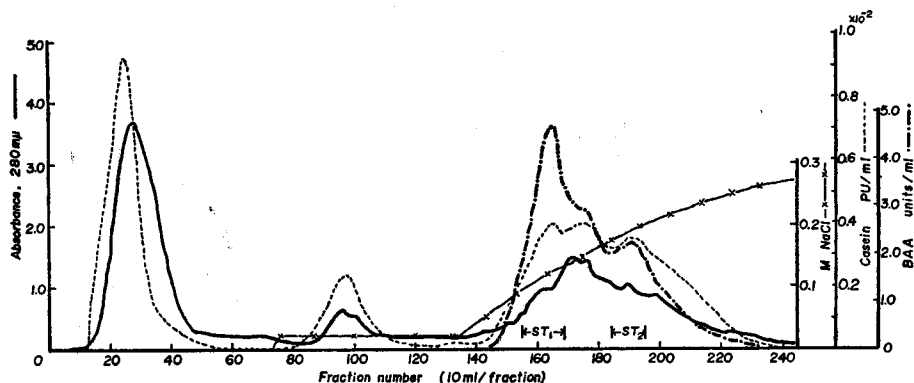


Fig. 1. Chromatography on DEAE-cellulose of crude proteolytic enzyme preparation from salmon pyloric caeca

The crude proteolytic enzymes (754.9 mg protein) prepared from salmon pyloric caeca (one kg) were applied to the column ( $\phi 2 \times 45\text{ cm}$ ) equilibrated with 0.005 M Tris-HCl buffer (pH 8.8) containing 0.001 M  $\text{CaCl}_2$ . A logarithmic gradient from 0.02 to 0.35 M NaCl was applied for elution of the protein. Fractions within the horizontal arrow were combined, rechromatographed on DEAE-cellulose and used throughout the following experiments.

Table 1. Summary of the purification process of the trypsin-like enzymes from salmon pyloric caeca

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity		Total units		Yield (%)	
			units/mg casein*	protein BAA**	casein*	BAA**	casein	BAA
Crude extract at pH 5.0 from one kg sample	3230	8.50	$\times 10^{-3}$ 0.38	0.18	10.5	5,040	—	—
Filtrate at pH 8.0	3220	1.62	3.86	0.41	20.1	2,126	100	100
Dialyzed solution	112	6.74	9.78	2.01	7.40	1,494	37	71
DEAE-cellulose (ST <sub>1</sub> )	160	0.46	7.26	4.56	0.54	340	2.7	16
" (ST <sub>2</sub> )	130	0.47	7.30	2.91	0.45	179	2.2	8.5

\* A unit is defined as a micromole tyrosine liberated per minute at pH 8.7, 35°C.

\*\* A unit is defined as a micromole BAA hydrolyzed per minute at pH 8.0, 35°C.

は逆に半分以下に減少していることがわかるが、この原因としてはサケトリプシン類似酵素がこのアルカリ域では充分に安定であるので、アミダーゼ作用を有する他の酵素でアルカリ処理により変性したためと考えられる。従って粗酵素液中の BAA 分解作用にはトリプシン類似酵素とは別の酵素が混合しているために見かけ上高い活性が示されたと考えられるので pH 8 に調節した粗酵素液の活性を本酵素精製の際の収率の基準とした。

Fig. 1 の DEAE-セルロースクロマトグラムにおいて水平の矢印で示した区分を集めて以下の実験に供したが、それぞれの区分は粗酵素液 (pH 8.0) 中のトリプシン活性の ST<sub>1</sub> では 16% 及び ST<sub>2</sub> では 8.5% の活性を有した。また、以上の操作によってトリプシン活性は ST<sub>1</sub> では 25 倍、ST<sub>2</sub> では 16 倍それぞれ活性が増加した。

## 2. 酵素の性質

Fig. 1 の DEAE-セルロースクロマトグラムの水平の矢印の区分を集め凍結乾燥して DEAE セルロースカラムにより再クロマトグラフィーを行なって以下の実験に供した。

### 電気泳動

精製されたサケトリプシン類似酵素 1 (ST<sub>1</sub>) についてセルロースアセテート膜を支持媒体として通電クロマトグラフィーを行ないその結果を Fig. 2 に示した。ST<sub>1</sub> はこの泳動条件下では陰極側に移動し、ほぼ単一の band を示した。また、易動度は対照として用いた牛トリプシンよりも小さく、牛カルボキシペプチダーゼ A と牛  $\alpha$ -キモトリプシンの中間の性質を示した。

### pH の影響

リン酸緩衝液及び硼酸緩衝液を用いて ST<sub>1</sub> 及び ST<sub>2</sub> の BAA 分解作用に及ぼす pH の影響を測定し、その結果を Fig. 3 に示した。ST<sub>1</sub> では pH 8.2 附近に、また ST<sub>2</sub> では pH 8.5 附近の最大活性が示され ST<sub>2</sub> では pH 11 でもなお高い活性を示した。一方カゼインを基質とする場合には pH 9.0~10.0 の間に最大活性が示された。また別に行なった pH に対する安定性の実験で各 pH, 35°C, 60 分 preincubation した場合、ST<sub>1</sub> は pH pH7.0~9.0 の間で、また ST<sub>2</sub> は 7.0~9.5 の間で最も安定であったが pH 5.5 以下では両者とも急激に失活した。

### 温度の影響

酵素液 (pH 8.8) を 10~70°C の各温度で 60 分 preincubation して残存する活性を測定し Fig. 4 に示した。ST<sub>1</sub> は 40°C まで安定であるが ST<sub>2</sub> は 30°C 以上で徐々に失活し、両酵素とも 50°C 以

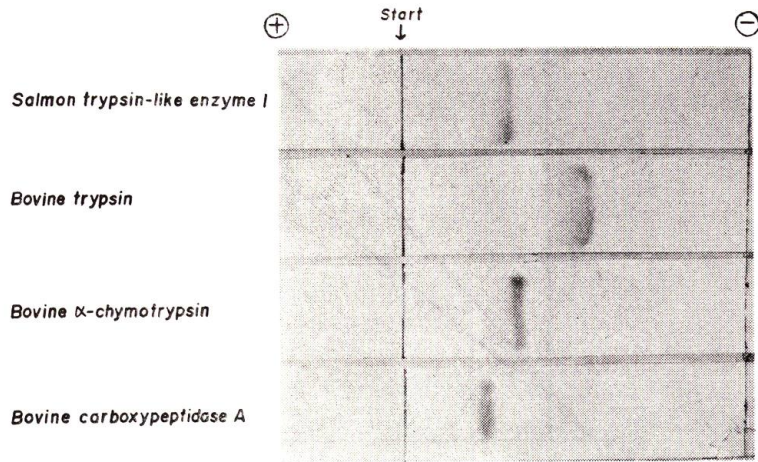


Fig. 2. Cellulose acetate electrophoretic pattern of salmon trypsin-like enzyme 1. Electrophoresis was carried out at pH 8.6, veronal buffer ( $\mu=0.07$ ), 0.5 mA/cm, for 60 minutes.

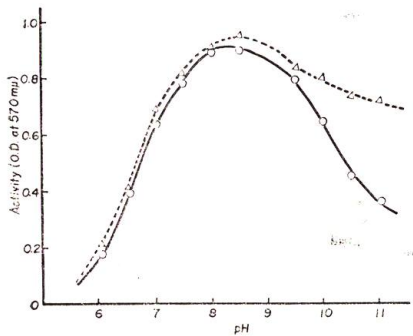


Fig. 3. Activity-pH curves of salmon trypsin-like enzymes

Enzyme activity was assayed for 0.025 M BAA in buffer as follows: phosphate buffer, from pH 6.0 to 8.5; Borax- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  buffer, from pH 9.5 to 11.0.

○,  $\text{ST}_1$ ; △,  $\text{ST}_2$

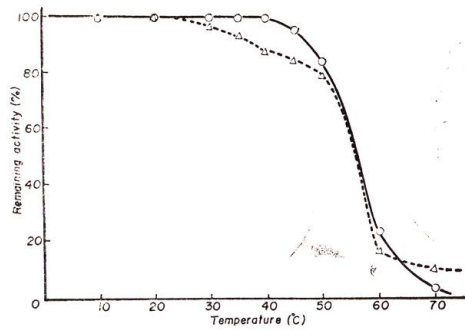


Fig. 4. Stability-temperature curves of salmon trypsin-like enzymes

Enzyme was preincubated in 0.05M borate buffer (pH 8.5) at various temperature for 60 minutes, and then the remaining activity was assayed for 0.05 M BAA.

○,  $\text{ST}_1$ ; △,  $\text{ST}_2$

上では急激に失活した。また別に 20 分反応における至適温度を測定した結果  $\text{ST}_1$  では約  $50^\circ\text{C}$ ,  $\text{ST}_2$  では  $45^\circ\text{C}$  で最大活性を示した。

基質濃度の影響

$\text{ST}_1$  及び  $\text{ST}_2$  による BAA 加水分解速度に及ぼす基質濃度の効果を調べ Lineweaver Burk plot を行ない Fig. 5 に示した。Km は  $\text{ST}_1$  が  $1.57\text{mM}$ ,  $\text{ST}_2$  が  $1.49\text{mM}$  であった。

活性化剤及び阻害剤の影響

サケトリプシン類似酵素に及ぼす種々の金属イオン及びその他の活性化剤及び阻害剤の影響を調べる

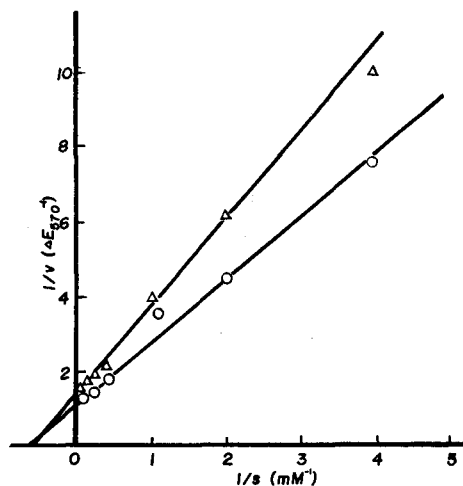


Fig. 5. Effect of substrate concentration on BAA hydrolysis by salmon trypsin-like enzymes  
○, ST<sub>1</sub>; △, ST<sub>2</sub>

ために酵素を各化合物と 35°C で 10 分 preincubation したのち残存する酵素活性を BAA を用いて測定した。

金属イオンの影響は Table 2 に示されるように Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 及び Ba<sup>2+</sup> によって多少活性化されるのみで著しい効果は認められなかったが, Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup> 及び Hg<sup>2+</sup> などの重金属イオンによっては著しく阻害された。

Table 2. Effect of metal ions on salmon trypsin-like enzymes

Metal ion*	Relative activity (%)	
	ST <sub>1</sub>	ST <sub>2</sub>
no addition	100	100
Mg <sup>2+</sup> (MgSO <sub>4</sub> )	112	110
Ca <sup>2+</sup> (CaCl <sub>2</sub> )	121	106
Ba <sup>2+</sup> (BaCl <sub>2</sub> )	113	105
Mn <sup>2+</sup> (MnCl <sub>2</sub> )	119	108
Fe <sup>2+</sup> (FeSO <sub>4</sub> )	83	57
Fe <sup>3+</sup> (FeCl <sub>3</sub> )	39	41
Co <sup>2+</sup> (CoCl <sub>2</sub> )	99	87
Ni <sup>2+</sup> (NiSO <sub>4</sub> )	94	59
Cu <sup>+</sup> (Cu <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	37	22
Cu <sup>2+</sup> (CuCl <sub>2</sub> )	16	27
Ag <sup>+</sup> (AgNO <sub>3</sub> )	22	21
Zn <sup>2+</sup> (ZnCl <sub>2</sub> )	72	54
Hg <sup>2+</sup> (HgCl <sub>2</sub> )	3	2

\* Final concentration was 10<sup>-3</sup>M.

Enzyme was preincubated with metal ion in 0.005 M Tris-HCl buffer (pH 8.8) at 35°C for 10 minutes, and then the remaining activity was assayed for 0.05 M BAA.

Table 3. Effect of activators and inhibitors on salmon trypsin-like enzymes

Compound*	Relative activity (%)	
	ST <sub>1</sub>	ST <sub>2</sub>
no addition	100	100
L-Ascorbic acid	115	104
L-Cysteine	105	117
Glutathione	114	105
Potassium ferricyanide	95	93
EDTA	81	90
PCMB	83	72
Iodoacetic acid	96	100

\* Final concentration was  $10^{-3}$ M.

Enzymes was preincubated with activator or inhibitor. Other conditions were the same as in Table 2.

Table 3 はその他活性化剤及び阻害剤の効果を示した。EDTA により僅かに活性が減少し、これらの酵素活性の完全発現のためにはいくらかの金属イオンが必要と思われる。一方、SH 酵素の阻害剤である PCMB やモノヨード酢酸によって僅かに活性が減少するが、還元剤や SH 化合物の添加により著しい効果が見られないこと、及びフェリシアン化カリのような酸化剤によっても僅かしか失活しないことから、これらの酵素は SH 酵素のグループには属しないことがわかった。

次に天然のトリプシン阻害物である大豆トリプシン阻害剤及びオボムコイドの ST<sub>1</sub> 及び ST<sub>2</sub> に及ぼす影響を調べ Fig. 5 及び Fig. 6 に示した。大豆阻害剤の場合には  $12\mu\text{g/ml}$  の濃度で ST<sub>1</sub> は

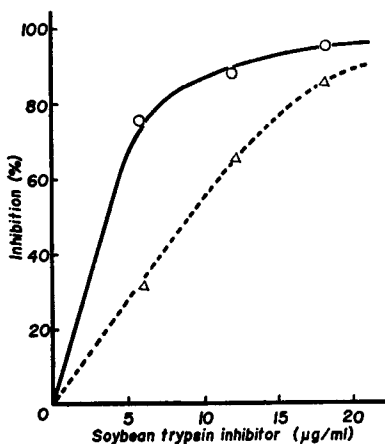


Fig. 6. Effect of soybean trypsin inhibitor on salmon trypsin-like enzymes

Enzyme was preincubated with the desired amount of soybean trypsin inhibitor. Other conditions were the same as in Table 2.

○, ST<sub>1</sub>; △, ST<sub>2</sub>

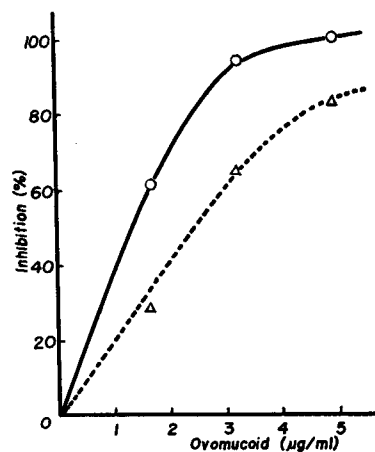


Fig. 7. Effect of ovomucoid on salmon trypsin-like enzymes

Enzyme was preincubated with the desired amount of ovomucoid. Other conditions were the same as in Table 2.

○, ST<sub>1</sub>; △, ST<sub>2</sub>

95%, ST<sub>2</sub> は 77% 阻害され, オボムコイドの場合には 3 $\mu$ g/ml の濃度で ST<sub>1</sub> は 97%, ST<sub>2</sub> は 77% 阻害されトリプシン型酵素の性質を示した。

### 考 察

サケ幽門垂の水抽出液から調製した粗酵素液を DEAE-セルロースに吸着させ, 食塩による濃度勾配溶出法により分画したところ, 2 種類のトリプシン類似酵素を分離することが出来た。既知の哺乳類トリプシンは通常 DEAE-セルロースには吸着されず素通り区分に溶出されることが知られている<sup>1)</sup> のでこの DEAE-セルロースクロマトグラフィーの態度からサケのトリプシン類似酵素は牛トリプシンと異なり弱酸性蛋白の性質を有すると推定されるが, Fig. 2 の Separax での泳動距離から判断すると牛トリプシン<sup>2)</sup> より等電点が低く, また牛  $\alpha$ -キモトリプシン<sup>2)</sup> とカルボキシペプチターゼ A<sup>2)</sup> のほぼ中間程度の等電点, 即ち pH 7 附近に等電点を有するものと推定される。牛トリプシンを始め大部分の哺乳類のトリプシンは等電点が pH 10 以上の塩基性蛋白であるに対しネズミ<sup>3)</sup>, サケ<sup>15)</sup> 及びツノザメ<sup>7)</sup> には中性或は弱酸性のトリプシンが存在することは大変興味がある。Prah<sup>1)</sup> ら<sup>7)</sup> がツノザメのキモトリプシノーゲン A の所で述べているようにトリプシンにも “*primeral trypsin*” が存在し, それは多分酸性蛋白質であり進化の途中に徐々に塩基性蛋白質に変化して行ったのかも知れない。これらの関連はサケトリプシン類似酵素のアミノ酸構成を調べ比較することにより明らかとなるであろう。

DEAE-セルロースクロマトグラフィーにおいてカチオン区分には主として ATEE を分解するキモトリプシンが含まれ, カルボキシペプチターゼ A は非吸着区分と吸着区分の両方に見い出されたがこれらの結果は別に報告する予定である。

得られた 2 種のサケトリプシン類似酵素は牛トリプシンと異なり酸性溶液で非常に不安定で, アルカリ溶液中では安定であった。また熱安定性も牛トリプシンより低く水棲動物の特色を示した。BAA に対する至適 pH は牛トリプシン<sup>2)</sup> より僅かにアルカリ側に傾いていた。しかし天然のトリプシン阻害剤により顕著に阻害されることなどから本酵素はトリプシン型酵素であると考えた。

ST<sub>1</sub> と ST<sub>2</sub> との間には著しい差は認められなかったが ST<sub>2</sub> は ST<sub>1</sub> に比べ等電点がいく分酸性側に傾き, 熱安定性も僅かに低かった。天然トリプシン阻害剤に対する態度では ST<sub>1</sub> は ST<sub>2</sub> よりも著しく阻害された。

以上の如く 1 種類の動物中に 2 種類のトリプシンが存在することが判明したが, このような事実は未だ報告されて居ない。そこでこのうち 1 種はトリプシノーゲンからの活性化中間体であるか, または本質的に 2 種類のトリプシノーゲンが存在するか否かは今後の課題である。

### 要 約

シロサケ幽門垂の水抽出液 (pH 5.0) を pH 8.0~8.5 に調節し, 硫酸塩析, Duolite A-2 による脱色及び DEAE-セルロースクロマトグラフィーにより 2 種類のトリプシン類似酵素を分離精製し, それぞれサケトリプシン類似酵素 1(ST<sub>1</sub>) 及び 2(ST<sub>2</sub>) と命名した。比活性はそれぞれ 25 倍及び 16 倍増加した。

精製された ST<sub>1</sub> は pH 8.6 のセルロースアセテート膜電気泳動で牛トリプシン及び  $\alpha$ -キモトリプシンよりも遅く陰極側に泳動した。

ST<sub>1</sub> 及び ST<sub>2</sub> は 35°C で pH 5.5 以下では非常に不安定であり, 至適 pH は ST<sub>1</sub> では pH 8.2, ST<sub>2</sub> では pH 8.5 附近であった。また ST<sub>1</sub> は 40°C 以上で, ST<sub>2</sub> は 30°C 以上で不安定であった。両酵素とも Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> 及び還元剤により僅かに活性化されたが Cu<sup>2+</sup>, Ag<sup>2+</sup> 及び Hg<sup>2+</sup> により著しく阻害された。一方 EDTA や PCMB は著しい効果を示さなかった。

大豆トリプシン阻害剤及びオボムコイドにより両酵素とも顕著に阻害された。

以上の結果から本酵素はトリプシン型酵素であると思われる。

本研究を行うに当り御指導していただいた北海道大学水産学部吉村克二名誉教授，斎藤恒行教授，柴田猛助教授，ならびにサケ幽門垂の採集に御協力いただいた北海道大学練習船北星丸乗組員ならびに調査団各位に深く感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Keller, P. J., Cohen, E. & Neurath, H. (1958). *J. Biol. Chem.* **230**, 905.
- 2) Marchis-Moven, G., Charles, M., Ben Abdeljlil, A. & Desnuelle, P. (1961). *Biochim. Biophys. Acta.* **50**, 186.
- 3) ———, Paséro, L. & Desnuelle, P. (1963). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **13**, 262.
- 4) Matsuoka Y. & Koide, A. (1966). *Arch. Biochem. Biophys.* **114**, 422.
- 5) Rayan, C. A. (1965). *ibid.* **110**, 169.
- 6) ———, & Clary, J. J. & Tomimatsu, Y. (1965). *ibid.* **110**, 175.
- 7) Prahl, J. W. & Neurath, H. (1966). *Biochemistry.* **5**, 2131.
- 8) ———. (1966). *ibid.* **5**, 4137.
- 9) 例えば 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.
- 10) 斗ヶ沢宜久・勝又悌三 (1959). 日水誌 **25**, 122.
- 11) ———. (1959). 同誌 **25**, 470.
- 12) Crostone, C. B. & Halver, J. E. (1961). *Fed. Proc.* **21**, 241a.
- 13) ——— (1965). *Arch. Biochem. Biophys.* **112**, 218.
- 14) Kunitz, M. (1946). *J. Gen. Physiol.* **29**, 149.
- 15) Lineweaver, H. & Murray, C. W. (1947). *J. Biol. Chem.* **171**, 565.
- 16) Lowry, H., Rosebrough, N. J., Farr, A. C. & Randall, R. J. (1951). *ibid.* **193**, 265.
- 17) 吉村克二・柴田 猛・牛山 寛 (1964). 北大水産彙報 **14**, 262.
- 18) 山崎 誠 (1958). 実験化学講座 **24**, 318P. 東京; 丸善.
- 19) Schwert, G. W. & Takenaka, Y. (1955). *Biochim, Biophys. Acta.* **16**, 570.
- 20) 小川恕人 (1965). 代謝 **2**, 514.
- 21) Cunningham, L. W. Jr. (1954). *J. Biol. Chem.* **211**, 13.
- 22) Kubacki, V., Brown, K. D. & Laskowski, M. (1949). *ibid.* **180**, 73.
- 23) Keller, P. J., Cohen, E. & Neurath, H. (1956). *ibid.* **223**, 457.
- 24) Bergman, M., Fruton, J. S. & Pollak, H. (1939). *ibid.* **127**, 643.