



Title	魚類幽門垂蛋白質分解酵素の生化学的研究 I : サケ幽門垂蛋白質分解酵素の性質に関する基礎的研究
Author(s)	内田, 直行; UCHIDA, Naoyuki
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 20(4), 313-319
Issue Date	1970-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23406
Type	departmental bulletin paper
File Information	20(4)_P313-319.pdf



魚類幽門垂蛋白質分解酵素の生化学的研究 I

サケ幽門垂蛋白質分解酵素の性質に関する基礎的研究

内 田 直 行*

Biochemical Studies on proteolytic Enzymes in Pyloric Caeca of Fish-1 Fundamental study on the properties of proteolytic enzymes in chum salmon pyloric caeca.

Naoyuki UCHIDA

Abstract

Fundamental studies were made on the properties of proteolytic enzymes in salmon (*Onchorhynchus keta*) pyloric caeca.

It was found that the crude proteolytic enzymes were effectively extracted with distilled water as well as 1 mM CaCl_2 solution and these proteolytic enzymes were unstable under acidic condition, particularly below pH 5 and included some amount of BTEE-hydrolytic enzyme which was rapidly destroyed over 40°C.

Active enzymes for each substrate (casein, TAME, BTEE, and CBZ-Gly-Phe.) were precipitated by slightly changing the concentration of ammonium sulfate at pH 8.5 without loss of their activity.

From these results, it was assumed that the properties of the proteolytic enzymes in chum salmon pyloric caeca were considerably different from those of enzymes found in bovine and whale pancreas, and that the extracts contained active enzymes in the digestive juices and the zymogens from pancreatic cells which are unavoidably activated in the mixture.

結 言

魚類の幽門垂蛋白質分解酵素についてはすでに多くの報告¹⁾⁻⁷⁾がなされている。また、近年サケ類の幽門垂蛋白質分解酵素についても Croston^{8,9)} および牛山等^{10,11)}によりしだいにその性質が明らかにされてきた。これらの報告によると、サケ類を含む硬骨魚類は膵臓のみを別個に採集することが困難であるために蛋白質分解酵素を Zymogen のままで抽出することが困難であり、また、これら酵素が低い pH で不安定であり、温度安定性も低く、さらに硫酸による塩析により失活しやすいことなど蛋白質分解酵素の研究を進めるにあたり、いくつかの問題点が存在している。そこで著者はシロサケ幽門垂蛋白質分解酵素の生化学的研究を広く進めるための一段階として pH および温度安定性および抽出法などに関する基礎的な研究を行ない、従来の方法について再検討を行なった。

* 北海道大学水産学部生物化学講座
(Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

実験方法

実験材料

1) 試料. 1968年4月下旬南千島沖で捕獲したシロサケ (*Oncorhynchus keta*) の幽門垂 (膵臓を含む以下同じ) を -20°C 以下に保存して適宜実験に供した。

2) 基質. カゼイン (acc. to Hammarstem: 和光純薬工業K.K.), Tosyl-L-Arginine Methyl Ester-HCl: TAME (Nutritional Biochem. Corp.), N-Benzoyl-L-Tyrosine Ethyl Ester: BTEE (Nutritional Biochem. Corp.), N-Carbobenzoxy-Glycyl-L-Phenylalanine: CBZ-Gly-Phe (Miles Yeda LTD) を使用した。

蛋白質分解作用の測定

最終的に比色計の吸光度が $0.1 \sim 0.6$ の範囲内になるように 0.2 M 硼酸緩衝液 ($\text{pH } 8.7$) で希釈した酵素液 (後述) をカゼインの 2% 溶液 (0.2 M 硼酸緩衝液) を基質とし, 30°C , 10 分間の酵素反応を行ない Anson 萩原の方法¹³⁾ に基づいて測定した。酵素単位は 1 分間に生成する三塩化酢酸可溶物の量がチロシン 1 mg 当量に相当する場合の活性度を 1 チロシン単位の蛋白質分解酵素 (PU) とした。比活性は蛋白質 1 mg あたりのチロシン単位で表した。

エステラーゼ作用の測定

TAME および BTEE を 0.04 M トリス-塩酸緩衝液 ($\text{pH } 8.4$) に $1.04 \times 10^{-8}\text{ M}$ および 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 ($\text{pH } 8.1$) に $5 \times 10^{-4}\text{ M}$ になるようにそれぞれを溶解し、それぞれの基質として TAME および BTEE 分解酵素活性を 30°C で Hummel の方法¹⁴⁾ に従い測定した。酵素単位は便宜上、 1 分間あたりに吸光度を 1 増加させる活性度を 1 単位の酵素活性とした。

CBZ-Gly-Phe 分解作用の測定

0.02 M トリス-塩酸緩衝液 ($\text{pH } 8.0$) に CBZ-Gly-Phe を 0.04 M になるように溶解し、基質溶液とし、その 0.1 cc と酵素液 0.1 cc を 30°C で 20 分間反応させ遊離する phenylalanine をニンヒドリン法¹⁴⁾ により定量した。酵素単位は便宜上 1 分間あたりに遊離する phenylalanine が 1 mg に相当する活性度を 1 単位の酵素活性とした。

蛋白質濃度の測定

蛋白質濃度の測定は Lowry 等の方法¹⁵⁾ に基づいて行なった。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。

結果および考察

pH 安定性

細切した幽門垂を 3 倍量の 1 m M CaCl_2 溶液でホモジナイズして得た粗抽出液を N NaOH で $\text{pH } 8.0 \sim 8.5$ に調節し、 20 時間、 5°C で活性化した後、 N NaOH と N HCl で任意の pH に調節し、 5°C に放置した。残存する蛋白質分解活性と放置時間との関係を Fig. I に示した。この酵素は酸性あるいは強アルカリで不安定であった。しかし、牛等の膵臓蛋白質分解酵素と異なり至適 pH 付近で非常に安定であった。すでに Croston, 牛山等によって述べられているように、硬骨魚幽門垂から zymogen のみを分別抽出することは、哺乳動物の膵臓で採用されているような方法では困難であること、およびそこで採用されているような酸性条件下での抽出は、 $\text{pH } 8 \sim 9$ の場合に比べて、はるかに不安定である上に、後述のごとく低収量であることを考え合わせると、硬骨魚幽門垂消化酵素の研究を行なうには、著者が使用している水または 1 m M CaCl_2 の抽出によって必然的に活性化される Zymogen を含む全消化酵素を研究対象とすることがより合理的であると云えよう。

温度安定性

活性化した粗酵素液を 0.2 M 硼酸緩衝液 ($\text{pH } 8.7$) で 500 倍に希釈し、これを各温度で反応させ、

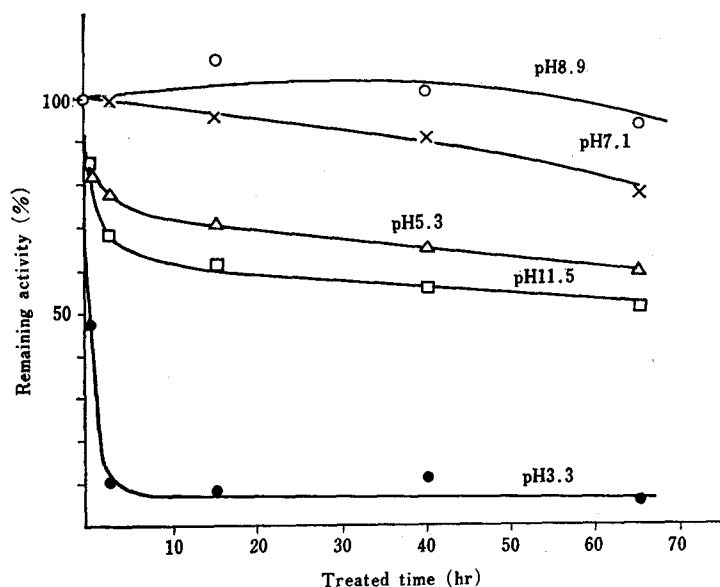


Fig. 1. Effect of pH on stability of proteolytic enzymes in chum salmon pyloric caeca at 5°C. Crude extract of pyloric caeca activated at pH 8.0-8.5 were adjusted to each pH with N sodium hydroxide and N hydrochloric acid, and allowed to stand at 5°C. Enzymatic activity was assayed for 2% casein in 0.2 M borate buffer (pH 8.7) at 30°C.

反応時間と遊離する分解生成物量との関係を Fig. 2 に示した。これによれば 40°C 以下ではかなり長時間直線の関係にあった。すなわち、この結果からは 40°C 以下ではこの蛋白質分解酵素はかなり安定と思われた。さらに、50 倍に希釈した酵素液を各温度に放置し、放置時間と残存活性の関係は Fig. 3 のごとくになった。30°C 以下ではほとんど失活しなかったが、50°C 以上ではかなり急速に失活した。40°C では非常に不安定な酵素と比較的安定な酵素が混在している事実が示されている。そこで TAME, BTEE および CBZ-Gly-Phe 分解作用を持つ酵素が 40°C でどのような温度安定性を示すかを検討した。Fig. 4 に示すように TAME 分解酵素は 40°C でかなり安定であった。しかし、BTEE および CBZ-Gly-Phe 分解酵素は 60 分以後にだいに失活が起った。このことから 40°C における蛋白質分解作用の減少は主にカゼイン分解作用と BTEE 分解作用を共に持つ酵素（キモトリプシン類似酵素と思われる）が失活したためと説明できる。なお 60 分までの蛋白質分解作用の急激な減少の原因としては本実験で使用したいずれの基質も分解し得ない他の蛋白質分解酵素の失活によるものか、また、BTEE 分解酵素の蛋白質分解作用とエステラーゼ作用の温度安定性が異なるために起るのかはさらに充分な検討が必要と思われる。この結果、シロサケ幽門垂蛋白質分解酵素の反応条件として、牛山らは 35°C の反応温度を採用している³⁰⁾¹¹⁾ けれども、さらに安定な 30°C を用いる方が適当であると思われる。

その他の条件下での安定性

すでに魚類の幽門垂蛋白質分解酵素は CaCl_2 により安定化されるということが知られているのでシロサケ幽門垂蛋白質分解酵素の温度安定化に必要な CaCl_2 の濃度を 0.5 ~ 10 mM の範囲にわたって検討したところ、溶媒を硼酸緩衝液 (pH 8.7) とした場合 1 mM また、トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.7) では 5 mM が最も効果があった。また、0.2 M 硼酸緩衝液 (pH 8.7) に酵素液を充分に透析した後、硫酸による塩析を行なうと、従来 Croston が報じた結果と異なって、硫酸分画による蛋白質、TAME および BTEE 分解活性の失活を殆んど防ぐことができることがわかった。

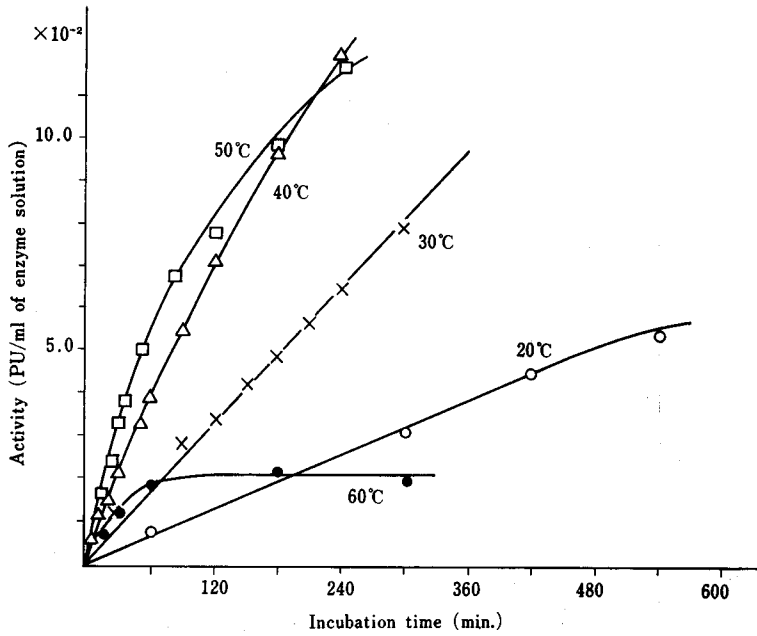


Fig. 2. Effect of temperature on the autocatalytic activation of proteolytic enzymes in chum salmon pyloric caeca. Activity unit (PU) is defined as a micromole tyrosine liberated per minute in 0.2 M borate buffer. (pH 8.7).

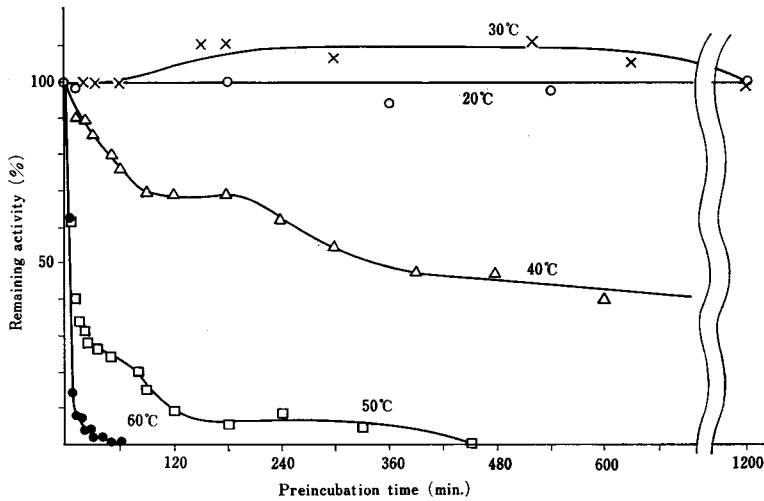


Fig. 3 Effect of temperature on the activity of proteolytic enzymes in chum salmon pyloric caeca. Enzyme solution was preincubated in 0.2 M borate buffer (pH 8.7) at each temperature for various time, and then the remaining activity was assayed for 2% casein in 0.2 M borate buffer (pH 8.7) at 30°C.

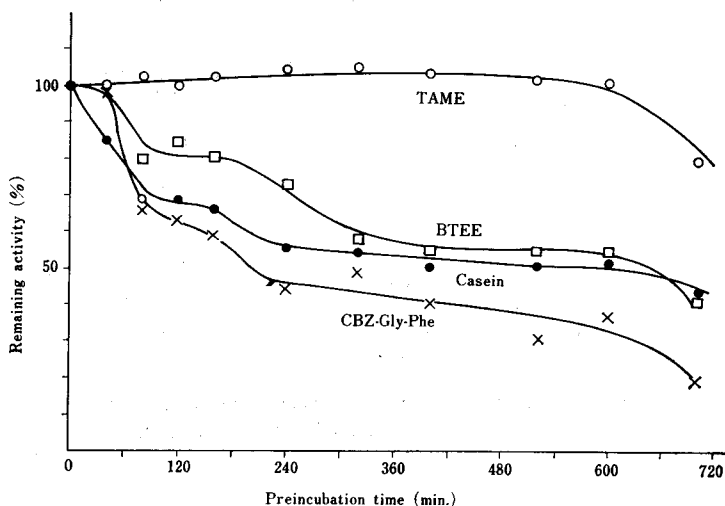


Fig. 4 Stability of hydrolytic enzyme activity on various kinds of substrate in chum salmon pyloric caeca.

Enzyme solution was preincubated for various time at 40°C, and then the activity was assayed for 2% casein in 0.2 M borate buffer (pH 8.7), 1.04×10^{-3} M TAME in 0.04 M Tris-HCl (pH 8.4), 5×10^{-4} M BTEE in 0.05 M Tris-HCl (pH 8.1), and 0.04 M CBZ-Gly-Phe in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) at 30°C

抽出性の検討

魚類幽門垂蛋白質分解酵素の抽出には種々の方法が使用されている。そこで、そのうちの代表的な抽出液と2, 3の異なるpHによる抽出性を検討した。細切したシロサケ幽門垂を3倍量のそれぞれの溶液でホモジナイズした後、抽出液をN NaOHでpH 8.0~8.5に調節し、5°Cで20時間活性化した後、50,000×gで15分間遠心分離を行ない上澄液の活性を測定した。また、幽門垂の懸濁液をN NaOHおよびN HClでそれぞれpH 5, 8および11に調節し、ホモジナイズした。ホモジネイトを12時間5°Cに放置して抽出を行なった後、他の場合と同様にpH 8.0~8.5で活性化を行ない、抽出液を得た。その結果はTable Iに示すごとく水抽出および1m M CaCl₂の場合で最も優れていることが解った。

硫酸分画による部分的精製

前述の方法で水抽出した酵素液を1mM CaCl₂を含む0.2M 硼酸緩衝液(pH 8.7)に透析した後、Osborne法により硫酸分画を行ない、各飽和度についてカゼイン、TAME、BTEEおよびCBZ-Gly-Phe分解活性を測定し、その分布を検討した。その結果はFig. 5に示すごとく、最大活性を示す飽和度は基質により少しづつ異なる飽和度の分画に見い出されるが、分画はそれほど判然とは行なわれない。この結果は牛または鯨隣臓蛋白質分解酵素が硫酸分画によって示す態度¹⁰⁾と少し異なった。なおこの操作での活性の回収量は70~80%で比活性は1.7倍に増加した。

要 約

シロサケ幽門垂蛋白質分解酵素の生化学的研究を広く進めるにあたり、そのpH、温度およびその他の条件下の安定性など酵素の性質に関する基礎的研究を行なった。その結果、この酵素は酸性で不安定であり、また熱に対して非常に不安定なBTEE分解作用を示す酵素の存在が認められ、さらに、

Table 1 Extraction of proteolytic enzymes from chum salmon pyloric caeca by various solvents.

Solvent	Total activity (PU)
Water	4.8
pH5	0.4
pH8	1.8
pH11	1.3
CaCl ₂	
1 mM	4.2
1 mM (pH 8.7)	2.0
5 mM	3.8
0.2 M Borate Buffer in 1 mM CaCl ₂ (pH 8.7)	3.5

Five grams of the pyloric caeca was homogenized in 15 ml of each solvent, and then activation and assay for activity were made by the same method as Fig. 1.

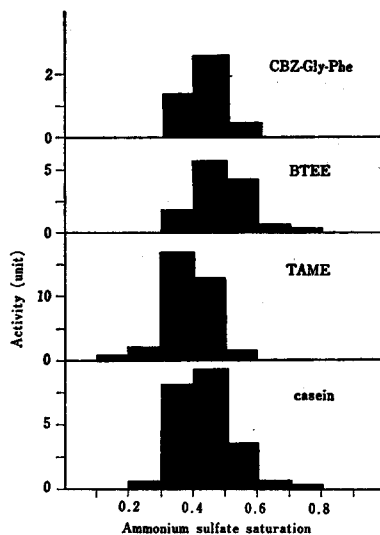


Fig. 5 Ammonium sulfate fractionation of crude proteolytic enzymes in chum salmon pyloric caeca.

The figure shows the total activity in each fraction. Fractionation was made by Osborne method. Activity was assayed at the same condition as Fig. 4.

本酵素の抽出には水抽出、または1 mM CaCl₂抽出が最も優れていた。硫酸による塩析の結果、2, 3の基質に対する最大活性は少しずつ異なる飽和度の分画に見出され、その際の活性の損失は殆んどみられなかった。これらの結果から本酵素は従来知られている牛および鯨等の膵臓蛋白質分解酵素と比べて性質がかなり異なることが考えられた。また Crostonが主張しているように、Zymogenの分別抽出が不可能である事実などから考えて、著者も抽出中必然的に活性化をうけるZymogenを含む全消化酵素について研究を進めると云う立場をとることにした。

本研究を行なうにあたり御指導ならびに御校閲を賜った本講座齋藤恒行教授ならびに新井健一博

士，サケ幽門垂の採集に御協力いただいた本学部練習船北星丸乗組員ならびに調査団各位に厚く感謝の意を表する。

文 献

- 1) Stern, J. A. & Lockhart, E. E. (1953). *J. Fish. Res. Bd. Can.* 10, 590.
- 2) 大城善太郎 (1968). 日水誌 34, 847.
- 3) Prahl, J. W. & Neurath, H. (1966). *Biochemistry.* 5, 2131.
- 4) Zendzian, S. N. & Barnard, E. A. (1967). *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 699
- 5) ——— & ——— (1967). *Ibid.* 122, 714.
- 6) Mücke, W. & Barnard, E. A. (1969). *Biochim. Biophys. Acta.* 178, 354.
- 7) Barnard, E. A. & Hope, W. C. (1969). *Ibid* 178, 364.
- 8) Croston, C. B. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* 89, 202.
- 9) Croston, C. B. (1965). *Ibid.* 112, 218.
- 10) 吉村克二・柴田猛・牛山寛 (1964). 北大水産彙報 14, 262.
- 11) 牛山寛 (1968), *Ibid.* 19, 147.
- 12) 萩原文二 (1953). 標準生化学実験. 207p. 東京. 文化堂.
- 13) Hummel, B. C. W. (1959), *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 1393.
- 14) Moore, S. & Stein, W. H. (1948), *J. Biol. Chem.* 176, 367.
- 15) Lowry, H., Rosebrough, N. J., Farr, A. C. & Randall, R. J. (1951). *Ibid.* 193, 265.
- 16) 松岡芳隆・小出醇・橋本明 (1965). 農化誌 39, 176.