

魚類内臓プロテアーゼに関する研究*

藤 井 実

Studies on the Protease of Fishes*

By

Minoru FUJII

目 次

緒 言	3
第 一 編 魚胃液プロテアーゼに関する研究	4
第 一 章 酵素試料及び活性測定法	4
第 二 章 胃, 幽門垂及び腸組織のプロテアーゼ活性	4
第 三 章 胃及び腸液の pH に就いて	5
第 四 章 魚胃液プロテアーゼの至適 pH に就いて	9
第 五 章 魚胃液プロテアーゼの至適温度	10
第 六 章 魚胃液プロテイナーゼのイオン交換樹脂 (Amberlite IRC-50H型) による解析	11
第 二 編 魚幽門垂プロテアーゼに関する研究	14
第 一 章 イワシ及びマグロ幽門垂プロテアーゼの至適 pH	14
第 二 章 イワシ及びマグロ幽門垂プロテアーゼの至適温度及びその失活	16
第 三 章 酸, 塩基及び有機溶剤のイワシ幽門垂プロテアーゼに及ぼす影響	21
第 四 章 魚幽門垂粉末試料より水溶性プロテアーゼの抽出法に就いて	27
第 五 章 該酵素の反応速度恒数に就いて	29
第 六 章 プロテアーゼに対する硫酸の沈澱能及び生成沈澱物の酵素活性	31
第 七 章 アセトンの沈澱能及び生成沈澱物の活性	34
第 八 章 試料粗酵素標品と市販トリプシン標品 (粉末) との活性の比較	38
第 九 章 マグロ幽門垂プロテアーゼに対する抗菌性物質の影響	39
第 十 章 Tonerde C γ に依る酵素蛋白質の吸着	42
第 十 一 章 C γ に吸着された酵素蛋白質の溶離に対する pH の影響	47

※ 水産講習所研究業績 第327号, 1961年6月26日 受理.
Contribution from the Shimonoseki College of Fisheries, No. 327.
Received June 26, 1961.

第十二章	魚プロテアーゼよりの精製標品とトリプシン結晶との活性比較	50
第十三章	Tonderde C γ の反復吸着処理とプロテアーゼの活性	50
第十四章	魚幽門垂プロテアーゼの精製に就いて	52
第十五章	魚幽門垂プロティナーゼの構成に就いて	54
結 論		62
Summary		64

結 言

魚類内臓プロテアーゼに就いては大谷・島田(1923)¹⁾、大谷・畑中(1927)²⁾、町田 (1933)³⁾等がそれぞれカツオ、サバおよびブリ等の幽門垂プロテアーゼに就いて研究を行ない、いずれもその至適 pH は 7~8 の間、至適温度は 40°C 以上であるとしている。また大谷・横田 (1933)⁴⁾等はナマズの肝臓の蛋白分解酵素に就いて研究し、その至適 pH は 7.7 で至適温度は 45°C であると指摘している。大島・佐々木 (1925)⁵⁾等はギンマスの胃について、島田 (1936)⁶⁾ は同魚の胃、腸および幽門垂に就いて、また二戸 (1936)⁷⁾ はサケの肝臓、ベニマスの肝臓に就いて、更に高橋・広沢 (1936)⁸⁾等はウナギの胃プロテアーゼの研究を行なった。そしてウナギの胃プロテアーゼの至適 pH は 3 前後、また肝臓、幽門垂および腸のプロテアーゼにおいては至適 pH は約 6.8 の微酸性側にあり、至適温度は約 30°C と発表している。而して大谷 (1948)⁹⁾ はサバの腸には蛋白分解酵素なしとしている。更に大谷・中井 (1937)¹⁰⁾等はヒメマスの胃、腸および幽門垂の蛋白消化酵素の研究においてその至適温度が約 30°C であると記している。

五味・鳥巢¹¹⁾等は魚胃液の pH について調査し、アカエイでは pH 5.6 で最大値を示し他はこれより低いと述べ、VONK¹¹⁾は魚胃液の pH を 4.5~4.7 とし、ペプシンの存在を主張しその活性は pH 2 で最もよく働くと述べている。

以上の諸研究結果を要約すれば魚胃液プロテアーゼの至適 pH は 3 前後でその至適温度は約 30°C であるが魚種により異なるともいう。

また幽門垂プロテアーゼの至適 pH は 7~8 で至適温度は 30~40°C 或は 40°C 以上ともいわれる。以上の諸研究結果をみるに数値に相当の開きがあり、また測定方法等にも定性的な所が多分にあり充分満足すべきものとはいえない。

魚類、殊に海棲魚類は陸棲動物と異なり海水という制約された環境に生育するものである。したがって空気と異なり常に微アルカリ性を有する海水より摂餌し之を同化して行く消化機構は陸棲動物のそれとは当然異なるものがあると推察される。著者は魚類の蛋白分解消化機構を酵素化学的に明らかにする目的をもって胃液および幽門垂中に存在する蛋白分解酵素の酵素化学的研究を行なった。そして魚胃液の pH およびプロテアーゼに就いて従来の見解と異なる新しい知見を得た。また幽門垂プロテアーゼに関してはその酵素化学的性質を明らかにし、更に Tonerde C γ を使用して該酵素系の精製方法を攻究し、更に該酵素系の構成に就き研究を進めその分面を行ない、各分面の基質に対する分解生産物量の差異から各分面の酵素化学的性質に差異を認めこの酵素系の構成に考察を行なった。しかしこの幽門垂酵素系の各分面に関する研究は緒に就いたばかりで今後大いに研究を要するのであるが、一応今日までの研究成果をとりまとめて報告する次第である。

なお最近斗ヶ沢¹⁸⁾ 19) 20)等がマグロおよびカツオ幽門垂より結晶プロテアーゼを得たと報告している。

この研究報告をなすに当り御鞭撻を賜わった九大教授富安行雄博士、同九大教授富山哲夫博士に感謝の意を表します。また、この研究を行なう動機をあたえられ、且又終始御鞭撻下さいました九大教授山藤一雄博士に深甚の謝意を表しますと共に、この原稿の校閲の労をとられ、且つ酵素分面実験に種々有益な御意見を与えられ且又貴重な種々の文献を分与されました九大教授船津勝博士に厚く御礼申し上げます。

また、実験に協力された水産講習所の富田輝雄氏、元研究員西野イチ氏ならびにマグロ胃液の pH 調査に協力していただいた田川昭二氏および試料採取に協力していただいた水産講習所教授松井魁博士ならびに耕洋丸乗組の諸氏ならびに静岡県立水産試験場の下田雄四郎技師に感謝の辞を呈します。

第一編 魚胃液プロテアーゼに関する研究

第一章 酵素試料及び活性測定法

1) 材 料

水産講習所裏の海より釣り上げた活魚を主として使用したが、場合によっては市場で購入した新鮮な魚類および清水港に揚陸されたマグロ類、或は本所練習船により捕獲されたマグロ類の内臓を使用し、新鮮なまま、或はアセトン・エーテル処理をして脱水脱脂した内臓を粉末化した後試料に供した。新鮮内臓を使用する場合、その1g内外に予め塩酸で処理した珪砂0.1gを添加してよく搗碎し粥状液となしたものをそのまま基質に添加反応させる。粉末試料の場合はその一定量をそのまま基質に添加するか又はその水抽出液の一部を酵素試料として使用した。

2) 活性測定法

5%カゼイン溶液 (pH 7 に調製) : 10~20cc を50cc の目盛を付けた100cc 容三角フラスコに入れ、これに緩衝液を添加し所要の pH に調製し温度を一定にした後、上記酵素試料を加え更に同温の蒸留水を加えて全量を50ccとなし、トルオール5ccを添加して一定温度に一定時間作用させた後20%トリクロール酢酸水溶液約17cc (全液中の最終濃度5%) を添加して酵素作用を止めると共に除蛋白処理を行ない、その濾液を100cc となしその中より一部を使用してアミノ態窒素、非蛋白可溶性窒素等を測定する。別に上記酵素試料を予め熱処理して酵素活性を破壊したものを上記測定法と全く同様に処理し、その一部を使用して測定したそれぞれの値を対照値としこれを試験値より差し引いた数値を試料の絶対乾量に換算するか、又は試料酵素液1cc当りの値、或は酵素液中の蛋白窒素1mgの値に換算した数値 (mg) を以て活性とする。反応液に使用する水はすべて硝子容器を使用して採取した再蒸留水である。

アミノ態窒素：マイクロ・バンスライク装置を使用して求めた。

非蛋白可溶性窒素：酵素反応を止めて除蛋白した濾液を一定量 (100cc) にし、その一部 (10cc) を硫酸分解に付した後、これを試料として窒素量を測定したものである。なお窒素量の測定方法に就いて述べると僅かの条件の変化に伴う酵素活性の差異を測定する場合が非常に多いために酵素活性を示す尺度である窒素量の差異も僅少な場合が少なくなく、従って1/28規定液を使用しても普通の水蒸気蒸留法による測定値では満足な数値を得ることができない。幸い THEORELL, RAPPAPORT a. LEVY¹²⁾ 等の提唱している Iodimetry 法が僅少な窒素試料の測定には好都合であることを知ったので更にこの方法を検討し使用条件を決定¹³⁾し実験目的に合致するよう測定方法を決定した。この方法により測定した窒素量を酵素液1cc 又は試料中の蛋白窒素量1mg当りの数値に換算した値を酵素活性 (Act/1cc酵素液又は Act/1mg 蛋白窒素) とした。また実験の後半に至って日立分光光度計 (EPU-2型) の使用が可能となったので、以後主としてこれを使用し Folin の試薬により発色したものを280m μ で比色定量した。また従来の化学定量法による測定値をも再び比色法により追試してその正確度を期した。

水素イオン濃度の測定：主として東洋濾紙KK製の色素表により測定したが、主要なものに対してはガラス電極使用のpHメーター (東亜電波HM-5型) を使用しその正確度を期した。

第二章 胃、幽門垂及び腸組織のプロテアーゼ活性

イワシ内臓の胃、幽門垂および腸に就いてそのプロテアーゼ活性を測定した。胃および腸に就いてはその内容物をよく除去した後ハサミで細切して水で軽く洗滌し濾紙間に挟んで軽く圧して表面の水分を除去した。

これ等に就いて絶乾量 1 g 当りの活性を測定した結果は第 1 および 2 表の示すとおりである。

Table 1. Proteolytic activity of the stomach, pyloric caecae and intestines (sardine).
(Time and temp. of reaction : 90 hrs.; 35°C ; pH 5.5)

Sample Measurement	Stomach	Pyloric caecae	Intestines
NH ₂ -N (mg)	1.593	1.284	—

Table 2. Proteolytic activity of the stomach, pyloric caecae and intestines (sardine).
(Time and temp. of reaction : 65 hrs.; 35°C ; pH 8.5)

Sample Measurement	Stomach	Pyloric caecae	Intestines
NH ₂ -N (mg)	2.278	3.883	—

第 1 および 2 表の示すとおり胃および幽門垂には明らかにプロテアーゼ活性が認められる。試料は両実験とも同一量を使用しているが、アルカリ側の場合反応時間が短いにもかかわらず酸性側におけるよりも強い活性を示している。即ち幽門垂のみならず胃もむしろアルカリ性側においてより強いプロテアーゼ活性を有することを示している。しかし腸組織中にはいずれの場合にもプロテアーゼ活性を示さなかった。これは大谷⁹⁾のサバにおける実験と一致している。

総 括

イワシ内臓の胃、幽門垂および腸組織のプロテアーゼ活性の有無およびその強さを検討したところ、胃および幽門垂には明らかにその活性が認められたが、腸には存在を認められなかった。

また幽門垂のみならず胃においてもそのプロテアーゼ活性はむしろアルカリ性側において強く示された。

第 三 章 胃及び腸液の pH について

島田⁶⁾、二戸⁷⁾等は魚胃プロテアーゼの至適 pH を 3~4 とし、至適温度に就いては魚種により異なると述べている。五味・鳥巢¹¹⁾等は多数の魚類の胃液に就いて研究し、そのいずれも酸性を呈し、アカエイは pH 5.6 で、他の魚類はそれよりも低い pH 値を有すると発表している。また VONK¹¹⁾によれば胃液は常時 pH 4.5~4.7 の値を有し食餌によって胃が充たされると pH は更に低下し、pH 2 のときそのペプシンは最もよく働くようになると述べている。然るに胃組織プロテアーゼ活性は酸性側よりもむしろアルカリ性側において、より強く示されたので下記の魚種について胃液の pH の検討を行なった。試料としては入手できる限りの活魚を使用した。

1) 活魚胃液の pH

海中より釣り上げた活魚を直ちに解剖して東洋濾紙 KK 製の pH 試験紙を胃壁に押し当てて呈色させた。比較として腸壁の pH をも検討したが、その結果は第 1 表の示すとおりである。

更に海水の pH の影響を排除する目的で活魚を直ちに 0.1N 塩酸液に投入して空気通気を行ない、魚の死後直ちに胃液の pH を測定したところ全く同一結果を得た。

次に大型魚であるマグロの胃液のpHを測定した結果を示す。この測定は当所練習船俊鷗丸が昭和29年12月より翌30年2月末頃印度洋においてマグロ漁場調査およびマグロ捕獲実習を行なったので、乗船者である製造学科助手田川昭二氏に依頼して行なったものである。pHの測定方法は小魚型の場合と同じく胃部を切開してその内壁にpH試験紙を押し当てる方法で、第2表はその結果を示す。

Table 1. The pH value of gastric-juice and intestinal-juice of fishes.

Kind of fishes	Conditions of stomach	pH	
		Gastric-juice	Intestinal-juice
Red sea-bream (Madai)	full	7.5	8.2
	empty	7.4~7.8	8.3
Puffer (Fugu)	full	7.5~8.0	8.2
Wrasse (Bera)	full	7.6~8.2	8.3~8.4
Black porgy (Kurodai)	full	7.4	8.1
Common sea-bass (Seigo)	full	7.4	8.4
Rock-cod (Mebaru)	full	7.6	8.3
Eel (Unagi)	full	7~7.5	8.0~8.5
	empty	7.5	8.3

Table 2. The pH value of gastric-juice of yellow fin tuna.

Kind of fishes	Weight (Kg)	Length (cm)	pH	Conditions of fishes
Yellow fin tuna (Kihada) (♂)	65.3	146	7.3	20 minutes after killed. Almost empty in stomach
" (♂)	25.1	115	6.3	20 minutes after killed. Squids: 6, half digested
(♂)	58.0	147	7.6	Saury-pike: 1

第1および2表の示すとおり小型魚のみならず、大型魚においてもその胃液のpHは殆んど中性或はむしろ微アルカリ性に傾いていることがわかる。また腸液は当然のことながらpH7.7~8.5というアルカリ性であった。なおこの表には示していないが、死後の経過時間の比較的長いと思われるマグロの胃液のpHは殆んど6.2~6.4の間であった。以上の諸結果によると小型魚に限らず大型魚における胃消化は中性乃至微アルカリ性で行なわれていることを示すものである。

2) 魚の死後の経過時間と胃液のpHの変化

活魚(チヌ、セイゴ)をそのまま放置死に致らしめて放置時間と胃液のpHの変化との関係を調べた。即ち釣り上げたチヌ、セイゴを2群に分ち、一部は直ちに解剖してpHを検し残部を室温に放置し死に致らしめ24時間および48時間後pHを調べた結果第3表のような結果を得た。

Table 3. Change in the pH value of gastric-juice of fishes after ceasing to breathe.

Time (hr.) \ Kind of fishes	0	24	48
Black porgy (Kurodai)	7.8	6.4~6.6	6.6
Common sea-bass (Seigo)	7.3	—	6

なお、同上試料に就いて腸内のpHを調べた結果を参考のため下に示すと第4表のとおりである。

Table 4. Change in the pH value of intestinal-juice of fishes after ceasing to breathe.

Time (hr.) \ Kind of fishes	0	24	48
Blackporgy (Kurodai)	8.3	6.8	6.8~7
Common sea-bass (Seigo)	7.7	—	6.9

即ち魚胃液は第3表の示すとおり活魚においてはむしろ微アルカリ性である。しかるに死後時間の経過と共に微酸性に移行してくるもので、この事実は腸液(第4表)に就いても同じである。即ちこの酸性側への移行はおそらく魚体の自己消化の条件に適合する。

3) 胃内容物の存否における胃液のpHに就いて

試料(タイ)を2群に分けて水槽に飼育し、1群には飼料を全然与えず、他方には時々生きた小エビ(shrimp)を与え、24時間および48時間後胃液を調べ第5表の結果を得た。

Table 5. The pH value of gastric-juice in case of taking food or none in stomach.

(Kind of fish: red sea-bream)

Conditions of stomach \ Rearing period (hr.)	empty	full of shrimps
24	6.4~6.8	7.2~7.5
48		

上表の結果を見るに、胃内容物が空の時は微酸性を示しているが、小エビを摂取することにより微アルカリ性となった。そしてこの関係は24および48時間の飼育の試料に就いても同一結果をあたえた。この事実はVONK 11)の知見と全く逆である。この相違に関する説明は後章で行なうが、とにかく魚類は自然環境においては絶えず摂餌しているので、従って胃は何らかの食餌により充満されているものと考えすることは決して不自然ではない。もしそうだとすれば、胃消化は当然アルカリ性で行なわれていると考えざるを得ないのである。

4) 麻酔死による魚の胃液のpH

以上述べてきた諸実験はいわゆる生体解剖による結果を示したものであるが、この生体解剖処理によって瞬間的に活魚の筋肉および内臓の諸器官に生理的の諸変調を生じ、その結果が胃液のpHにも或影響を及ぼ

すものではないかとも考えられたので、この心配を排除する方法として飽和ウレタン (Ethyl-carbamate) 液を水槽中に滴加して魚を麻酔状態にして直ちに解剖し胃液のpHを検した。

その結果は第6表のとおりである。

Table 6. The pH value of gastric-juice of fishes killed with narcotic.
Red sea-bream (Madai)
Scorpion fishes (Kasago)

Rearing period(hr.)	Conditions of stomach	
	empty	full of shrimps
24	6.8	
48		

この表の結果も胃液は微酸性ないし中性であることを示し、空胃の状態と時間の長短とは関係がない。即ち生体解剖或は麻酔死後の解剖であろうとも胃液のpHはそれ等の方法の差異による影響を少しも受けてはいないようである。

5) 胃液中の遊離塩酸の存否に就いて

試料としてマダイ (体長15 cm位のもの) 数尾分の胃液および内容物を予め炭酸を除去した再蒸溜水で良く洗い出し遠心分離機にかけて固形物を除去し、その上澄液に Dimethyl-amino-azobenzene を添加したが、遊離塩酸の存在を示す赤色の呈色反応は見られなかった。なお、この指示薬の塩酸に対する呈色反応の認知限界を検討した結果は反応液中の塩酸量が約107/1ccであった。以上の諸結果を考察するに活魚胃液は微酸性ないし微アルカリ性を示しているが、その死後においては総べて酸性に移行している。参考までに調べた腸液に就いても同様で、アルカリ性を示したものが時間の経過につれてすべて微酸性側に移行した。

而して胃液のpHが空胃の状態でも殆んど中性に近く、餌糧により充胃されると、むしろ微アルカリ性に傾くことは、たとえ食餌摂取の際一部海水が餌糧と共に摂取されることにより影響されることもあるとしても間断なく食餌を求める魚類の食性から考えると、胃の消化作用は本質的に中性前後のpH或はむしろ微アルカリ性の条件下で強力に遂行されつつあるものと考えすることは妥当であると思う。そして更に胃液中に遊離の塩酸を検出できなかった事実は上述の諸結果と共に魚胃における蛋白消化酵素系がペプシン系のものでなく、微酸性ないし中性系プロテアーゼであろうと思われる。

而して生体解剖のような刺激により筋肉の異状収縮等の変調が生じ、そのため胃液のpHが悪影響を受けるおそれも充分あるので、麻酔剤を使用して実験を行なったがその結果も全然生体解剖の際の所見と同一であった。この事実は解剖の際、その刺激で腸およびその他の内臓器官から液汁が胃中に異状流入したような現象を否定するものであろう。

なお、この実験の終了した時、MACKAY¹⁴⁾等の“Eel pout” (ギンボ科、タラの一種) の消化系に関する研究論文を読んだ。これによると、この魚の胃液は中性ないし微アルカリ性を示すことを報告している。そしてそのようなpHを示す原因に就いて MACKAY 等はこの魚では他の魚と異なり、その十二指腸から膀胱が胃に逆流して、その作用が胃中で持続している特異な消化現象であると考察している。

総 括

1) 活魚 (タイ、フグ、ベラ、チヌ、セイゴ、カサゴ、クロダイ、ウナギ等) の胃液のpHは普通中性ないし微アルカリ性を示し、食餌で充胃の状態ではむしろ常に微アルカリ性で空胃の際微酸性 (pH 6.4~6.8)

を示した。

- 2) マグロにおいても 1) と全く同様な結果を示した。
- 3) 魚の死後において胃液の pH は酸性側 (pH 6.4~6.6) に移行する。
- 4) 生体解剖の際麻酔剤使用の有無に拘らず pH に変化はない。
- 5) 上記魚種の胃液中には遊離塩酸は存在しない。

第四章 魚胃液プロテアーゼの至適 pH に就いて

胃液試料は前述と全く同様にして採取した。即ち活魚の胃部を分離切開し、胃内容物および胃壁を再溜水でよく洗い、遠心分離によって固形物を除去してその上澄液を試料とした。基質としてエデスチンおよびカゼインを使用した。使用した魚種は主としてマダイであるが、胃部の分化の程度の低いといわれるカワハギの胃液に就いても実験を行なった。それ等の結果を示すと、第1表、第1図のとおりである。

Table 1. The optimal pH value of the proteolytic activity of gastric-juice of fishes : red sea-bream (Madai).
(Time and temp. of reaction : 24 hrs. ; 35°C : edestine)

pH	1	2	3	4	5	6	7	8
NH ₂ -N (cc × 10 ²)	5	4	6	7	5	9.6	9	8
Non-protein- soluble-N (mg × 10 ³)	130	128	135	130	140	263	369	205

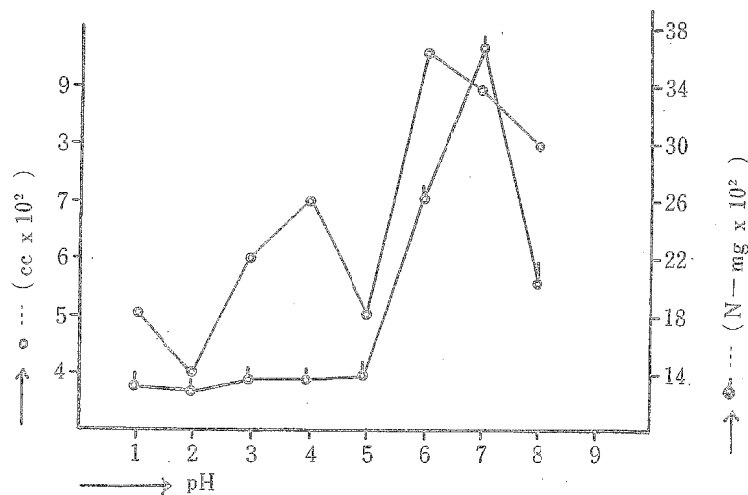


Fig. 1. The optimal pH value of the proteolytic activity of the enzyme solution in gastric-juice.
○ ... Amino-N measured
○ ... Non-protein-soluble-N measured

第2表および第2図はカワハギの実験値を示す。

Table 2. The optimal pH value of the proteolytic activity of gastric-juice of fishes : file fish (Kawahagi).
(Time and temp. of reaction : 40 hrs. ; 35°C ; substrate : casein)

pH	5	7	8.5
Non-protein-soluble-N (mg × 10 ³)	93	206	196

以上の2表の示すとおりに基質から生成されたアミノ態窒素および非蛋白可溶性窒素はpH6~7において最大量を示している。そしてpH8および8.5においても尚強力な活性を示しているのである。従って前章に述べた魚胃液のpHはそのプロテアーゼの至適pHと一致しているといふことができる。

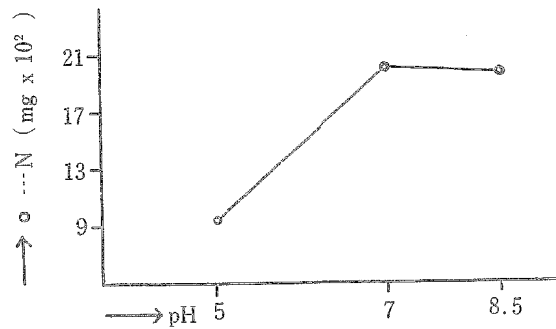


Fig. 2. The optimal pH value of the proteolytic activity of the enzyme solution in gastric-juice.
○...Non-protein-soluble-N measured

総 括

魚胃液プロテアーゼの至適水素イオン濃度は pH6~7にある。

第 五 章 魚胃液プロテアーゼの至適温度

材料としてタイの胃液を使用し反応液のpHを7として各温度における活性を比較したが、実験結果の例を示すと第1表および第1図のとおりである。

Table 1. The optimal temperature of the proteolytic activity of gastric-juice of fishes : red sea-bream (Madai).
(Time of reaction : 20 hrs. ; substrate : casein)

Temperature(°C)	5	20	30	35	40	55
Non-protein-soluble-N cc(as N/28 H ₂ SO ₄) × 10 ³	60.3	863.5	1105.7	1495.3	1337.3	1274.1

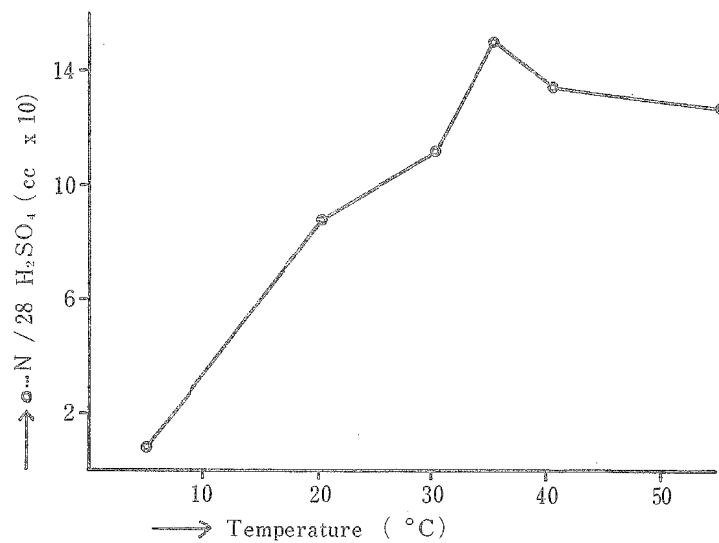


Fig. 1. The optimal temperature of the proteolytic activity of the enzyme solution in gastric-juice.
 ○...Non-protein-N

上表および上図の結果によれば35°C 附近に最も強い活性が見られる。なお40°C においても35°C に次ぐ強さを示した。

総 括

魚胃液プロテアーゼ (マダイ) の至適温度は35°C 附近にある。

第 六 章 魚胃液プロテイナーゼのイオン交換樹脂 (Amberlite IRC-50H型) による解析

魚胃液プロテイナーゼがペプシン類似の酵素であるか否かを検討するため樹脂 (IRC-50) によるクロマトグラフィを行なった。

実験及び結果

試料：ペプシン……石津製薬より入手した保証付 (U. S. A. 製) の粉末であるがその純度は不明である。
 この0.1 g に pH 2 の緩衝液 (MCILVAINE) 20 cc を添加して1時間溶解しその清澄液 1 cc を使用した。

：魚胃液プロテイナーゼ……活魚 (マダイ…体長 15 cm のもの) を直ちに解剖し胃部を取り出しこれを開いて内部を pH 2.2 の緩衝液でよく洗滌し全洗滌液を遠心分離して澄明にした後全液を使用した。なお使用した活魚は冬期のため空胃の状態であったので食餌からの分解物の混入が考えられず、実験目的にはかえって好都合であったと考えられる。

実験方法を述べると IRC-50 H型を更に pH 4 (MCILVAINE 緩衝液) で平衡に達せしめた後試料を流し、同一緩衝液で展開を行なって各フラクション (10 cc) に就いてそれぞれ蛋白窒素量および活性の測定を

スペクトル法で行なった。かくして得られたペプシンおよび魚胃液のカラム・クロマトグラムを第1および第2図で示す。

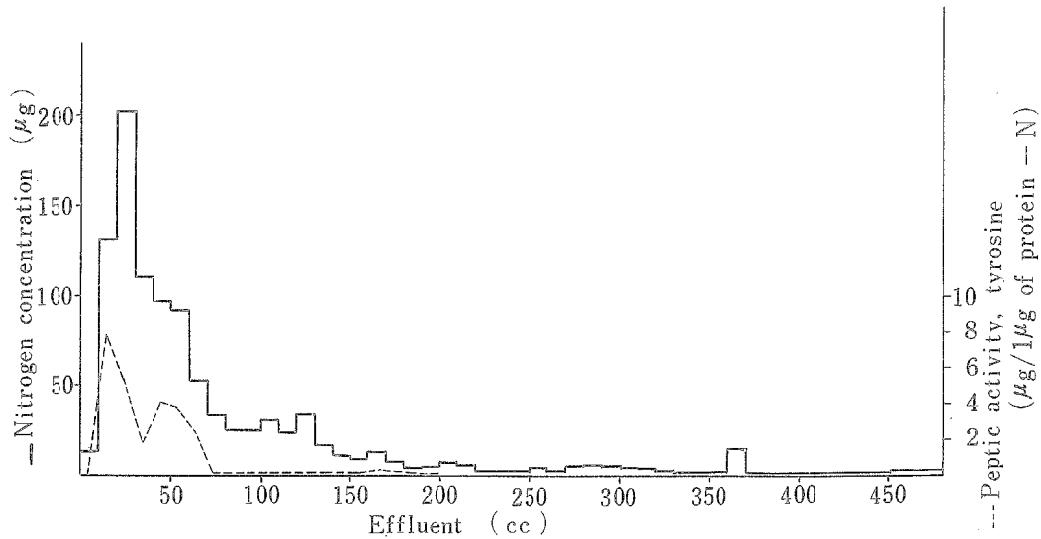


Fig. 1. Showing the column chromatogram of the crude pepsin preparation from mammalian animals by using Amberlite IRC-50 at pH 4.

—Nitrogen concentration of effluent

---Peptic activity, tyrosine μg produced in digestion mixture by protein-N (μg) of effluent.

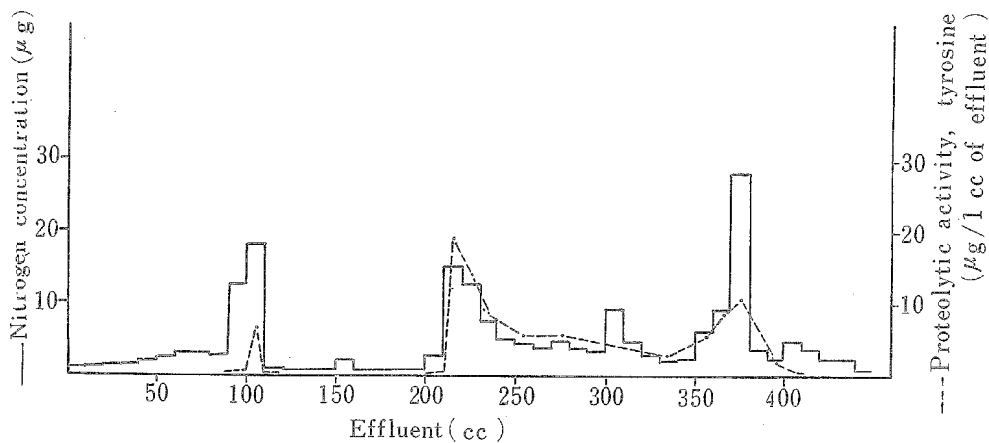


Fig. 2. Showing the column chromatogram of the protease preparation from the gastric-juice of fish (such as red sea-bream).

—Nitrogen concentration of effluent

---The proteolytic activity, tyrosine μg produced in digestion mixture by protein-N (μg) of effluent

第1図によると、その蛋白質は殆んど流出液の30 cc前後をピークとして75 ccまでに溶出され、ペプシン活性もこれに一致するが、この中に2つの区分を認めることができた。また170 ccの所に弱い活性を認めたが、これは前二者に比較すれば非常に弱い。なおペプシン活性の測定 pH は2.2および6で行なったのであ

るが、活性は pH 2.2 でのみ現われた。

次に第 2 図によると流出液の 110 cc, 220 cc および 380 cc 附近の 3 ヶ所に蛋白質の大きな区分が出現した。そして pH 6 で測定したところによると最初の区分の酵素活性は弱く第 2 および第 3 の区分には相当強い活性が示された。このように酵素活性の出現位置が第 1 図のいずれとも一致しないことは両試料中の酵素が IRC-50⁻H 型に対する態度に差異を有するために生ずる現象であると考えられる。さらに活性測定の際の pH に就いて考えると、魚胃液においては pH 6 で強力な活性をみとめたが、ペプシンの場合と同一 pH 2.2 で行なった場合には活性を全然認めることができなかった。以上の諸事実から魚胃液プロテイナーゼは哺乳動物のペプシンとは全然相異なるものであると断定することができる。

総 括

イオン交換樹脂 (Amberlite IRC-50H 型) を使用して魚胃液プロテイナーゼの Column chromatogram を求めこれを哺乳動物のペプシンのそれと比較解析し、さらに両者の酵素活性に対する pH の差異から魚胃液プロテイナーゼはペプシン系でないことを明らかにした。

第二編 魚幽門垂プロテアーゼに関する研究

第一章 イワシ及びマグロ幽門垂プロテアーゼの至適 pH

新鮮な魚体より採取した幽門垂を珪砂と共に搗碎しその上澄液を試料とした。反応条件および結果は第1表および第1図のとおりである。

Table 1. The optimal pH value of the proteolytic activity of pyloric caecae of sardine.
(Time and temp. of reaction : 41 hrs. ; 35°C)

pH	4	5	6	8.5	9.5
NH ₂ -N (mg × 10 ³)	1669.7	2415.2	4199.9	5308.3	4652.8

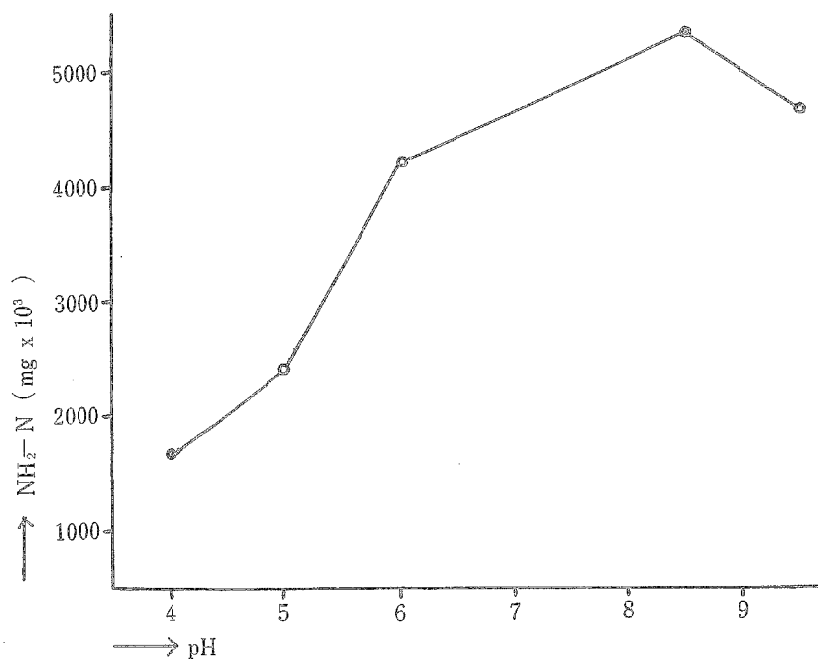


Fig. 1. The optimal pH value of the proteolytic activity of the enzyme solution of pyloric caecae (sardine).

次に同イワシより採取した粉末試料を使用して同様の実験を行なった。反応条件および結果は第2および第3表のとおりである。またこれ等を第2図で示す。

Table 2. The optimal pH value of the proteolytic activity of pyloric caecae of sardine.

(Sample : powder 0.1g ; time and temp. of reaction : 41 hrs. ; 35°C)

pH	3.5	5	6	7.5	8.5	9.5
NH ₂ -N (mg × 10 ³)	217.1	283.5	297.3	303.3	471.2	419.6

Table 3. The optimal pH value of the proteolytic activity of pyloric caecae of sardine.

(Sample : powder 0.05g ; time and temp. of reaction : 45 hrs. ; 35°C)

pH	2	3	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9
NH ₂ -N (mg × 10 ³)	137.4	83.6	167.2	137.4	173.2	209.0	286.7	246.8

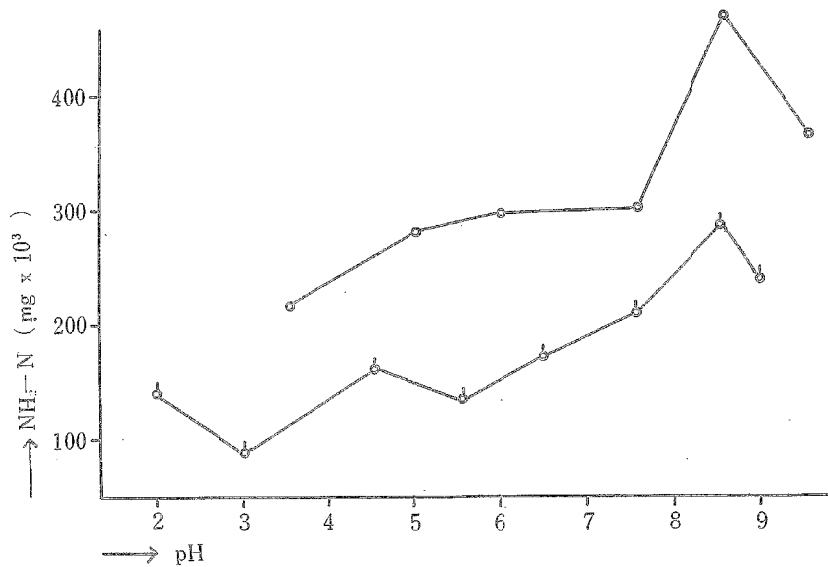


Fig. 2. The optimal pH value of the proteolytic activity of the enzyme solution of pyloric caecae (sardine).

○...Sample used is the powder of 0.1 grams.

△...Sample used is the powder of 0.05 grams.

反応温度は一応35°Cとし、反応時間を41~45時間の長時間とした。反応時間が長いことは細菌の汚染および繁殖等のおそれが充分であるため反応液にはすべてトルオールを5cc宛添加し、且つ時々反応液について検鏡を行なったのであるが、細菌汚染の心配は見当たらなかった。

第1及び2表より明らかなように、生試料を使用した場合も粉末試料を使用した時と同様にそれ等の至適pHは8.5附近であった。大谷・原田¹⁵⁾等のフグ、サバの幽門垂における実験においてはpH8.5を至適pHとしているが、マグロに関しては未だ報告がない。酵素試料としては粉末0.05~0.1gに蒸留水を添加して抽出を行なって全液を50ccとなした抽出液を使用し、その中から5cc宛を5%カゼイン基質にそれぞれ異なるpHで作用させた後、アミノ態および非蛋白可溶性窒素量を測定した。反応時間はイワシの場合と異なりマグロにおいては1時間のような短時間とした。第4表および第3図はその1例を示す。

Table 4. The optimal pH value of the proteolytic activity of pyloric caecae of yellow fin tuna.
(Time and temp. of reaction : 1.5 hrs. ; 35°C)

pH	7	8	8.5	9
NH ₂ -N (cc × 10 ²)	8.4	16.0	18.0	12.1
Non-protein-soluble-N (mg × 10 ³)	3570	3668	3675	3650

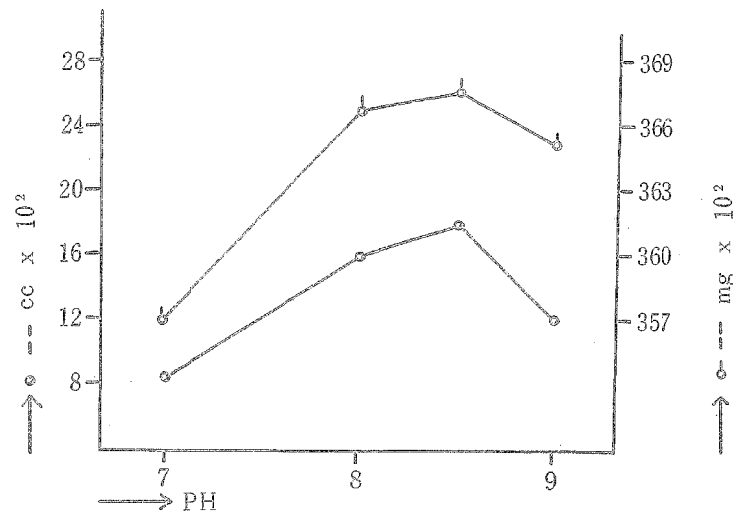


Fig. 3. The optimal temperature of the proteolytic activity of the enzyme solution of pyloric caecae (albacore).

△ ... Non-protein-N
○ ... NH₂-N

上表の結果で明らかなようにマグロ幽門垂プロテアーゼの至適 pH は 8.5 にあることがわかった。即ちイワシ、サバおよびブリのような寒温水帯回遊魚からマグロのような熱帯圏の回遊魚に至るまでそれ等の幽門垂プロテアーゼの至適 pH は同一であることが判明した。

総 括

イワシおよびマグロ幽門垂プロテアーゼの至適 pH は 8.5 付近にある。

第二章 イワシ及びマグロ幽門垂プロテアーゼの至適温度及びその失活

1) 至適温度に就いて

イワシの場合：粉末試料 0.1 g を pH 8.5 に調製した反応液に添加し種々の温度において反応させ生成されるアミノ態窒素を測定して第 1 表および第 1 図の結果を得た。

Table 1. The optimal temperature of the proteolytic activity of pyloric caecae of sardine.
(pH and time of reaction : 8.5 ; 6 hrs.)

Temperature (°C)	5	20	32	35	40	50	60	80
NH ₂ -N (mg × 10 ³)	134	188	267	336	328	239	156	117

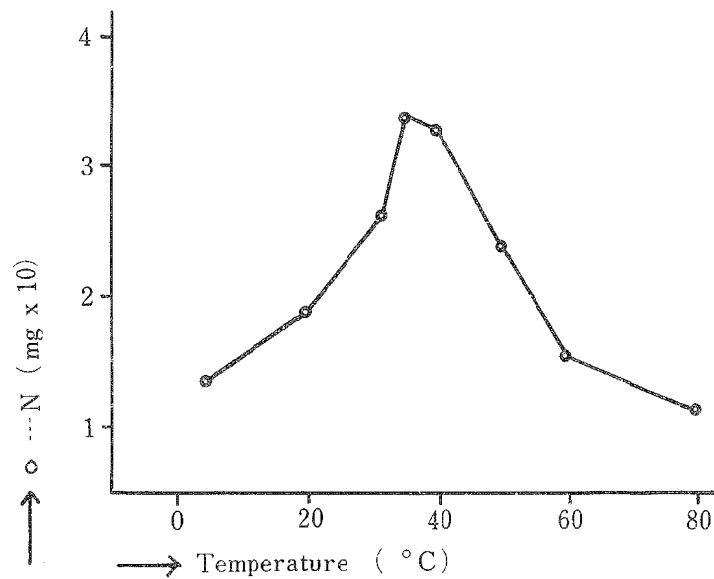


Fig. 1. The optimal temperature of the proteolytic activity of the enzyme solution of pyloric caecae (sardine).
○ ...NH₂-N

上表の結果から反応時間が6時間の場合該酵素の至適温度は35°C附近にあるといえる。しかし反応時間が充分短い場合にも同様な結果を生ずるか否かやはり問題になるので、反応時間1時間の実験を行なった。その結果を下記の第2表および第2図に示す。

Table 2. The optimal temperature of the proteolytic activity of pyloric caecae of sardine.
(pH and time of reaction : 8.5 ; 1 hr.)

Temperature (°C)	30	35	40	45	50
N/100 Na ₂ S ₂ O ₃ (cc × 10 ²)	684.6	675.3	676.5	676.5	676.8

この場合酵素の活性は酵素により生成された非蛋白可溶性窒素量を算出するための N/100 Na₂S₂O₃ の滴定数で示した。上表の結果は35°Cにおいて Na₂S₂O₃ の滴定数が最も少いことを示す。即ち次亜臭素酸により酸化されたNH₂の量が35°Cにおいて最も多いことを示している。即ちイワシ幽門垂プロテアーゼの至適温度は35°C 附近である。

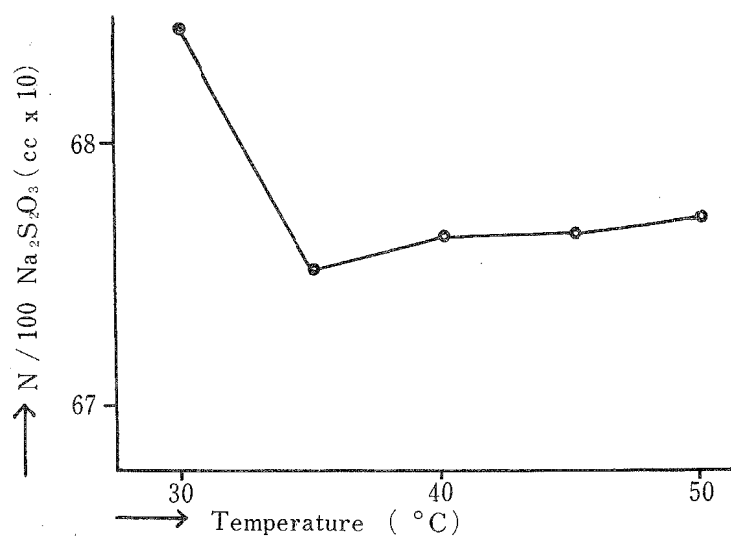


Fig. 2. The optimal temperature of the proteolytic activity of the enzyme solution of pyloric caecae (sardine).

マグロの場合：上記と同様マグロ幽門垂粉末 1 g に pH 8.5 の緩衝液 80 cc を添加し 1 時間抽出後分離した液を酵素試料とした。その結果を第 3 表および第 3 図で示す。

Table 3. The optimal temperature of the proteolytic activity of pyloric caecae (yellow fin tuna).
(pH and time of reaction : pH 8.5 ; 1 hr.)

Temperature (°C)	35	40	45	50	55	60
Act/1cc of enzyme soln.	13.93	14.98	15.43	14.83	14.80	13.70

Note : Act indicates nitrogen (mg or g) in non-protein soluble compounds which were decomposed from casein by action of 1 cc of enzyme solution.

次に同一酵素試料を使用し温度および時間の変化と活性の関連性を検討した結果を第 4 表および第 4 図に示す。

Table 4. The optimal temperature of the proteolytic activity of pyloric caecae (yellow fin tuna).
(Case of the difference of reaction time)

Measurement	Time (hr.)	Temp. (°C)		
		40	45	50
Act/1 cc of enzyme soln.	1	22.300	43.200	41.950
	2	44.050	57.575	56.750
	3	54.925	59.725	59.625

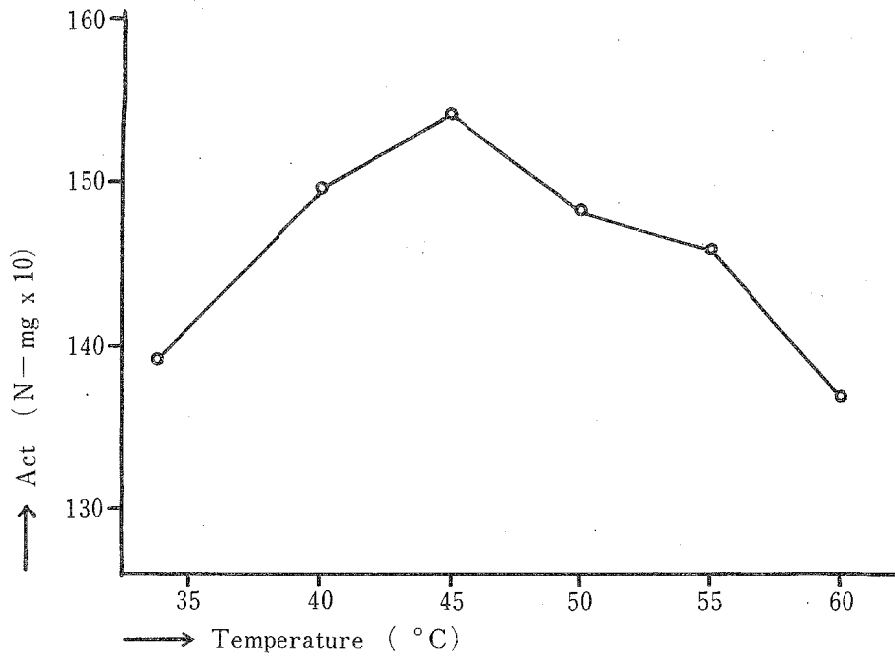


Fig. 3. The optimal temperature of the proteolytic activity of the enzyme solution of pyloric caecae (albacore).

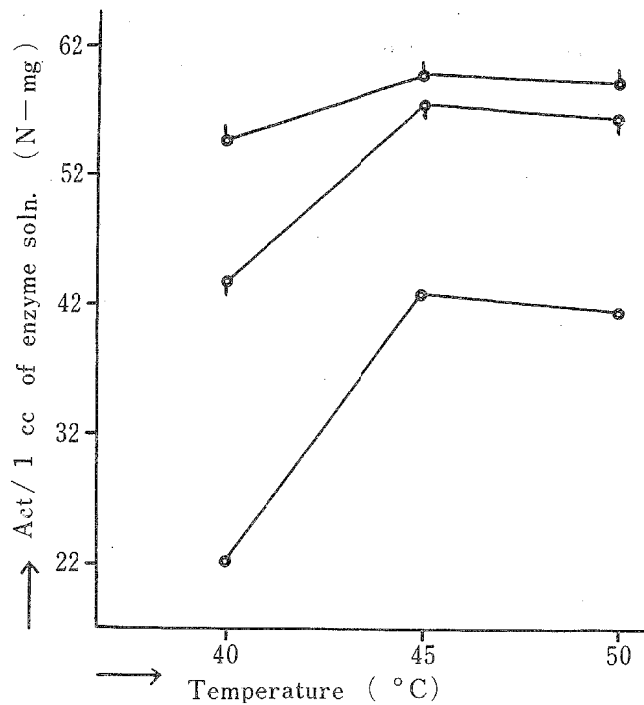


Fig. 4. The optimal temperature of the proteolytic activity of the enzyme solution of pyloric caecae (albacore).

♂ ...Reaction time : 3 hours ♀ ...Reaction time : 2 hours
 ○ ...Reaction time : 1 hour

第3および第4表の結果はマグロ幽門垂プロテアーゼの至適温度が45°C附近にあることを示す。そして同一温度で作用させた場合作用時間が1,2および3時間と長くなるにつれて分解生成量も多くなる。この関係は40~45°Cの範囲においても同一傾向を示している。50°Cの場合は45°Cの値に接近した高い値を示した。大谷・原田¹⁵⁾等のブリ、サバの幽門垂プロテアーゼに関する実験結果はそれ等の至適温度を約40°Cとしたが、著者の場合イワシにおいては35°C、マグロに就いては45°Cの結果を得た。これらの魚類の至適温度がそれぞれ差異を有するものとすれば、いわゆるこれらの魚種の生活環境の水温によって適応的に生ずる差異とも考えられる。

それならば、どのような因子が働いてそのような特性を附与するものであるか、或は又本質的に魚種によりそれぞれ異なる酵素系列のものとも考えられるが、これらの諸点に就いては改めて検討する予定である。

2) 失活温度について

粉末酵素試料に蒸留水を添加後、これを沸騰水中に入れて粉末混合液の温度が95~97°Cに達してから数分間はほぼ同様な加熱条件をあたえた後直ちに35~45°Cに急冷してカゼイン基質溶液に添加して一定条件下で反応させた後にそれぞれ反応生成物を測定した。それらの結果を第5,6表および第6図で示す。

Table 5. Effect of heating on the proteolytic activity of pyloric caecae (sardine).

(Time and temp. of reaction : 20 hrs. ; 35°C)

Time of heating(97°C) (min.)	2	3	6
NH ₂ -N (cc)	0.195	0.175	0.175

Table 6. Effect of heating on the proteolytic activity of pyloric caecae (yellow fin tuna).

(Time and temp. of reaction : 1 hr. ; 45°C)

Time of heating(97°C) (min.)	2	4	6
Non-protein-soluble-N (mg)	8.911	8.254	8.263

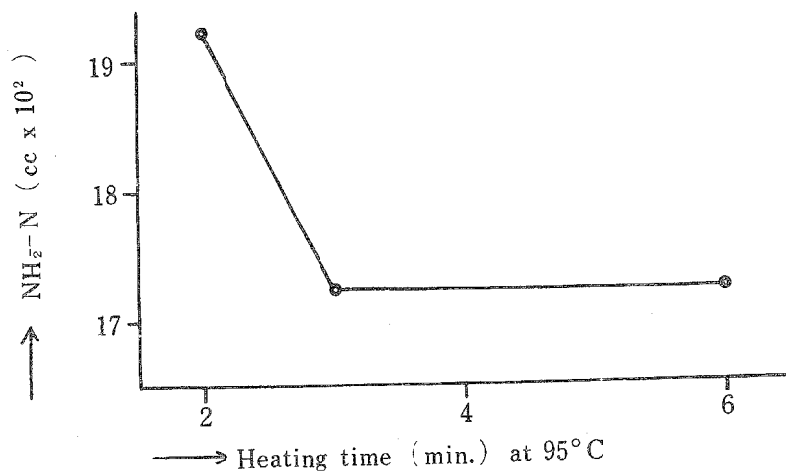


Fig. 5 Inactivation of the proteolytic activity of the enzyme solution of pyloric caecae by heating at 95°C (sardine).

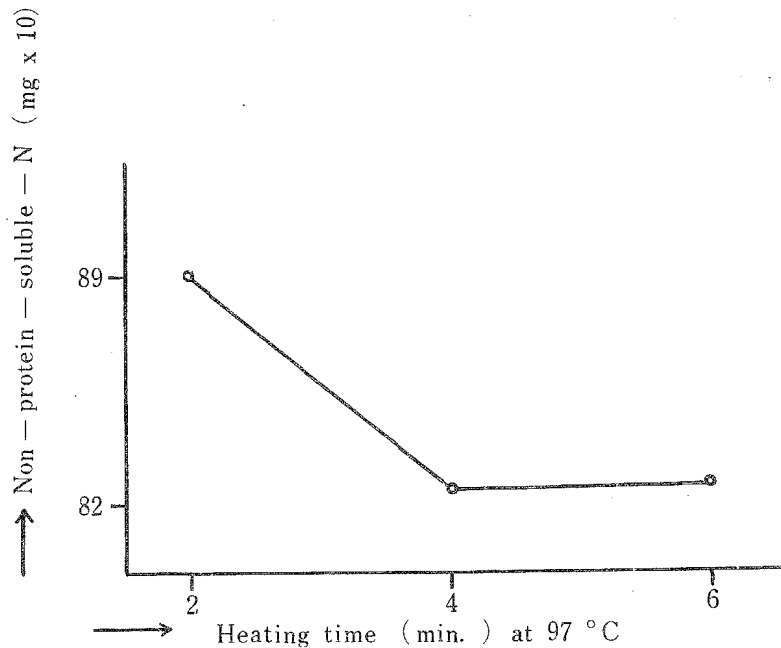


Fig. 6. Inactivation of the proteolytic activity of the enzyme solution of pyloric caecae by heating at 97°C (tuna).

第5, 6表および第5, 6図の結果を見ると酵素液を95°C以上に加熱した場合その温度で3分以上加熱すると窒素量はいずれも一定値を示すに至る。これはこの程度の加熱により酵素活性が完全に阻止されていることを示している。

総 括

- 1) イワシ幽門垂プロテアーゼの至適温度は反応時間1~6時間において35°C附近である。次いで40°Cの場合、強い活性を示し、殆んど35°Cに劣らない。
- 2) マダロ幽門垂プロテアーゼの至適温度はイワシのそれより高く45°C附近を至適温度とした。
- 3) 両魚種共に該酵素の熱に対する失活温度は95°C~97°Cで3分以上の加熱により完全にその蛋白分解力を失活する。

第 三 章 酸、塩基及び有機溶剤のイワシ幽門垂プロテアーゼに及ぼす影響

1) 硫酸添加の影響

この実験は硫酸を添加することにより反応液のpHが低下する場合の該プロテアーゼ活性の変化を検討したものである。

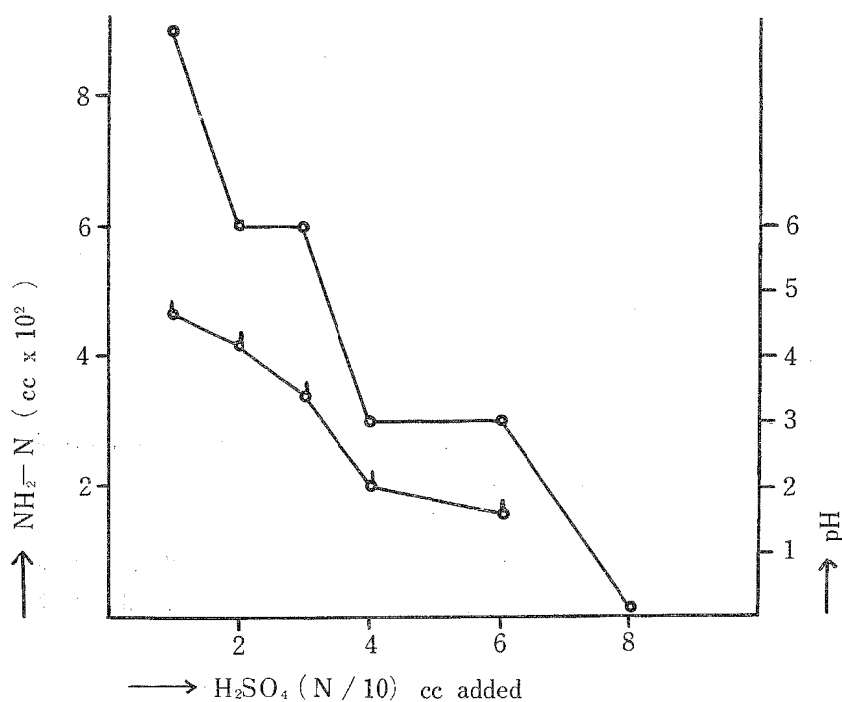
粉末試料0.05gを含む反応液にN/10硫酸液を1, 2, 4, 6, 8および10cc加えてプロテアーゼ活性を測定した。

第1表および第1図はその結果を示す。

Table 1. Influence of sulphuric acid on the proteolytic activity of pyloric caecae (sardine).

(Sample : powder 0.05g ; time and temp. of reaction : 24 hrs. ; 35°C)

Added N/10 H ₂ SO ₄ (cc)	1	2	4	6	8	10
pH in reaction soln.	4.7	4.2	3.4	2	1.6	1.4
NH ₂ -N (cc)	0.09	0.06	0.06	0.03	0.03	0

Fig. 1. Showing the inhibition by adding of H₂SO₄ to the proteolytic activity.

△ ...pH value

○ ...NH₂-N

上表の結果から pH が1.4以下に低下すると活性は完全に止まることが判った。塩酸に就いても同一結果を得た。即ち酵素活性は陰イオンの種類に関係するよりも水素イオン濃度に関係していると見るべきである。

2) 無機塩の影響

a) 塩化ナトリウムの影響

反応液中における NaCl の濃度を下表のようにして各濃度における活性を比較した。

第2, 3表および第2図はその2例を示す。

Table 2. Influence of NaCl on the proteolytic activity of pyloric caecae (sardine).

(Sample : powder 0.05g ; time and temp. of reaction : 30 hrs. ; 35°C ; pH 8.3).

NaCl (%)	0	5	10	15	25	30
NH ₂ -N (cc)	0.97	0.61	0.51	0.49	0.38	0.38
Ratio of activity (%)	100	63	53	51	39	39

Table 3. Influence of NaCl on the proteolytic activity of pyloric caecae (sardine).

(Conditions : the same as table 2.)

NaCl (%)	0	1	10	20	30
NH ₂ -N (cc)	0.62	0.56	0.42	0.33	0.27
Ratio of activity (%)	100	90	68	53	43

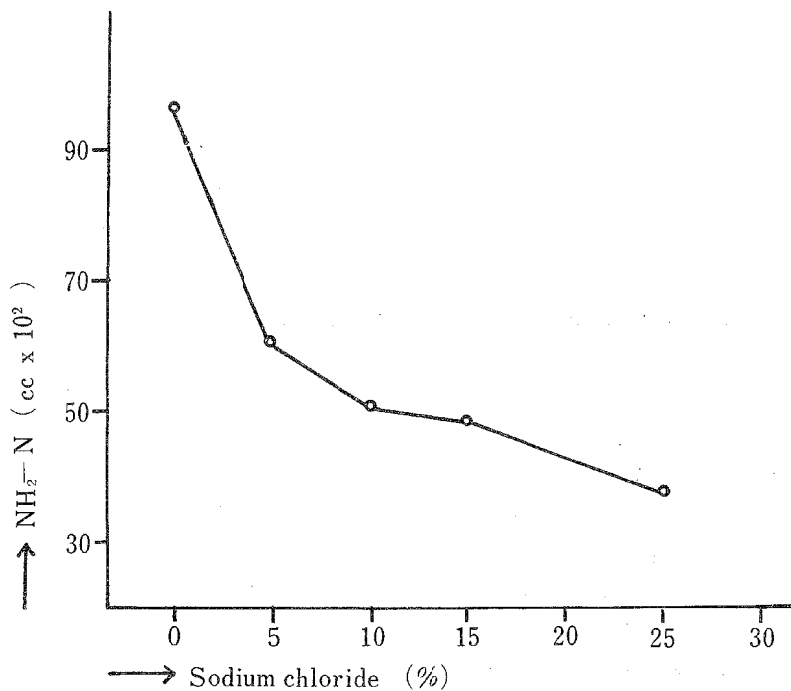


Fig. 2. Showing the inhibition of NaCl to the proteolytic activity.

b) 塩化カリの影響

塩化カリを下表のような濃度になした場合における活性と塩化カリの濃度との関係を示すのは第4表および第3図である。

Table 4. Influence of KCl on the proteolytic activity of pyloric caecae.

(sardine : sample : powder 0.02g ; pH and time of reaction : 41 hrs. ; pH 8.3)

KCl (%)	0	5	10	15	20	25	30
NH ₂ -N (cc)	0.41	0.26	0.23	0.23	0.20	0.18	0.17
Ratio of activity (%)	100	63	56	56	49	44	41

以上の諸表の示すところによれば塩濃度が1%程度の場合プロテアーゼ活性は殆んど影響を受けないが、5%添加では約40%、10%添加では約50%の活性減少を示す。しかして塩濃度がそれ以上増加して25~30%となっても尚40%程度の活性を保持している。

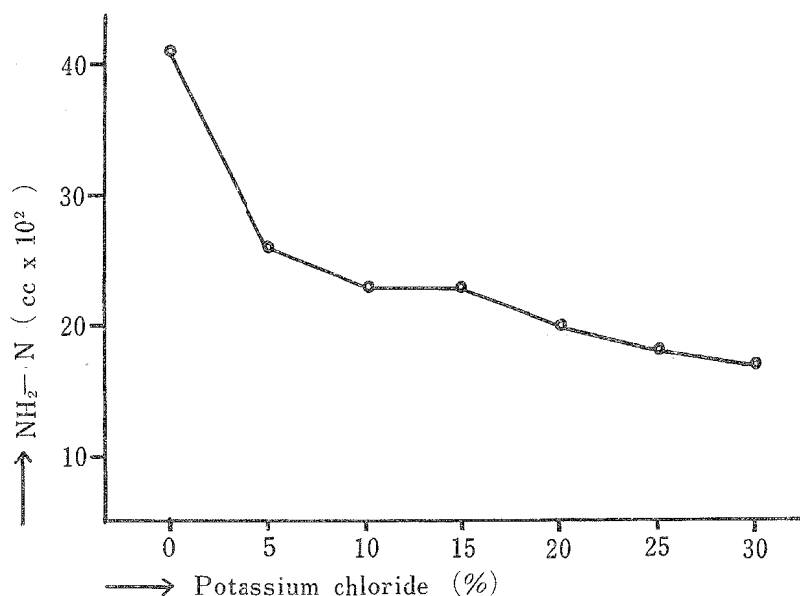


Fig. 3. Showing the inhibition of KCl to the proteolytic activity (sardine).

3) 有機溶剤の影響

a) エチルアルコール (EtOH) の影響

EtOH の諸濃度下におけるプロテアーゼ活性を検討した。即ち第5表で示されるような EtOH 濃度において反応を行なわしめその活性を測定した。第5表を図示すれば第4図のようになる。

第5表および第4図に示されるように EtOH の濃度が大きなるにつれてその影響が大きとなる。即ちEtOH 1~3%位では96~90%の活性を保持するが、EtOH 10%では約70%、15%では約50%の活性となり、EtOH の25~30%では活性は無添加のその約30%に低下した。

Table 5. Influence of ethyl alcohol on the proteolytic activity of pyloric caecae of sardine.

(Sample : powder 0.02g ; time and temp. of reaction : 44 hrs. ; 35°C ; pH 8.5)

Ethyl alcohol (%)	0	1	3	5	10	15	20	25	30
Measurement									
Non-protein -soluble-N(cc x 10 ³)	282	272	255	238	204	153	119	93	80
Ratio of activity (%)	100	96	90	84	72	54	42	33	28

b) アセトンの影響

組織の乾燥粉末製剤を作る場合アセトン処理を行なっているのであるが、アセトンの反応液中における濃度や、その酵素素材との接触時間が酵素の活性に与える影響に就いて明確な報告がないのでこれらの点に就いて検討した。下記の第6表および第5図は反応液中のアセトンの濃度の影響を示し、第7表および第6図は適当の大きさに切断した生の酵素素材を75%より100%に至る各種濃度のアセトン液に5分間浸漬した後、アセトン液を分離し、組織を攪碎し、反応液中に添加し一定時間放置後その活性を測定した成績である。

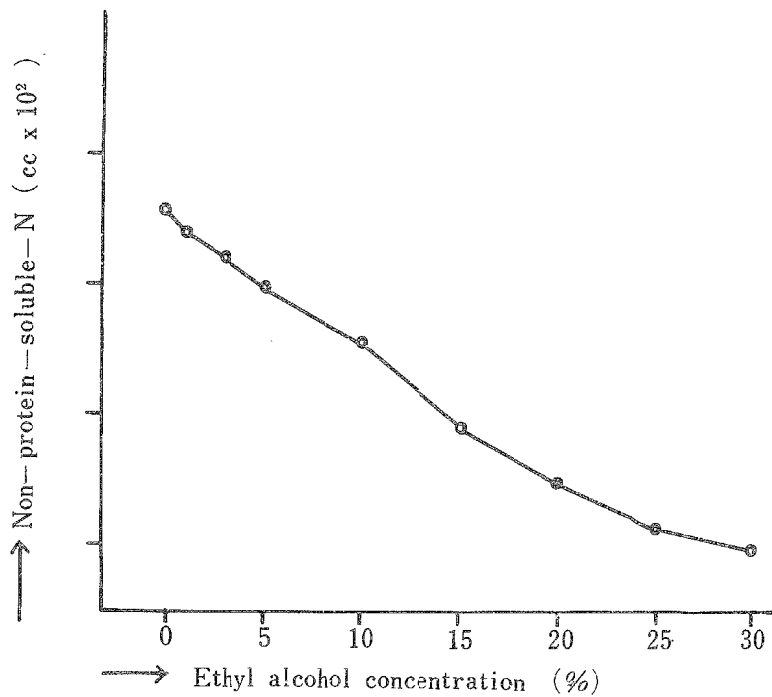


Fig. 4. Showing the inhibition of ethyl alcohol to the proteolytic activity (sardine).

前述のアルコールの場合と同様にバンスライク法によるアミノ態窒素の測定値は過大値を示すので、生成される非蛋白可溶性窒素量を以て活性を示した。第6, 7表および第5, 6図はその結果を示す。

Table 6. Influence of acetone on the proteolytic activity of pyloric caecae (sardine).

(Sample : powder 0.02g ; time and temp. of reaction : 22 hrs. ; 35°C ; pH 8.0)

Acetone (%)	0	1	3	5	10	15	25	30
Non-protein-soluble-N (cc x 10 ³)	188	154	138	137	124	120	104	57
Ratio of activity (%)	100	82	73	73	66	64	55	30

Table 7. Activity of the immersed tissue in acetone of various concentration for 5 minutes.

(Sample : fresh material 1g ; time and temp. : 18 hrs. ; 35°C ; pH 8.3)

Acetone (%)	0	100	95	90	85	80	75
NH ₂ -N (cc x 10 ³)	310	309	309	308	199	163	128
Ratio of activity (%)	100	99.7	99.7	99.4	64.2	52.6	41.3

第6表および第5図の示すところによれば、反応液中のアセトンの濃度が増加するにつれて阻害度を増し、5%濃度で73%の活性を示すが、10~15%濃度では約65%の活性となり30%アセトン濃度の場合30%の活性に低下した。また第7表および第6図の結果から5分間のアセトン浸漬後直ちに溶剤を除去すると90~

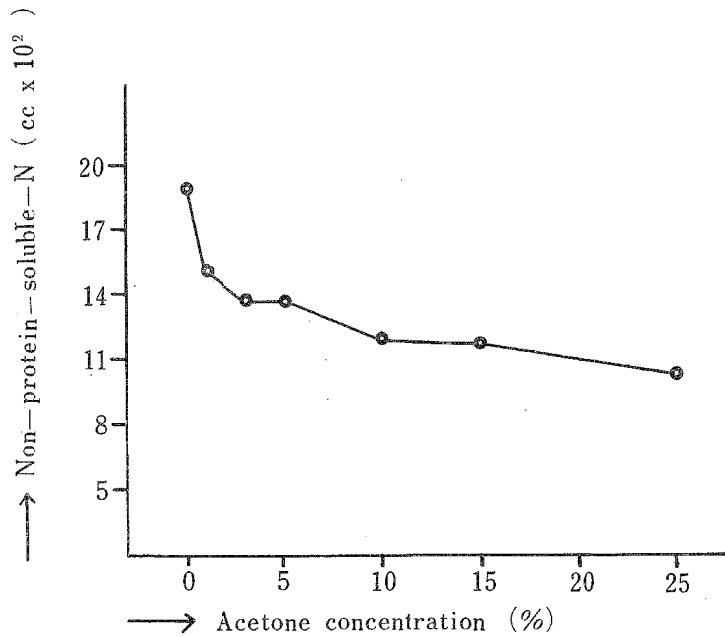


Fig. 5. Showing the inhibition of acetone to the proteolytic activity (sardine).

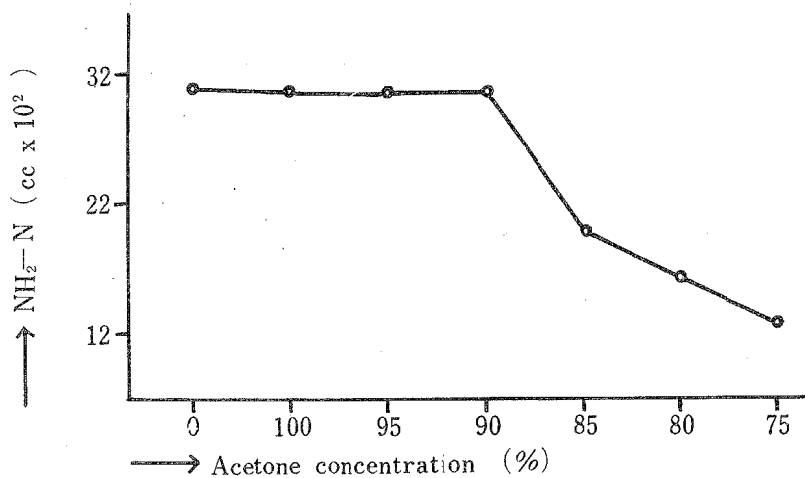


Fig. 6. The losses of protease under the conditions of sample, which immersed in various concentration of acetone.

(註) 第7表の実験では浸漬に用いたアセトンに遠心分離により組織より殆んど完全に分離されるものと見なして活性はアミノ態窒素で測定した。

100%アセトン濃度の場合殆んどアセトンの影響を見ないが、85%アセトン濃度の場合、活性は急激な低下を来す。この低下の程度はアセトン濃度の低下と共に著しくなっている。このことはアセトン溶液に溶出するプロテアーゼ量が水分割合の大となるにつれて増大し、従ってプロテアーゼ量の損失に伴う活性低下の結果を示すものであろう。従って乾燥粉末製剤を作る場合、使用するアセトン液の濃度を90%以上にして使用し5分間以内の浸漬処理を行なえばプロテアーゼの損失を殆んど免れることができると考える。

総 括

1) 魚幽門垂プロテアーゼは硫酸のような無機酸を添加してpHを1.4以下にした場合完全にその活性は阻止される。

2) 塩化ナトリウム、塩化カリのような無機中性塩を添加した場合その濃度が1%の場合90%程度の活性をなし、10%塩濃度で活性の低下甚しくて60%前後となる。しかし塩濃度がそれ以上増加しても思ったほど活性は低下せず、塩濃度30%のとき尚40%程度の活性を保持する。

3) エチルアルコール、アセトンのような有機溶剤の添加の場合、やはりそれ等の濃度の増加に伴い活性は低下するが、両者の阻害作用はその程度を異にする。エチルアルコールでは3%濃度程度で90%程度の活性を保持するが、15%濃度では50%前後に低下する。しかし30%濃度でも尚30%前後の活性を保持する。またアセトンでは1%濃度で既に80%の活性に低下し、15%濃度では60%程度となり、30%濃度ではやはり前者の場合と同様30%程度の活性を保持した。しかしアセトン濃度90%以上の液に5分間以内において浸漬した酵素試料では浸漬による酵素の損失は示されなかった。

第 四 章 魚幽門垂粉末試料より水溶性プロテアーゼの抽出方法に就いて

上述の諸実験においては、できるだけ生体の条件に合致するように生体組織或はそのアセトン・エーテル処理粉末試料をそのまま使用したが、この酵素の本質に関する知見を得るにはより純粋な状態の酵素試料を作ることが必要である。そこで先ず該酵素の抽出に関する2,3の条件を検討した。

a) 抽出時間の影響

粉末試料に蒸留水を加えて50ccとなし、常温で数回振盪しその懸濁液より5~10cc宛を30, 60, 120および240分間隔に取り出してそれぞれグラスフィルターを通して混液中の固形物を除去した後清澄液全液をカゼイン反応液に添加して活性を測定した結果は第1表および第1図ならびに第2表の示すとおりである。

Table 1. Relation of the enzyme quantity to the extraction time.

(Kind of fish : sardine ; time and temp. of reaction : 24 hrs. ; 35°C ; pH 8.5)

Time of extraction (min.)	30	60	120	240
NH ₂ -N (cc)	0.16	0.20	0.22	0.20

Table 2. Relation of the enzyme quantity to the extraction time in case of extraction with distilled water at chamber temperature.

(Kind of fish : albacore ; time and temp. : 7 hrs. ; 35°C)

Extraction time (min.)	30	60	90	120
NH ₂ -N (cc × 10 ³)	48.4	51.0	51.0	50.4

上記2表の結果は次の事を示す。即ち常温で水抽出を行なう場合溶出される酵素量はイワシ、マグロ試料共1時間で一定値に達する。

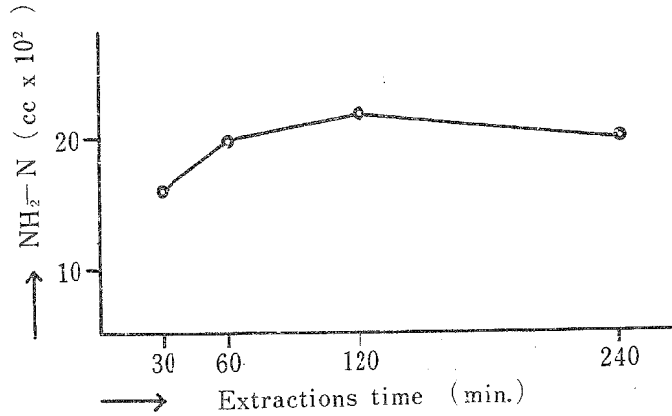


Fig. 1. Showing the relationship between time of extraction and quantity of enzyme.

b) pH の影響

上記の実験においては蒸留水を抽出剤として使用したのであるが、その場合溶液のpHは約6であった。従ってpHの異なる溶液を抽出剤として使用した場合酵素の抽出量にも差異を生ずることは当然考えられるので、各種pHの緩衝溶液（CLARK a LUBS の磷酸加里—苛性曹達，硼酸—苛性曹達混液使用）の一定量を粉末試料に添加し1時間抽出を行ない、次に遠心分離によって上澄液を分離し、その一部をそれぞれカゼイン反応液に添加し pH 8.5 の条件で反応せしめた。また遠心分離した際の残渣たる固形部を数回洗滌した後そのままカゼイン反応液に添加した未溶出酵素の活性を測定した。

この場合添加した緩衝液の塩の種類およびその濃度の差異が酵素の抽出に及ぼす影響をも考慮すべきであるが、これは後日検討することにしてここでは単にpHの関係のみを考慮することにした。

得た結果は第1表、第1図および第2表で示す。

Table 1. Enzyme quantity extracted at various pH values of buffer solution.
(Kind of fish : albacore)

pH value of buffer solution	5.8	6.8	8.5	8.9
NH ₂ -N (cc x 10 ²)	18.4	21.0	23.4	21.0

Table 2. Relation between the water-soluble protease and the so-called remaining protease.
(Kind of fish : sardine ; time and temp. : 24 hrs. ; 35°C)

pH value of extraction	3.5	5.8	8.5	9
Soluble-protease NH ₂ -N (cc)	0.24	0.26	0.33	0.31
Remaining-protease NH ₂ -N (cc)	0.03	0.05	0.05	0.04

次に組織に残存する酵素は単に組織の攪碎等の簡単な方法によっては完全に水抽出できないことがある17)。従って幽門垂の粉末粗剤からどの程度水抽出が可能であるか予め知っておくことは必要である。そこ

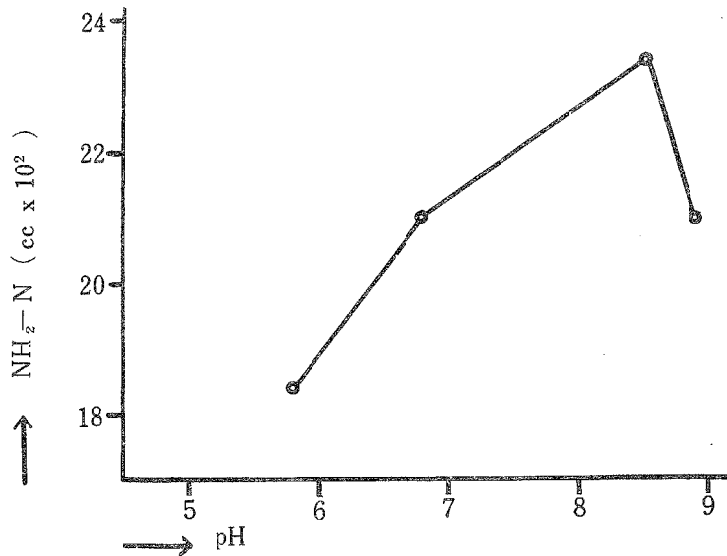


Fig. 1. Showing influence of the pH value on the extraction of the protease.

で粉末試料の0.05 g を各種 pH の緩衝液で 1 時間抽出後遠心分離を行なって上澄液部と固形部を別々にカゼイン反応液に添加してそれぞれの活性を測定比較した。次の第 3 表はその結果を示す。

Table 3. Relation between the water-soluble protease and the so-called remaining protease.
(Kind of fish: albacore; time and temp. 7 hrs. ; 35°C)

Measurement	Division	Liquid portion (Water-soluble protease)	Solid portion (Remaining protease)
NH ₂ -N (cc x 10 ²)		50.0	16.0
Ratio of activity (%)		76	24

第 1 表および第 2 表の結果で明らかなように各種 pH 溶液による酵素の抽出量は pH8.5 のとき最も多い。また第 3 表の示すように pH8.5 における水溶性および未抽出残存プロテアーゼの比は 50 : 16 であった。従って可溶性プロテアーゼと残存プロテアーゼの和 (全作用力) を 100 とすれば可溶性プロテアーゼは 76、残存プロテアーゼは 24 となる。即ち可溶性として全プロテアーゼの 76 % が得られたことになる。

総 括

- 1) 粉末粗試料より常温で水抽出を行なう場合、溶出される酵素量は 1 時間で一定値に達する。
- 2) 各種の異なる水素イオン濃度緩衝溶液で抽出を行なうとき pH 8.5 において酵素の抽出量は最も大きい。
- 3) 抽出された酵素量は粉末試料の有する全酵素量の約 76 % であった。そして組織になお 24 % のプロテアーゼが残存することが示された。

第 五 章 該酵素の反応速度恒数に就いて

粉末試料 0.1 g を水 50 cc で抽出し、その上澄液より 5 cc 宛をカゼイン反応液に添加してそれぞれ 30, 60,

180, 360および1,200分間反応させた後一次反応式に従って反応速度恒数を求めた。

第1表および第1図はそれらの実験結果を示すものである。

Table 1. Velocity constant calculated by means of the reaction formula of the first order.

Time of reaction (min.)	30	60	180	360	12,00
NH ₂ -N in reaction soln. (mg × 10 ³)	850.2	1650.4	4251.0	5951.4	11619.4
k × 10 ⁵	237.2	238.6	233.8	181.6	101.1

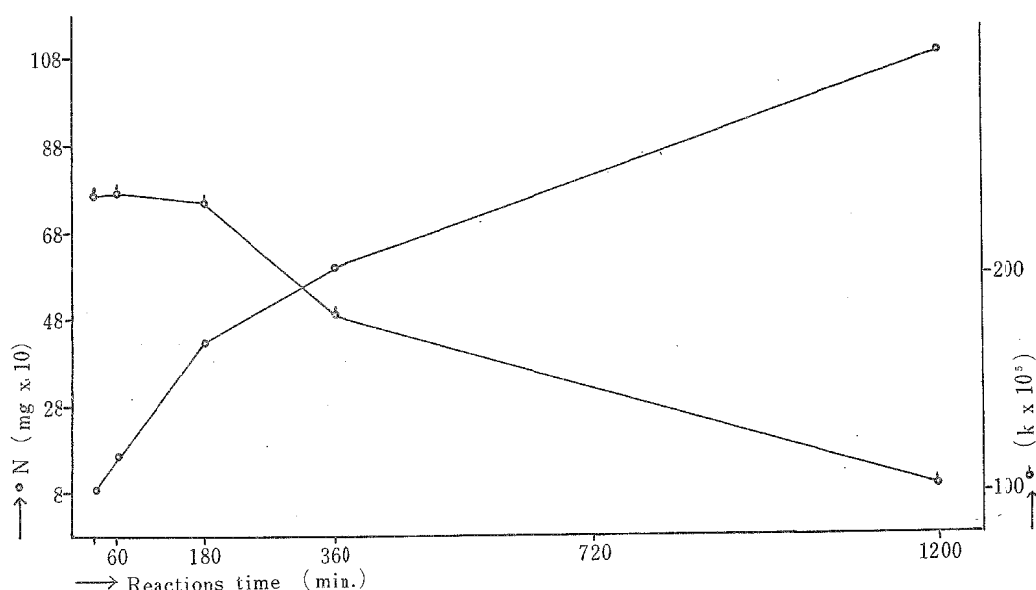


Fig. 1. Showing the relationship between time of reaction and precipitate, and the velocity constant according to the reaction formula of the first order.

○...Amino-N

△...Velocity constant

次に新鮮なイワシ幽門垂 15 g を搗碎し 60 cc の水を加えて浸出し遠心分離を行ないその上澄液 5 cc を反応液に添加し、一定反応時間後それぞれの反応液の NH₂-N を測定して反応速度恒数を算出した。その成績は第2表および第2図のとおりである。

Table 2. Velocity constant calculated by means of the reaction formula of the first order.

Time of reaction (min.)	60	90	120
NH ₂ -N in reaction soln. (mg × 10 ³)	821.86	1020.24	1076.92
k × 10 ⁴	181.9	182.2	170.1

以上の2表の結果を総合すれば反応速度恒数は90分までは一定値を保ち、それより180分に至るまではやや低下を示す程度ではあるが、ほぼ前者に近い恒数を示す。しかし360分に至るとかなり低下した恒数とな

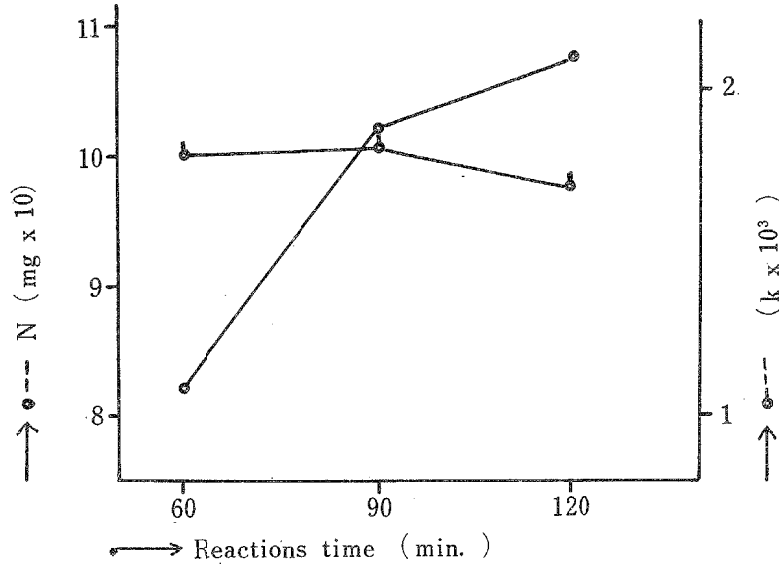


Fig. 2. Showing the relationship between time of reaction and precipitate, and the velocity constant according to the reaction formula of the first order.
 ○...Amino-N
 ◊...Velocity constant

り1,200分時の恒数値は60分時のその1/2以下となった。これよりみて反応時間180分までは一次反応式に従って反応は進行するものであると考えることができる。

総 括

魚幽門垂プロテアーゼの反応速度恒数を一次反応式に従って算出したところ、180分位まではほぼ一定値を保持するが、それ以上になると時間の経過と共に減少する。

第 六 章 プロテアーゼに対する硫酸の沈澱能及び生成沈澱物の酵素活性

1) 硫酸の濃度と沈澱生成量

マグロ幽門垂の粗酵素粉末よりの水抽出液の各5ccにpH5.2の緩衝液(MCILVAINE)をそれぞれ32cc宛添加し氷水で冷却した後固形硫酸を添加してそれぞれの硫酸濃度を1/4, 1/2 および3/4飽和度になるようにする。直ちに沈澱を生ずるのでこれを濾別しそれぞれの飽和度の硫酸液(液温0°C)で数回洗滌した後、5%の三塩化酢酸液でその濾液にNH₄の反応が消失するまで洗滌する。沈澱を濾紙と共に硫酸分解してその窒素量を測定した(A)。

また別に前記の各種濃度の硫酸処理を行なって得た沈澱をカゼイン反応液に添加して一定条件下で作用させた後、三塩化酢酸を添加して酵素作用を止め、未消化カゼインを沈澱させ然る後濾別し、以後(A)と全く同様に処理して得る沈澱を硫酸分解してその窒素量を測定した(B)。

以上の結果を示すと、第1表および第1区のとおりになる。

Table 1. Precipitate from enzyme solution by adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of various concentration and its activity.

Saturation degree of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1/3	1/2	3/5	Non-adding (control)
Content of protein-nitrogen in 1 cc of enzyme soln. ($\text{mg} \times 10^3$)	865.0	927.8	1036.0	
Content of nitrogen in indigested casein coagulated by adding CCl_3COOH ($\text{mg} \times 10^3$)	5546.5	3423.0	3236.5	3074.6

Note:Casein solution added as substrate contains 6.1436mg of protein-nitrogen.

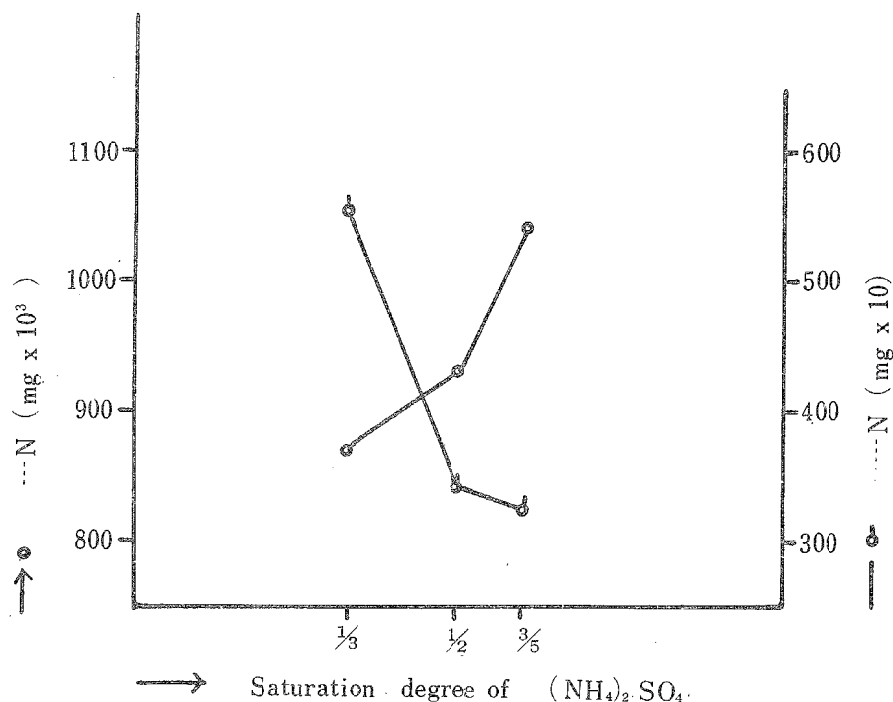


Fig. 1. Showing the precipitate by adding of various concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to enzyme solution and its proteolytic activity.

- ...Protein-N
- ...Indigested casein-N

第1表(A)の示すとおり硫酸の濃度が増加するにつれて沈澱量も増大しこの実験の範囲では%飽和度で最大値を示した。そしてこれらの沈澱中%飽和度のものが対照値と殆んど等しくなるような活性を示し1/3のものが最も弱い。また(B)の結果によると(A)の窒素量に比例して未消化カゼイン量は減少し%飽和度の場合には硫酸無処理の活性(対照)の約95%の酵素力を示した。

以上の事実から酵素蛋白質は%飽和度の時最も多く沈澱している。そして全酵素量の95%が沈澱として捕捉されていることは明らかである。

2) %飽和度硫酸により沈澱する酵素活性の量

前実験によって%飽和硫酸濃度の場合全酵素量の95%程度の活性を捕捉できることが判明したが、この窒素化合物の量は抽出溶液中の全蛋白窒素量の何%に相当するかを明らかにするためにこの実験を行なった。即ち三塩化酢酸により沈澱する蛋白窒素量に対して硫酸により沈澱する窒素化合物量を比較した。

第2表はその結果を示す。

Table 2. Nitrogen content in precipitate with trichloroacetic acid and ammonium sulphate.

Precipitant	(NH ₄) ₂ SO ₄ saturated to 3/5	CCl ₃ COOH concentration of 5%
Nitrogen content (mg × 10 ³) in 1 cc enzyme soln.	147.12	214.31

上表の示すところによると%飽和度硫酸による沈澱性窒素量は全蛋白窒素量の約70%であった。

3) 硫酸(%飽和度)沈澱の反復による酵素活性の失活の有無

前実験から1回の硫酸処理により原酵素溶液の酵素活性の95%前後を回収し得ることが明らかとなったが、酵素の精製を行なう場合硫酸の反復処理が有利であるか否かの点を追及するためこの実験を行なった。酵素溶液に%飽和度になるよう固形硫酸を添加して沈澱を生ぜしめ、その沈澱を溶液より分離して完全に(NH₄)₂SO₄を除去した後、再びpH7の緩衝液(MCILVAINE緩衝液)に溶かして再び元の酵素液量としてその一部を使用して活性および蛋白質量を測定した。残液に就いて再び同様な処理を繰返して沈澱を生成しそれを溶かして元の容量にして活性および蛋白質量を測定すること上述と全く同様にする。これらの結果は第3表のとおりである。なお実験に用いる溶液はすべて氷水中に浸して0°C近くにして使用した。

Table 3. Repeating of precipitation by means of adding (NH₄)₂SO₄ and its activity.
(Kind of fish : albacore)

Division	Original	1st. ppt.	2nd. ppt.
Measurement			
(A) Nitrogen in 1 cc enzyme soln. (mg × 10 ³)	288.5	230.3	243.4
(B) Act/1 cc of enzyme soln.	31.35	30.79	30.87
(C) Act/1 mg of protein-N	108.7	133.7	129.8

第3表の結果によると(A)の実験において1回の処理により窒素量は若干減少する。これは非蛋白窒素および一部の蛋白窒素が沈澱しないことによるものである。従って酵素蛋白質も一部失われるわけで(B)の結果はこれを示している。しかして硫酸の処理は1回で充分で、2回処理のものも1回目と殆んど同じ窒素および活性を示し、その活性は原酵素液の約98%を示した。従って又窒素1mg当りの活性を比較すると(A)および(B)の結果から当然のことながら原液に対し逆に活性の上昇を示した(C)。そして1回および2回処理の両結果も殆んど同一値であると見てよい。以上の結果をまとめると硫酸処理により非酵素窒素化合物はかなり良く除去され、その結果窒素1mg当りの活性は上昇する。且つ硫酸はプロテアーゼ活性に対し殆んど阻害作用を示さないし又硫酸処理は1回で充分であるといえる。

総 括

1) ビンナガ幽門垂プロテアーゼに対する硫酸の沈澱能を検討したが、pH 5.2で硫酸の飽和度を1/3, 1/2および3/5とした場合、%飽和度で最も多量の沈澱を生ずる。

2) この条件において全酵素化合物の95~98%が捕捉回収された。

3) 硫酸による沈澱性窒素量は酵素液中の全蛋白窒素量の約70%であった。

4) 硫酸の1回の塩析により酵素活性 (Act/1 mg 蛋白窒素) は上昇を示し、しかも塩析を反復してもその値は殆んど変化しない。即ち塩析は1回で充分であり且硫酸は活性に殆んど阻害作用をあたえない。

第七章 アセトンの沈澱能及び生成沈澱物の活性

アセトンは従来酵素の分画および精製等によく使用せられているので著者もアセトンの各種条件下における該酵素の行動につき基礎的知見を得るため実験を行なった。

1) アセトン添加による沈澱生成量及びその蛋白分解酵素活性

粉末粗酵素剤0.5 gを20 ccのpH 8.5の緩衝液 (CLARK a LUBS) にて1時間抽出を行なって得られる酵素溶液からそれぞれ3 cc宛を使用してそれらに一定量の蒸溜水およびアセトンを加えてアセトン濃度をそれぞれ30, 50, 60および80%とするとそれぞれ沈澱を生ずる。同一濃度のアセトン液で数回洗滌した後、沈澱を少量のpH 7の液に溶かして基質カゼイン溶液に添加して全反応液のpHを8.5に調製した後所定のように反応させてその活性を測定した。また同時に別に同一条件で作ったそれぞれの沈澱を硫酸分解して窒素量を測定した。以上の実験の結果は第1表および第1図のとおりである。なお酵素の抽出は常温で行なうが、その他の処理は使用溶液をすべて氷水中で0°Cとなしたもので操作した。

Table 1. Nitrogen content in enzyme solution precipitated with acetone of various concentration and its proteolytic activity (albacore).

Acetone concentration (%)	30	50	60	80
Nitrogen content in precipitate (mg × 10 ³)	106.5	226.3	244.4	618.9
Act/1 cc of enzyme soln. (mg × 10 ³)	2968.8	7673.3	9968.3	10288.3
Act/1 mg of protein-N	28.0	33.9	40.1	16.6

第1表の結果から次の事が明らかである。即ちアセトンの濃度が増大するにつれて酵素溶液よりの沈澱生成量 (窒素量) も次第に増大し、この実験条件の範囲では約80%の場合最大量を示した。而して酵素活性もこれに準じてその絶対量が80%濃度の場合最も大きいことを Act/1 cc 酵素液の数値が示している。しかるに60%濃度の場合全窒素量は80%のその約4/5程度に拘らず、酵素液1 ccに対する活性は殆んど同じで、しかも窒素1 mgに対する活性は逆に60%濃度附近が最も強く、50%および30%濃度の場合がこれにつづき、80%の場合最低値を示した。以上のことから80%濃度では酵素および酵素以外の蛋白質共に最も多く沈澱することを示す。これに対し60%濃度附近では酵素以外の蛋白質の沈澱量は80%濃度の場合に比べて少なく、且つ酵素の沈澱量は80%濃度のそれに比べて殆んど差のないことを示している。従って Act/1mgN で比較すると60%濃度の場合が最高値を示したことは当然で逆に80%濃度では活性は弱くなり、しかもこの場合最低値であった。

2) アセトンによる酵素の分画

前述の実験から酵素はアセトン濃度によりその沈澱を異にし、且つ不純物蛋白質の量にも変化を生ずることを知ったので更にアセトンによる分画を試みた。即ち一定量の酵素溶液にアセトンを添加して30%とし、この時生じた沈澱の酵素活性および窒素量を測定し、次にこの沈澱を除去した濾液に更にアセトンを添加し

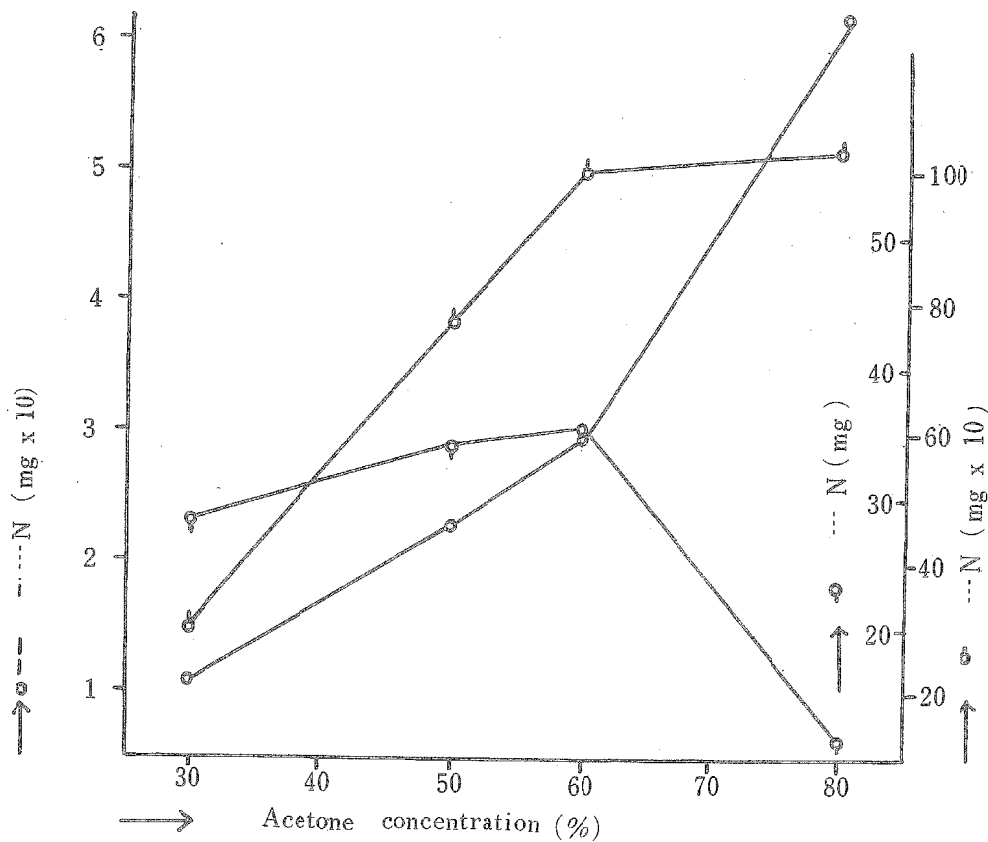


Fig. 1. Showing the precipitate by adding of various concentration of acetone to enzyme solution and its proteolytic activity.

- ...Ppt-compound-N
- △...Act/1 cc of enzyme soln.
- ...Act/1 mg of N

て全アセトン濃度を60%とし、生じる沈澱を前回同様に処理して再びその濾液にアセトン添加して80%とし、生じた沈澱も前二者と同様に処理して得た結果を示すと第2表および第2図のとおりである。

Table 2. Nitrogen content in enzyme solution precipitated with acetone of various concentration and its proteolytic activity (albacorl).

Range of acetone concentration of each fraction (%)	0~30	30~60	60~80
Nitrogen content in precipitate (mg × 10 ³)	105.7	114.7	509.5
Act/1 cc of enzyme soln. (mg × 10 ³)	3398.8	11171.9	8638.6
Act/1 mg of protein-N	32.2	97.4	16.9

第2表の結果から沈澱物中の窒素量は60~80%分画最も多く、30~60%分画は0~30%分画と殆んど同じで60~80%分画の約4~5倍に過ぎなかった(A)。しかるにAct/1cc酵素液は30~60%分画最も強く60~80%分画が之に次いで前者の約80%の活性を示した(B)。

またAct/1mgNを比較すると30~60%分画が断然他区を引き離して最高値を示し60~80%分画は逆

に最低値を示した (C)。以上のことから酵素は30~60% 分画最も多く60~80% 分画がこれに次ぎ、0~30% 分画には最も少ない (B)。しかるに酵素以外の蛋白質は60~80% 分画が断然多く次に0~30% 分画で30~60%分画は最も少ない (A)。したがって (C) のような結果が生じたのであろう。

以上の結果に基づいて更に60%アセトン濃度を中心にしてより詳細な分画実験を行なった。即ち更に細かく10%宛の差異を有する40~50, 50~60および60~70%アセトン濃度分画における沈澱生成量およびその活性について測定を行ない第3表および第3図のような結果を得た。

上図表の結果から生成沈澱物は60~70% 分画最も多く50~60% 分画これに次ぎ、40~50% 分画最も少ない。しかるに Act/1 cc 酵素液は50~60% 分画が最も多いが60~70% 分画も殆んどこれに劣らず、40~50% 分画ははるかに低い値を示した。しかして Act/1 mgN では50~60% 分画が最高で40~50%分画これに次ぎ、60~70% 分画は最低値を示した。以上のことから50~60%分画と60~70%分画に含まれる酵素蛋白質は殆んど同量で40~50% 中にはその約1/2程度が含有されている。しかるに60~70% 分画には酵素以外の蛋白質が他分画に比べて非常に多量に含有されているために Act/1 mgN は表のような低い結果を示すに至ったのであろう。

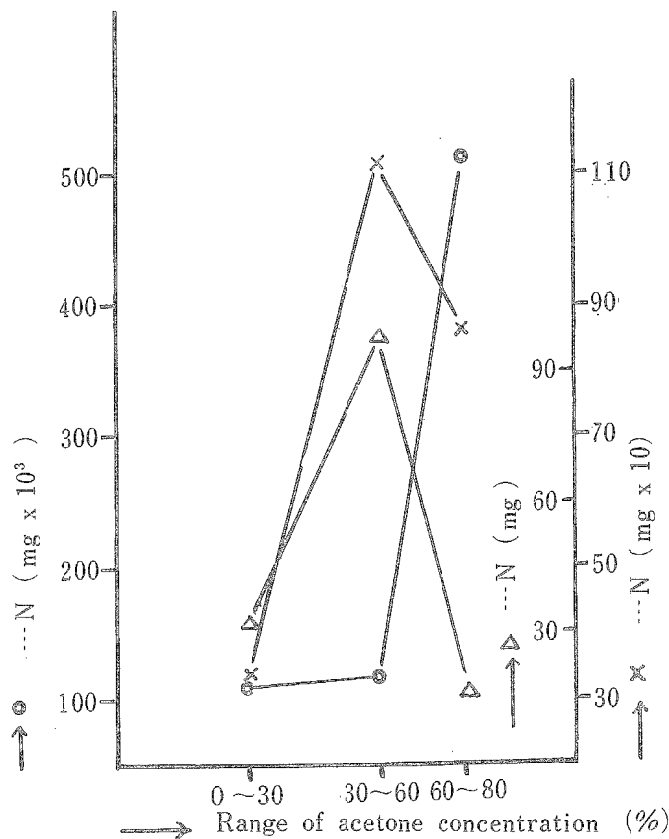


Fig. 2. Showing the precipitate by adding of acetone of various range concentration and its proteolytic activity.

- ...Ppt-compound-N
- × ...Act/1 cc of enzyme soln.
- △ ...Act/1 mg of N

Table 3. Nitrogen content in enzyme solution precipitated with acetone of various concentration and its proteolytic activity (albacore).

Range of acetone concentration of each fraction (%)	40 ~ 50	50 ~ 60	60 ~ 70
Nitrogen content in precipitate (mg × 10 ³)	22.9	53.1	83.2
Act/1 cc of enzyme soln. (mg × 10 ³)	1868.3	5352.3	5320.4
Act/1 mg of protein-N	84.6	100.8	63.9

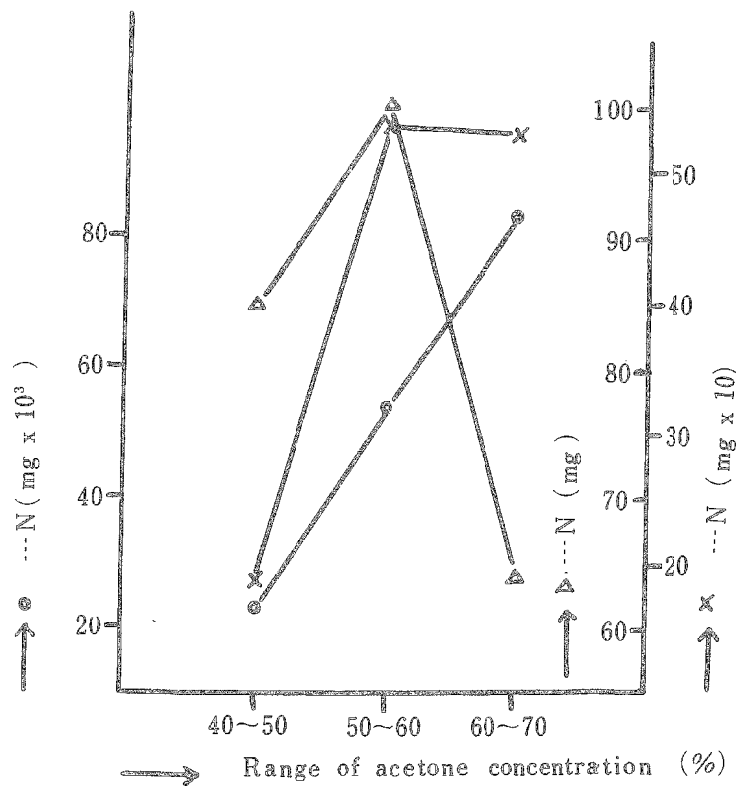


Fig. 3. Showing the precipitate by adding of acetone of various range concentration and its proteolytic activity.

- ...Ppt-compound-N
- × ...Act/1 cc of enzyme soln.
- △ ...Act/1 mg of N

総 括

ビンナガ幽門垂粉末粗試料の水抽出酵素液にアセトン添加して種々のアセトン濃度溶液を作りプロテアーゼの分画試験を行ない次の結果を得た。

1) アセトン添加による酵素抽出液よりの沈澱物の窒素含量はアセトン濃度の増加に伴い増加し実験の範囲では80%で最高値に達した。しかし酵素液1cc当りの活性は60%および80%共に殆んど同値を示し、窒素1mg当りの活性は60%の場合最高値を示し、次いで50, 30および80%の順であった。

2) 更にアセトン濃度が40~50, 50~60および60~70%の場合における沈澱物の窒素量とそのプロテアーゼ活性の関係を求めたところ50~60%および60~70%分画に含まれる酵素蛋白窒素量は等しく、40~50%分画にはその1/3程度が含有される。しかし60~70%分画は非活性蛋白質を他分画のそれに比して多量に含有する。従って Act/1 mgN は最低値を示した。また40~50%分画は非活性蛋白質の含有が少ないため酵素の含有が少ないのかかわらず比活性は相当高い値を示した。

第 八 章 試料粗酵素標品と市販トリプシン標品 (粉末) との活性の比較

マグロおよびイワシ幽門垂をアセトン・エーテル処理し粉末化した粗酵素試料がどの程度の酵素活性を有するかを知ることは特に酵素の純化精製等を行なう場合の基礎データともなるので、現在市販されているトリプシン製剤 (メルク製, 白色粉末) とその活性を比較した。即ちそれぞれの粉末試料 (0.2 g) に pH 8.5 の緩衝液 20 cc を添加し常温で1時間抽出し遠心分離により得た上澄液の一部を酵素試料として

Act/1 cc 酵素液および Act/1 mgN を求めた。

実験の1例を示すと第1表のとおりである。

Table 1. Comparison of the proteolytic activity of pyloric caecae of tuna (yellow fin tuna) and sardine with that trypsin preparation.
(Time and temp. of reaction: 1 hr. ; 40°C)

Sample	Tuna	Sardine	Trypsin preparation
Act/1 cc of enzyme soln. (mg × 10 ³)	14417.3	6932.5	12243.5
Protein-N/1 cc of enzyme soln. (mg × 10 ³)	262.26	107.16	178.60
Act/1 mg of protein-N	54.97	64.73	68.55

次に両試料のそれぞれ0.05gに pH8.5の緩衝液50ccを添加抽出して稀薄な酵素抽出液を酵素試料としてその20ccを使用して18時間の長時間反応させた。その結果の1例は第2表のとおりである。なおこの場合飽和フラスキン液10ccおよびトルオール5ccを添加して細菌の汚染を防止した。

Table 2. Comparison of the proteolytic activity of pyloric caecae of tuna (yellow fin tuna) with that of trypsin preparation.
(Time and temp. of reaction: 18 hrs. ; 40°C)

Sample	Tuna	Trypsin preparation
Act/1 cc of enzyme soln. (mg × 10 ³)	2949.3	2267.8

更に両試料につき pH 5 および 8.5 の条件における活性を比較して第3表の結果を得た。

第1表および第2表の結果から Act/1 cc 酵素液はマグロの方が強力であり、これは反応時間が1時間および18時間という長時間の場合にも同一結果であった。しかるに Act/1 mgN に就いてはマグロはトリプシン製剤の約80%の値を示した。これはマグロ酵素抽出液の方が蛋白窒素量を多量に含み、しかも非活性

Table 3. Comparison of the proteolytic activity of pyloric caecae of tuna with that of trypsin preparation.
(Time and temp. of reaction : 1hr. ; 40°C)

Measurement	pH	Sample	Tuna	Trypsin preparation
		Act/1 cc of enzyme soln. (ng × 10 ³)	5	6037.0
	8.5	10302.5	9895.0	

蛋白質が多いことを示すもので、勿論この試料に関しては当然の結果である。また反応溶液のpHが活性に及ぼす影響を見るとpH5の場合、マグロにおいてはpH8.5の場合の活性の60%を保有した。これに対しトリプシン製剤ではpH8.5の活性の40%に過ぎなかった。トリプシン製剤は非活性蛋白質を相当除去したものであり、いわゆるトリプシン酵素としての精製を行なったものであるから酸性側ではpHに対し非常に鋭敏に活性の低下を示すものであろう。しかしてマグロの場合酸性側でも相当の活性を有することに就いては、この粗酵素液がいわゆる各種の酵素の混合であって酸性で強く作用するものを含有するのか、或はpH8.5で強力な活性を示す同一酵素が酸性側でも尚活性を発揮し得るかの2つが考えられる。この点に関しては今後追究する予定である。

またイワシについて述べるとそのAct/1cc酵素液はマグロのその1/2以下であった。これは酵素抽出液中の蛋白質窒素がマグロのその半分以下という値を示したことから推察されることである。

実験は両魚種とも同一処理の粉末試料を使用したのであるからマグロの幽門垂はイワシのその約倍量の蛋白分解酵素を含有することは明らかである。しかしてAct/1mgNを比べるとイワシの方がやや強く示されたが殆んど同一とみてよい。即ちマグロの粉末試料はその水抽出液中にイワシのその2倍以上の蛋白質を含有しているがAct/1mgNの値から考えるとイワシのそれと組成的には同一傾向にあるといえる。

総 括

- 1) マグロ幽門垂より作った粗酵素標品よりの水抽出液の活性は1時間および18時間の作用時間においても市販トリプシン製剤(メルク製、白色粉末)より強力であった。しかし酵素液中の蛋白質窒素1mgに対する活性はトリプシン製剤の80%程度であった。
- 2) イワシの試料に就いても大体マグロの場合と同一傾向であった。
- 3) pH5のような酸性においてもpH8.5の場合の60%の活性を保持した。
- 4) マグロ幽門垂より作った粗酵素粉末はイワシ幽門垂のその倍量のプロテアーゼを含有する。しかし水抽出液中の蛋白質窒素1mgの有する比活性は殆んど同じであった。

第 九 章 マグロ幽門垂プロテアーゼに対する抗菌性物質の影響

プロテアーゼの研究において基質分解の反応時間が短い場合はあまり問題はないが、長時間になる場合には混入細菌の繁殖、従ってその細菌による基質の分解、或は細菌自身がプロテアーゼを分泌する等の危険が考えられる。それ等を防止するため種々の無機および有機薬剤が使用されるわけであるが、魚類プロテアーゼ活性に対する抗菌剤の影響に就いては未だ研究報告がない。

1) フラスキン Furaskin (5-nitro-2-furfural-semicarbazone) の影響に就いて

フラスキン(F)は防腐剤として水産加工品としては練製品等に混入使用され良い成績を示している。F

の飽和液 10 cc を予めカゼイン反応液に添加したものに酵素液を加えて全反応液を 50 cc (F の濃度 : 1 / 20,000) とする。常法のとおり処理して第 1 表, 第 1 図を得た。勿論すべてトルオール 5 cc 宛添加した。

Table 1. Influence of Furaskin (F) on the proteolytic activity of pyloric caecae of tuna.
(Time and temp. of reaction : 24 hrs. ; 40°C)

pH	7	8	8.5
Non-add. F (A) } NH ₂ -N(mg × 10 ³)			
Add. F (50 ppm) (B) }	284.1	404.8	468.5
Decrement of activity	272.3	362.1	402.5
(A)-(B)/(A) × 100	4.0	10.5	14.1

Note :Furaskin is a trade name for 5-nitro-2-furfural-semicarbazone.

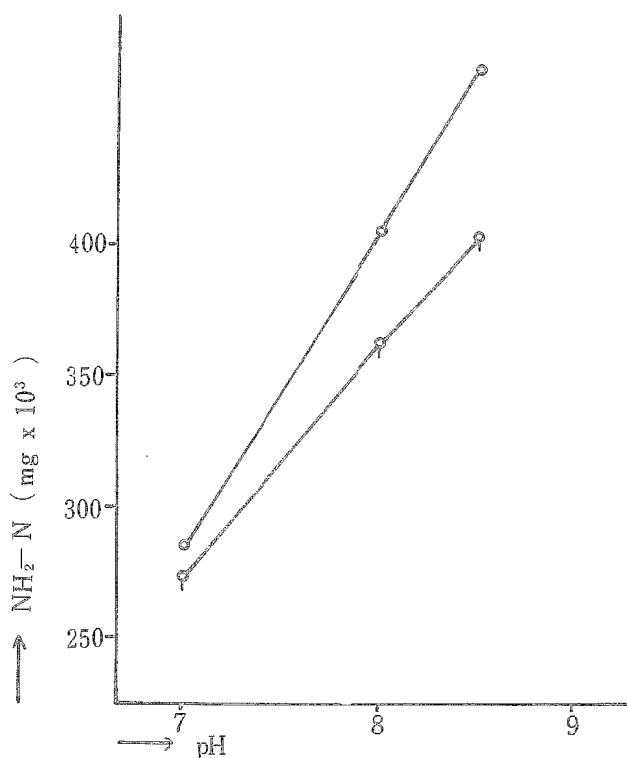


Fig. 1. Influence of 5-nitro-2-furfural-semicarbazone on the proteolytic activity.

○ ... Non-added
□ ... Added

第 1 表から明らかなように酸性側においては F の影響は認められなかったが, pH 8 ~ 8.5 においては添加区は無添加区に比較して約 10 ~ 14% 前後の活性減を示した。しかして無添加区を検鏡したところ細菌の繁殖したような状況は何もなかった。即ちこのことから F はアルカリ側においてプロテアーゼそれ自体に 10 ~ 14% 程度の阻害作用を呈することを示している。

2) オーレオマイシン Aureomycin (Chlortetracycline) の影響に就いて

オーレオマイシン (CTC) は最近魚肉の鮮度保持に使用せられ、その効果が著しいことが認められた。米国等では獣肉保蔵に大量に使用されつつあると聞く。CTC の作用機作に関してはいくつかの研究があり、或は鱗の代謝を阻止するとか或は適応酵素の形成を阻止するとかいわれているが、CTC の直接的な作用に就いては未決定である。CTC の作用機作の一面を知る手掛りとしてプロテアーゼに対する CTC の影響を測定することも必要であると考えこの実験を行なった。0.1% CTC 溶液を反応液に適量添加して反応液におけるその濃度がそれぞれ20, 30および50 ppm になるようにして無添加の対照区とその活性を比較した。なお作用時間を1時間の短時間として雑菌の汚染繁殖の危険を除去した。実験結果の1例を示すと第2表、第2図のとおりである。

Table 2. Influence of aureomycin (CTC) on the proteolytic activity of pyloric caecae of tuna.
(Time and temp. of reaction : 1 hr. ; 40°C)

CTC (ppm)	20	30	50	Control (Non-add. CTC)
Non-protein-soluble-N (mg × 10 ³)	264.7	190.2	171.7	248.8
Decrement of activity (%)	-6	23.5	30.9	-

Note :Aureomycin is a trade name for chlortetracycline.

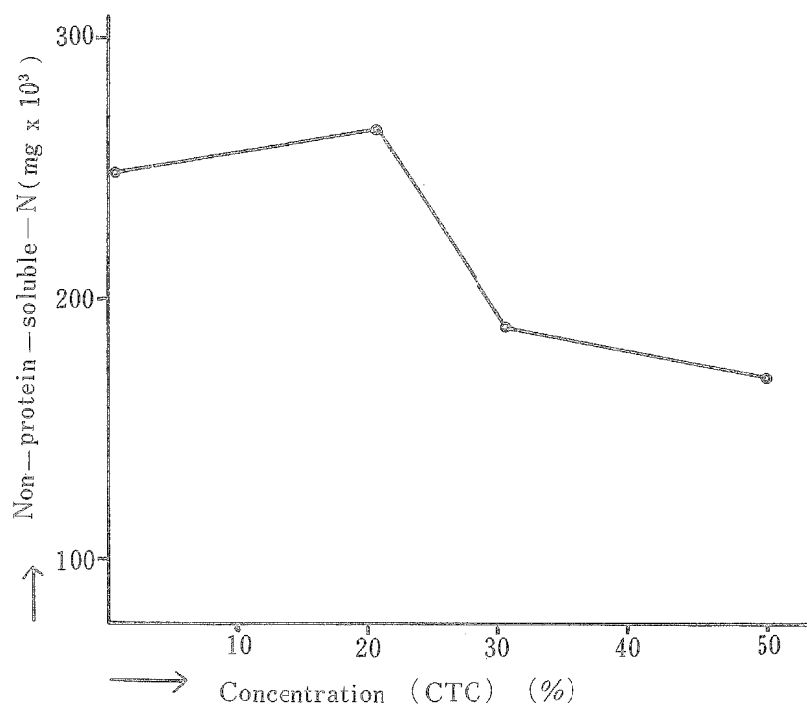


Fig. 2. Influence of the chlortetracycline on the proteolytic activity.

第2表の示すところによると20 ppmのような低濃度の場合短時間のためか殆んど悪影響が見られず逆に僅かながら活性の増加を示した。30 ppm以上の濃度になると相当強く抑制的影響をあたえた。即ち30 ppmの場合約24%減、50 ppmの場合約31%減を示した。上述のように2種類の抗菌性物質のプロテアーゼ活性に対する抑制的影響は両者に対する実験条件(反応時間等)が異なるので厳密な意味での比較はできないが、

CTCの方がプロテアーゼに対して強く阻害作用を呈することは明らかなである。

総 括

1) フラスキン、オーレオマイシンのような抗菌性製剤の魚幽門垂プロテアーゼに対する影響を見るに、フラスキンの場合濃度50 ppm, 24時間の作用時間でpH 8.5のとき約14%の阻害作用を示すがpH 7では僅かに4%減であった。これに対し、オーレオマイシンの場合反応時間1時間でpH 8.5では濃度30 ppmで約24%, 濃度50 ppmでは実に31%の阻害作用を示した。しかし20 ppmでは逆に僅かながら活性の増加がみられた。

第 十 章 Tonerde $C\gamma$ に依る酵素蛋白質の吸着

Tonerde $C\gamma$ (Ortho aluminium hydroxyde γ) の調整

Willstätter¹⁶⁾法により調製した。即ち $(NH_4)_2SO_4$ 100 gと20%アンモニア液 215ccを溶かしている溶液3.25 lを60°Cに温めこれに水 500ccにアンモニウム-明礬 340 gを溶かして熱したものを一度に加え60°Cに保ちつつ強く攪拌し液温は60°Cに保ちこれに水 2 lを加えて沈澱させ以後傾斜法によって洗滌し、第4回目の洗滌の際に20%アンモニア水 40 ccを加え更に傾斜法を10回以上繰返して容量を200 ccとした。

1) $C\gamma$ の吸着能に対する pH の影響

粗酵素抽出液 (5 cc) に $C\gamma$ 10ccおよび緩衝液 (pH 5, 7および8.2) を添加して後更に pH をよく規正して攪拌吸着 (5分間) を行なわしめた後遠心分離して上澄液を分ち、更にそれぞれの pH の緩衝液 5 cc を添加して洗滌し、洗滌液を上澄液に合して pH を 8.5 となしそれぞれの液量を同量 (30 cc) となし、その 5 cc 宛をカゼイン反応液に添加して活性を測定する。同時に別に 5 cc を硫酸分解して全窒素量を測定すると共に蛋白質窒素量をも測定した。得た結果は第 1 表、第 1 図のとおりである。なお酵素の活性測定条件は液温 45°C, pH 8.5 で反応時間 1 時間である。

Table 1. Influence of the pH value on the adsorption capacity of tonerde $C\gamma$.

pH value at adsorption	5	7	8.2	Control (Non-adj. $C\gamma$)
Total-N/1 cc of supernatant ($mg \times 10^3$)	491.10	521.18	524.13	594.08
Protein-N/1 cc of supernatant ($mg \times 10^3$)	34.31	66.27	72.85	149.44
Act/1 cc of enzyme soln.	10.467	12.370	12.469	13.372
Act/1 mg of total-N	21.3	23.5	23.7	22.5
Act/1 mg of protein-N	305.0	186.7	171.0	89.5

第 1 表の結果を見るに、対照試料中の蛋白質窒素量は総窒素量の約 25% である。しかして吸着処理により各 pH 区分における未吸着の蛋白質窒素量の割合は未処理の蛋白質窒素量を 100 とした場合 pH 5 : 26.3%, pH 7 : 44.3%, pH 8.2 : 48.8% となる。即ち吸着された蛋白質窒素量の割合は pH 5 において最も強く 74% が吸着され pH 7 において 56% となり pH 8.2 では約 50% 強となった。しかも吸着性の弱いアルカリ側においても 50% 程度の吸着力を示している。(この事実は次の第 2 表の結果とよく一致する)。また上澄液中の非蛋白質窒素量 (総窒素量 - 蛋白質窒素量) は各 pH 区分とも同一数値を示した。即ち非蛋白質窒素化合物は $C\gamma$ により殆んど吸着されないことを示すものである。

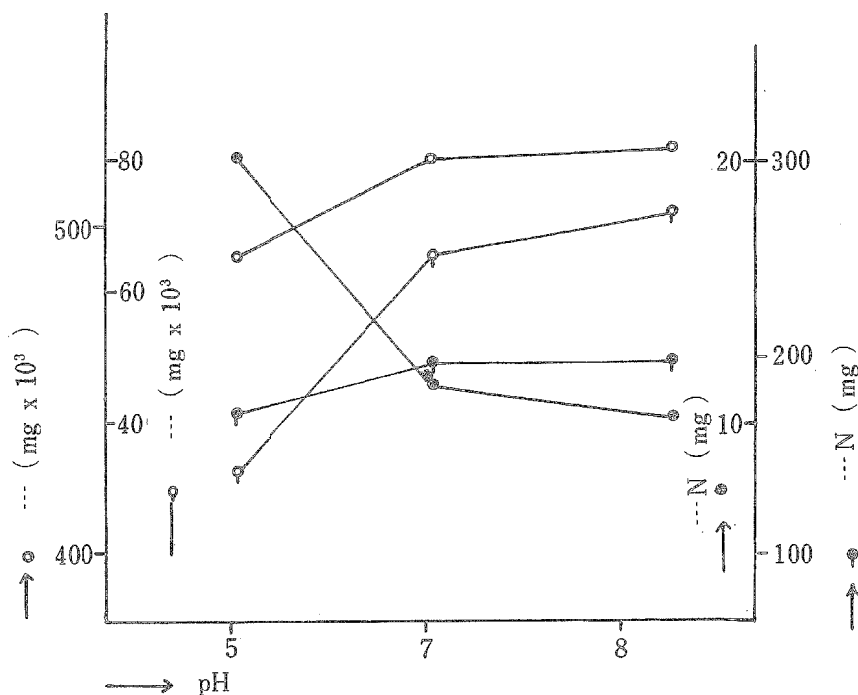


Fig. 1. Influence of the pH value on the adsorption of tonerde Cy.

- ...Total-N/1 cc of supernatant
- ...Protein-N/1 cc of supernatant
- ...Act/1 mg of protein-N
- ...Act/1 cc of the enzyme soln.

しかして各区分の Act/1 cc 酵素液および Act/1 mg 総窒素量を比較するのにいずれも対照区の値にくらべて大差がないが Act/1 mg 蛋白窒素の値を比較すると、各区分の力価は対照区の値に比べて pH 5 において約 3.4 倍、pH 7 において約 2.1 倍、pH 8.2 において約 2 倍の値を示した。この事実は各区分の上澄液中の蛋白窒素含量と考え合わせると次のような事実を示すものであろう。即ち pH 5 で吸着された蛋白質は非酵素態のものが多く酵素蛋白質は少ない。従って上澄液中に残る蛋白質の大部分、或は相当部分は酵素蛋白質である。そして pH 7 においては吸着された非活性蛋白質および酵素蛋白質の割合が pH 5 の場合ほどではないが、やはり前者の吸着量が多いことを示し pH 8.2 のアルカリ性では酵素蛋白質の吸着量も非活性蛋白質と同じように吸着されるようである。即ちアルカリ側では Cy の吸着は選択性を示さずあらゆる蛋白質を吸着することを示している。

2) Cy の量的関係に就いて

Cy を使用してプロテアーゼの吸着を完全に行ない得るかどうかを実験した。それぞれ一定量のプロテアーゼ溶液に Cy 量を異にして添加し反応液の pH を 8.2 となし一定時間 (5 分間) 振盪吸着を行なった後、

Table 2. Adsorption of protease by means of tonerde Cy.
(Time and temp. of reaction : 7 hrs. ; 40°C)

Sample No.	1	2	3	4	5	6
Added Cy (cc)	1	2	4	6	8	10
NH ₂ -N (cc)	0.74	0.70	0.58	0.54	0.48	0.02

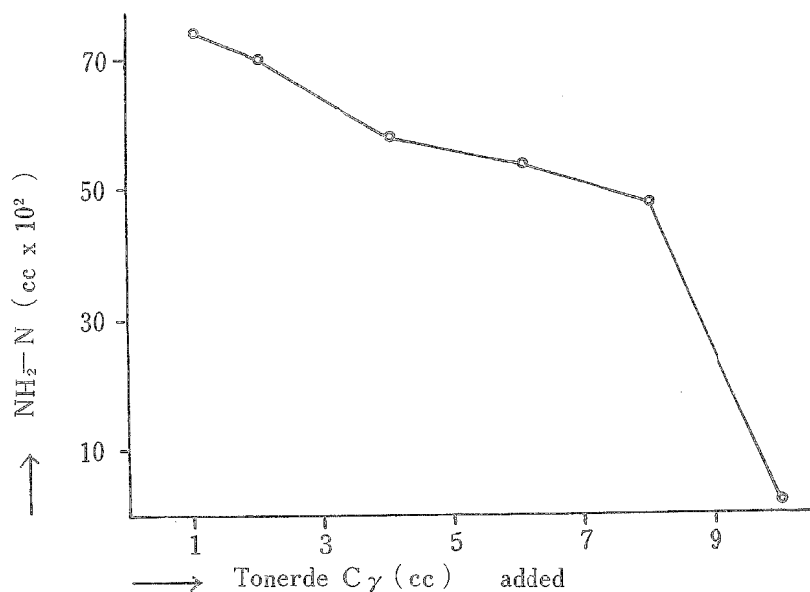


Fig. 2. Adsorption of the protease by using tonerde C γ at various pH value.

遠心分離して得た上澄液全量をカゼイン反応液に添加して pH を 8.5 に規正し正常法のとおり反応させた後反応液の NH₂-N を測定して第 2 表および第 2 図の結果を得た。

上表の結果は C γ の増大するにつれてプロテアーゼの吸着量も増大し、この実験では 10 cc の添加の場合殆んど完全に吸着されたことを示す。

3) 酸性で C γ の吸着を繰返した時の活性に就いて

酸性 (pH 5) において C γ で吸着操作を繰返した場合の酵素液中の蛋白窒素量の変化とプロテアーゼ活性の関係を求めた。酵素抽出液に C γ 一定量を加えて pH 5 に規正して吸着を行ない、その上澄液を使用して蛋白窒素量および活性を測定し残液に再び同上の操作を繰返して同一測定を行なう。このようにして 4 回吸着を繰返した時の実験結果の一例を示すと第 3 表、第 3 図のとおりである。

なお吸着処理を行なった酵素液は pH 8.5 の緩衝液を使用して処理直前の容量にもどした後その活性を測定して比較に便ならしめた。

Table 3. Increase and decrease in activity of protease by repeated using of tonerde C γ at pH 5.

The repeating number of adsorption	1	2	3	4
Protein-N/1 cc of enzyme soln. (mg x 10 ³)	235.68	86.40	38.88	38.88
Act/1 cc of enzyme soln.	29.98	14.53	12.13	12.27
Act/1 mg of protein-N	127.1	168.1	312.0	315.5

4) アルカリ性で C γ の吸着を繰返した時の活性に就いて

次にアルカリ性溶液 (pH 8.2) で上記と全く同様な方法で吸着を繰返した場合の関係を求めた。方法は上述と全く同様である。第 4 表、第 4 図はこの結果を示す。

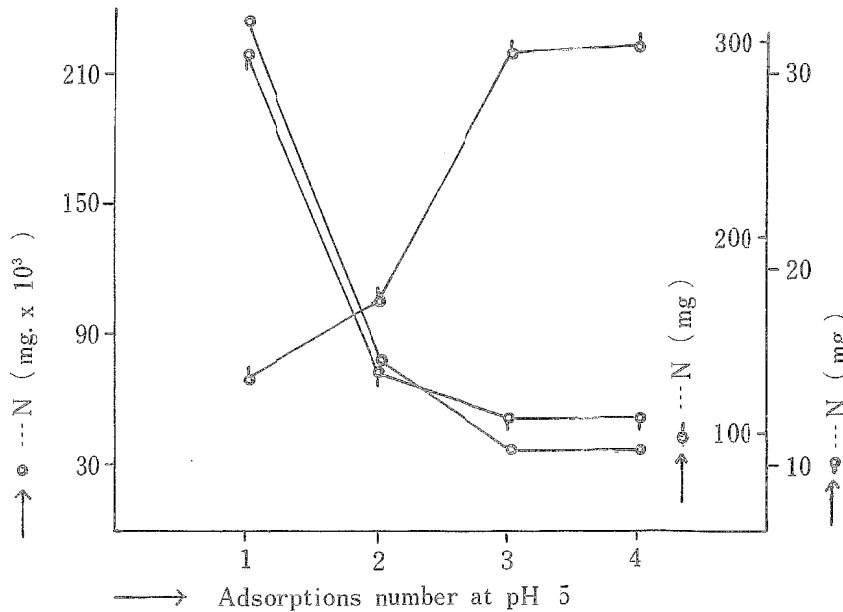


Fig. 3. The repeating effect of adsorption of the protease by using tonerde Cy at pH 5.

- ...Protein-N/1 cc of enzyme soln.
- ...Act (N-mg)/1 cc of enzyme soln.
- △ ...Act (N-mg)/1 mg of protein-N

Table 4. Increase and decrease in activity of protease by repeated using of tonerde Cy at pH 8.2.

The repeating number of adsorption	Non-treatment	1	2	3
Protein-N/1 cc of enzyme soln. (mg × 10 ³)	463.68	330.24	237.60	133.76
Act/1 cc of enzyme soln.	30.21	15.19	7.73	0.11
Act/1 mg of protein-N	65.1	46.0	32.5	0.40

第3表、第3図の結果は pH 5 で吸着を繰返すとき、1、2 および 3 回の処理によりその都度処理前の蛋白質の約半が吸着により減少するが、しかし 4 回目には 3 回目と同じ値になったことを示した。しかし Act/1 cc 酵素液を見るに 3 回迄は漸次減少するが、3 回および 4 回処理の値は殆んど同値であった。そして Act/1 mg N は吸着回数を重ねるにつれて逆に 2 倍、3 倍と上昇し 3 回処理で 5 倍の力価を示し、しかも 4 回処理も殆んど同値を示した。この Act/1 mg N の値は第 1 表の pH 5 における値とよく一致するものである。これらのことから酸性 (pH 5) で吸着される蛋白質は非酵素蛋白質の割合が多く、従って回を重ねるにつれて Act/1 mg N の値は逆に上昇を示すものといえる。しかし 3、4 回と吸着操作を繰返すにつれて吸着され難い蛋白質のみが残存することになり、従ってその場合酵素液中の蛋白質量および Act/1 mg N が同値を示すことになったものと考えられる。以上のことから pH 5 における Cy の吸着に際しては吸着され難い酵素蛋白質が液中に残存する。更に第 4 表、第 4 図を見るにアルカリ側 (pH 8.2) において吸着を繰返す場合、吸着の回数を重ねるにつれ残存する蛋白質も漸減する。しかしこれに従って Act/1 cc 酵素液および Act/1 mg N も漸減する。そして等 4 回目においてはその活性は殆んど消失した。しかるになお液中には蛋白態窒素が相当みとめられるが、これは比較的僅少な酵素蛋白質が吸

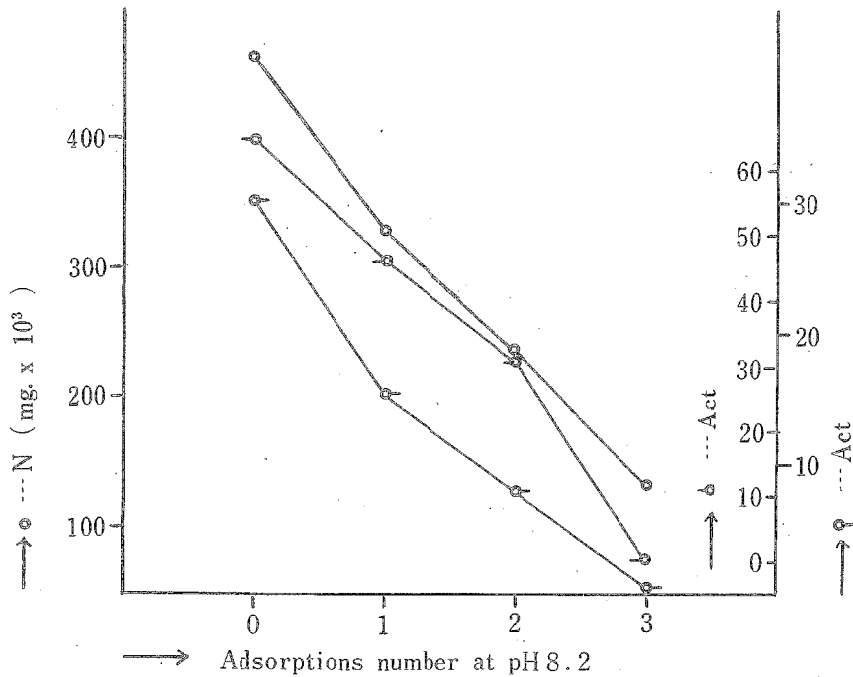


Fig. 4. The repeating effect of adsorption of the protease by using tonerde Cy at pH 8.2.

- ...Protein-N/1 cc of enzyme soln.
- ...Act (N-mg)/1 cc of enzyme soln.
- ...Act (N-mg)/1 mg of protein-N

着されつくしてもなお残存する非酵素蛋白質であろう。以上の事から pH 8.2 における Cy の吸着に際しては酵素蛋白質は比較的よく吸着され、この実験 (第 4 表) では Cy による吸着処理 4 回にして殆んど完全に吸着された。

総 括

1) 水酸化アルミニウム (Cy) の各種 pH 5, 7 および 8.2 による蛋白質の吸着率は pH 5 の場合最も多く、次いで pH 7, pH 8.2 の順であった。

2) 上記のようにして吸着処理した場合、その上澄液の Act/1 mg 蛋白質は pH 5 において最も高く、次いで pH 7 および pH 8.2 の場合の順となった。この事実から pH 5 において吸着された蛋白質はその大部分は非活性蛋白質であり最も多く、反面 pH 5 で最も難吸着性である酵素蛋白質の存在することを示している。そして吸着の pH が微酸性から微アルカリ性に移行するにつれて吸着される蛋白質量は減少するが酵素蛋白質の吸着量は多くなる。

3) 非蛋白質化合物は Cy によっては殆んど吸着されない。

4) 酸性 (pH 5) で Cy による吸着を繰返すことによって蛋白質量は相当吸着された。しかして Act/1 mg 蛋白質は吸着処理を繰返すごとに上昇したが、或回数に至って殆んど一定値に達した。即ち pH 5 で吸着され難い酵素蛋白質が存在することを示した。

5) pH 8.2 において蛋白質の吸着を Cy により繰返すと、回を重ねるにつれて蛋白質量は減少し、同時に Act/1 cc 酵素液および Act/1 mg 蛋白質も共に減少する。即ちこの pH の条件では酵素蛋白質はよ

く吸着され、C_γ の量を充分使用すれば殆んど完全に吸着できることを知った。

第十一章 C_γ に吸着された酵素蛋白質の溶離に対する pH の影響

1) pH 5 で吸着された蛋白質の溶離

それぞれの C_γ 10 cc に酵素液の一定量および pH 5 の磷酸緩衝液 10 cc を添加して更に pH をよく規正した後攪拌吸着を行ない遠心分離により上澄液を分離した。更にこれを pH 5 の緩衝液で水洗し、液部を除去した後、それぞれの C_γ 部に pH 7 および 8.2 の緩衝液 10 cc を添加して pH をよく規正した後、攪拌溶離を行ない遠心分離して液部を分ち更に洗滌を繰返して液部をそれぞれ合併した。しかる後各区分の pH を 8.5 にして全液量を同一量（この場合 14 cc とした）となし、その一部（5 cc を使用して活性を測定し残液の一部で蛋白質量を測定した。その結果を示すと第 1 表（a, b）のとおりとなる。また第 1 表（b）を図示すると第 1 図のようになる。

Table 1a. Influence of the pH value on the elution at pH 5 from adsorbed C_γ.

pH at elution	7	8.2	Control (Original soln.)
Protein-N/1 cc of supernatant (mg × 10 ³)	40.699	61.750	139.40
Act/1 cc of supernatant	5.039	5.346	6.361
Act/1 mg of protein-N	123.8	86.5	45.6

Table 1b. Influence of the pH value on the elution at pH 5 from adsorbed C_γ.

pH at elution	6	7	8.2
Protein-N/1 cc of supernatant	12.2	35.3	55.9
Act/1 cc of supernatant	8.352	3.093	5.780
Act/1 mg of protein-N	684	87.7	40.3

上表（a）の結果から pH 7 では約 29.2%，pH 8.2 では 44.3% の蛋白質量が溶離されていることになる。しかして pH 8.2 の溶離においては酵素および非活性蛋白質が pH 7 の場合に比較してよく溶離され、前章第 1 表の pH 8.2 における吸着量は約 50% であるから吸着された蛋白質は殆んど溶離されたことになる。そして Act/1 mg 蛋白質を見るに無処理のその約 2 倍を示した。しかして pH 7 における溶離は pH 7 における吸着率を 44% とすれば不十分で、なお吸着されている蛋白質を相当残しているということになるが、溶離された蛋白質は酵素態のものが多いうことは Act/1 mg 蛋白質が無処理のその約 3 倍近くに上昇していることから明らかである。更に（b）表より pH 6 における Act/1 mg 蛋白質は pH 7 のその約 8 倍、pH 8.2 のその約 17 倍に達した。以上の結果は酵素蛋白質で pH 5 ~ 6 において最も難吸着性或は易溶離性であるものが存在することを示すものであろう。

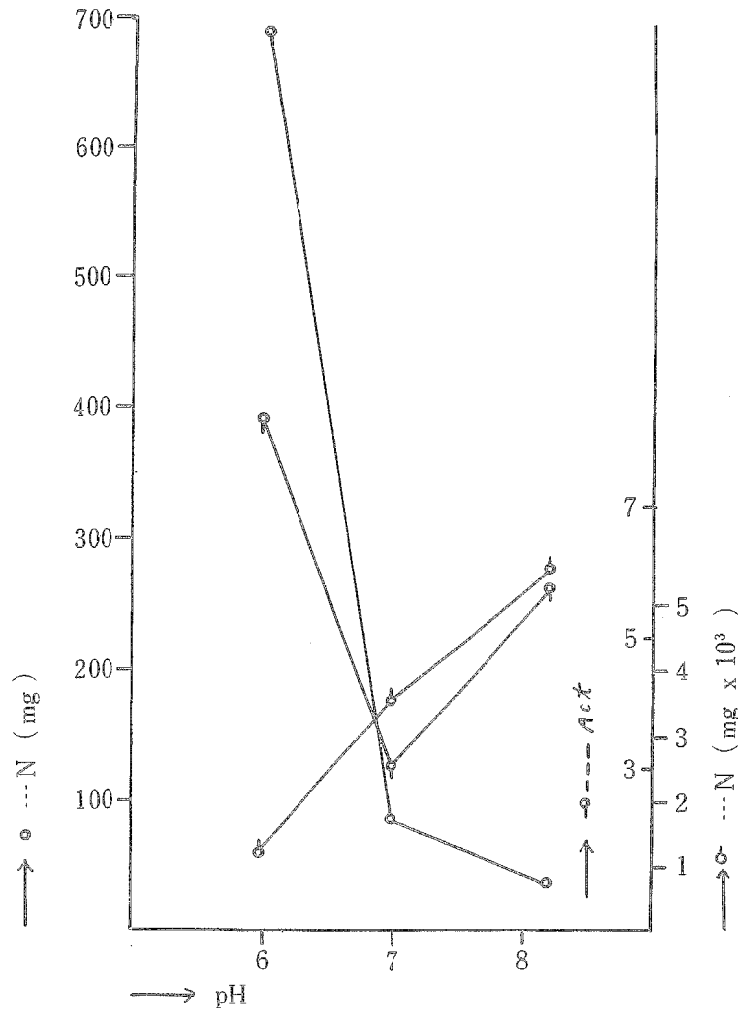


Fig. 1. Influence of the pH value on the elution from the protein-adsorbed tonerde C γ (adsorption at H5)
 ○ ...Act (N-mg)/1 mg of protein-N
 ◇ ...Protein-N/1 cc of supernatant
 △ ...Act (N-mg)/1 cc of supernatant

2) pH 8.2 で吸着された蛋白質の溶離

酵素液と C γ の吸着時の pH を 8.2 として吸着を行なった後上澄液を除去し C γ -吸着物にそれぞれ異なる pH の緩衝液を添加して振盪抽出を行ない、再び遠心分離して上澄液を分ち pH を 8.5 とした後これをカゼイン反応液に添加し反応させて生じた NH₂-N を測定して第 2 表および第 2 図の結果を得た。

Table 2. Influence of the pH value on the elution from adsorbed C γ at pH 8.2.
 (Time of reaction : 18 hrs.)

pH at elution	3	4	5	6	7	8.2	8.5
NH ₂ -N (cc)	0.04	0.28	1.14	0.64	0.68	0.01	0.18

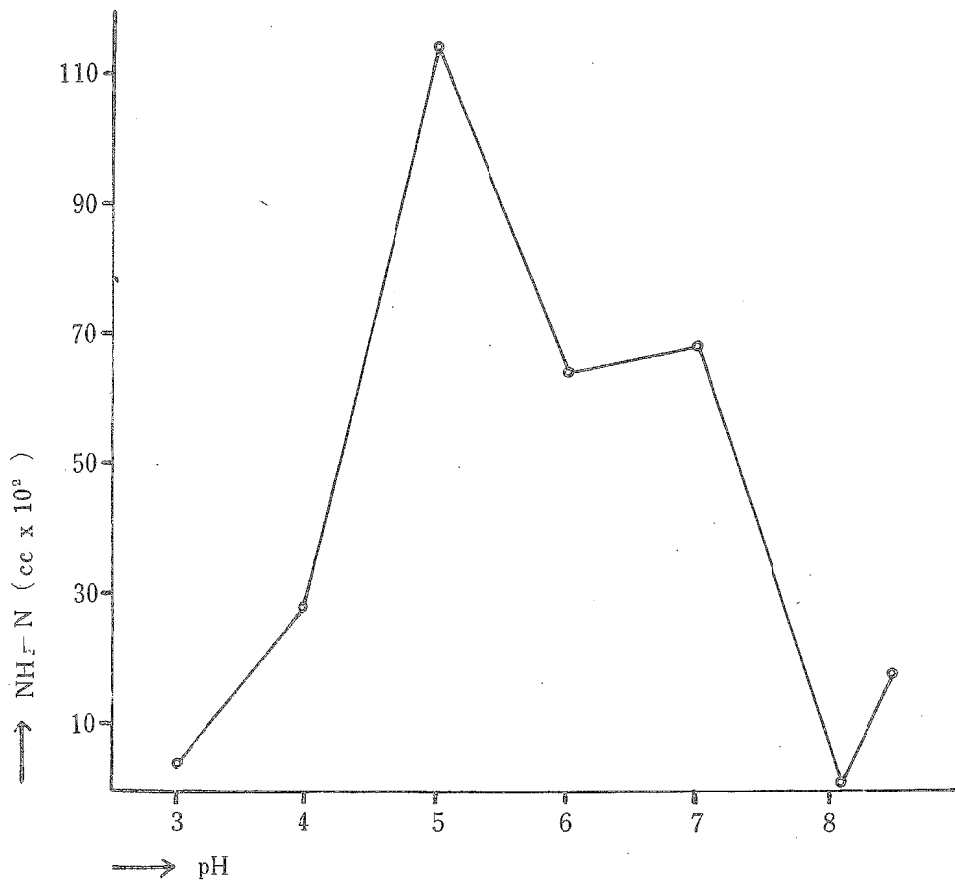


Fig. 2. Influence of the pH value on the elution from the protein-adsorbed tonerde Cy (adsorption at pH 8.2)

即ち第2表の結果から pH5で生成した NH₂-N が最も多い。このことは pH5で溶離される蛋白質は酵素態のものが多く、しかも他のいずれの pHの場合よりその割合が多いことを示すものであろう。即ち pH5では酵素蛋白質は最も易溶離性であることを示し、これは前述の実験結果ともよく一致するものである。これに次いで pH6および7が良好であるが、pH5のその半分程度である。pH3の場合は pH8.2の場合を別としてその他の pHの場合に比べて甚だ少ない値を示した。即ちこの pHでは殆んど溶離はできない。

また pH4の場合は pH5の場合の約 1/4 の溶離を示した。

総 括

Tonerde Cy に吸着された酵素蛋白質および非活性蛋白質の溶離の条件 (pH) を検討した。

1) pH5において吸着処理の場合、溶離は pH6の場合最も多く、しかも酵素蛋白質が非活性蛋白質のそれに比べて非常に多い。pH7, 8.2となるにつれて蛋白質の溶離量は多くなるが、非活性蛋白質量が増大するため窒素量 1 mg 当りの比活性は減少する。

2) pH8.2において吸着された酵素蛋白質は pH5において最もよく溶離される。これに次いで pH6および7の場合の順であった。

第十二章 魚プロテアーゼよりの精製標品とトリプシン結晶との活性比較

上述の諸実験結果から $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、アセトン処理によりかなりプロテアーゼの力価が高められ、更に水酸化アルミニウム (C_γ) による吸着溶離処理により非活性蛋白質の除去が可能である見通しを得たので、これらを組合わせて精製を行ないその精製品を試料としてトリプシン結晶 (商品名: トリプシリン…Trypsilin…持田製薬製品) の活性と比較を行なった。

魚プロテアーゼの精製方法を述べると粗酵素試料の水抽出液に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 処理を行ない更にアセトン処理を行なってその 40~70% 範囲で沈澱する区分を集めこれを pH 7 の水に溶かし、これに C_γ を加えて pH 8.2 とし吸着を行なう。次に遠心分離により吸着部と未吸着部 (上澄液) に分かち、吸着部には pH 5 の緩衝液を加えて溶離を行ないその酵素区分を E_5 とし、未吸着 (上澄液) に C_γ を添加して pH 5 で吸着を行なった後、 C_γ 吸着部を pH 8.2 で溶離してその酵素区分を $E_{8.2}$ とする。トリプシリンの至適 pH は 7 にあることを知ったので、その pH で反応温度を 45°C にして測定を行なった。以上それぞれの試料の活性測定結果を示すと第 1 表のとおりである。

Table 1. Comparison of the activity of refined protease preparation from pyloric caecae with that of crystalline trypsin (as Trypsilin).
(Time and temp. of reaction: 1 hr.; 45°C)

Sample	Refined protease preparation		Crystalline trypsin (Trypsilin)
	E_5	$E_{8.2}$	T
Act/1 mg of protein-N	519.8	451.4	132.3
Act/1 cc of enzyme soln.	23.7	27.1	30.4

Note: E_5 shows refined protease preparation eluted at pH 5 from tonerde C_γ adsorbed protease.

$E_{8.2}$ shows refined protease preparation eluted at pH 8.2 from tonerde C_γ adsorbed protease.

上表によれば、 E_5 および $E_{8.2}$ の力価はいずれも Act/1 mg 蛋白窒素においてトリプシン結晶のそれより強力な値を示した。また E_5 と $E_{8.2}$ を比較すると、窒素 1 mg 当りの活性は E_5 が大であった。

総 括

マグロ幽門垂粉末の水抽出液を硫酸、アセトン処理し Tonerde C_γ により吸着溶離を行なって得た精製プロテアーゼの活性を市販の結晶トリプシリンのそれと比較した。その結果は次のとおりである。

1) アルカリ性 (pH 8.2) 吸着→酸性 (pH 5) 溶離により得たプロテアーゼ試料 (E_5) および酸性吸着 (pH 5) およびアルカリ性溶離 (pH 8.2) により得たプロテアーゼ試料 ($E_{8.2}$) 共に市販のトリプシリン結晶の活性 (Act/1 mg 蛋白窒素) より強力な活性を示した。

2) E_5 と $E_{8.2}$ では E_5 の方がやや活性が強い。

第十三章 Tonerde C_γ の反復吸着処理とプロテアーゼの活性

硫酸およびアセトン処理により魚プロテアーゼの Act/1 mg 蛋白窒素は結晶トリプシリンの活性にほぼ匹敵する力価を有するようになり、更に C_γ 吸着処理により数倍の強力なものを得る見通しがついた。また C_γ

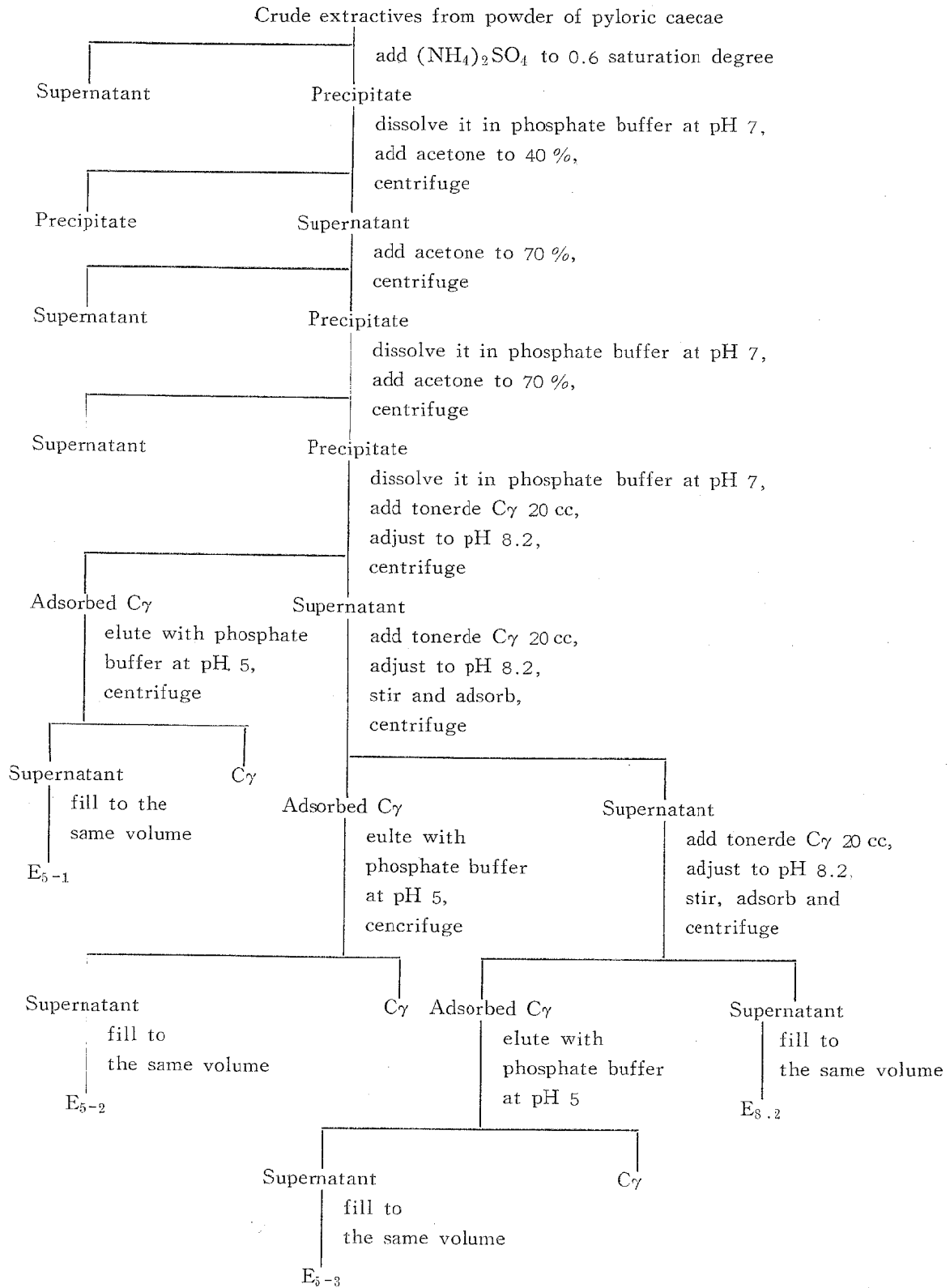


Fig. 1. The repeating adsorption of the protease on the tonerde C_γ and its proteolytic activity. (Adsorption at pH 8.2; elution at pH 5)

の吸着条件においては非活性蛋白質の除去の目的からいえば前述の種々の実験結果から、吸着をアルカリ側で行ない溶離を酸性 (pH 5) で行なえば比較的純度の高い酵素溶液が得られそうである。そこで粗酵素抽出液を硫酸、アセトンで処理することは前述の如く行ないそのアセトン濃度 (40~70 %) 分画の沈殿の水溶液に $C\gamma$ を加え pH 8.2 で吸着を行ない遠心分離し、その上澄液に $C\gamma$ を更に添加し pH 8.2 で吸着を行なった後遠心分離を行なうこと全く第 1 回と同様にして、同一処理を 3 回繰返して得られた $C\gamma$ 吸着部には pH 5 の緩衝液を添加し溶離を行なう。かくして得られた溶離液を E_{5-1} 、 E_{5-2} および E_{5-3} とし、最後の澄液を $E_{8.2}$ とする。これらはいずれも pH 8.5 に調製し、すべて同一容量とし、しかる後活性を測定した。その処理方法を示すと第 1 図のようになる。

また活性測定の結果は第 1 表のとおりである。

Table 1. The relation of repeating of adsorption with tonerde $C\gamma$ to the proteolytic activity.
(Condition : adsorption at pH 8.2 ; elution at pH 5)

Measurement Division	Measurement			
	E_{5-1}	E_{5-2}	E_{5-3}	$E_{8.2}$ (Original)
Total-N/1 cc of enzyme soln. (mg)	0.5098	0.1991	0.1212	1.2698
Protein-N/1 cc of enzyme soln. (mg $\times 10^3$)	11.736	8.848	5.924	40.212
Act/1 cc of enzyme soln.	10.3896	8.3117	6.0894	13.4006
Act/1 mg of total-N	20.4	41.7	50.2	10.6
Act/1 mg of protein-N	885.3	939.4	1027.9	333.2

Note : The number such as 5-1, 5-2, ... shows the repeating of adsorption with tonerde $C\gamma$.

第 1 表の結果をみると Act/1 mg 蛋白質は E_{5-3} が最も高く E_{5-2} 、 E_{5-1} がこれにつづく。そして $E_{8.2}$ は 3 回の吸着を繰返したにもかかわらず、なお 333.2 という高い活性を示したことは pH 8.2 において酸性の場合と同じように吸着され難い酵素蛋白質が存在することを示すものであろう。この事実は第十章 2) の実験結果と一見相返するように見える。しかしこれは決して矛盾するものではなく、本来酵素蛋白質は Tonerde $C\gamma$ に対し易吸着性ではないこと、しかし被吸着物に対する $C\gamma$ の量を非常に増大するとき殆んど完全に吸着されることを示すものである。

総 括

硫酸およびアセトン処理を行なったマグロ幽門垂プロテアーゼ溶液に Tonerde $C\gamma$ を添加し pH 8.2 で吸着を行ない、 $C\gamma$ 部を分離し上澄液に更に新しい $C\gamma$ を添加し吸着を行なうこと第 1 回と全く同様にして総計 3 回吸着処理を行ない、それらの吸着試料を pH 5 で溶離した酵素試料をそれぞれ E_{5-1} 、 E_{5-2} および E_{5-3} とし、また 3 回吸着処理後の上澄液を $E_{8.2}$ とし各試料について Act/1 mg 蛋白質を測定したところ E_{5-3} が最も強く約 1,030 の活性を示し E_{5-2} はこれに次いで約 940、 E_{5-1} が約 890 で $E_{8.2}$ は約 330 であった。

第十四章 魚幽門垂プロテアーゼの精製に就いて

前述の各章において硫酸、アセトンによる酵素蛋白の沈殿生成能を検討しこれらを使用してその活性がそれぞれ一定値を示す酵素液を得ることを知った。そして該酵素に対する Tonerde $C\gamma$ の吸着性は選択性を示し酸性側においてもまたアルカリ性側においても完全吸着は簡単ではないことを知った。しかしそれと同

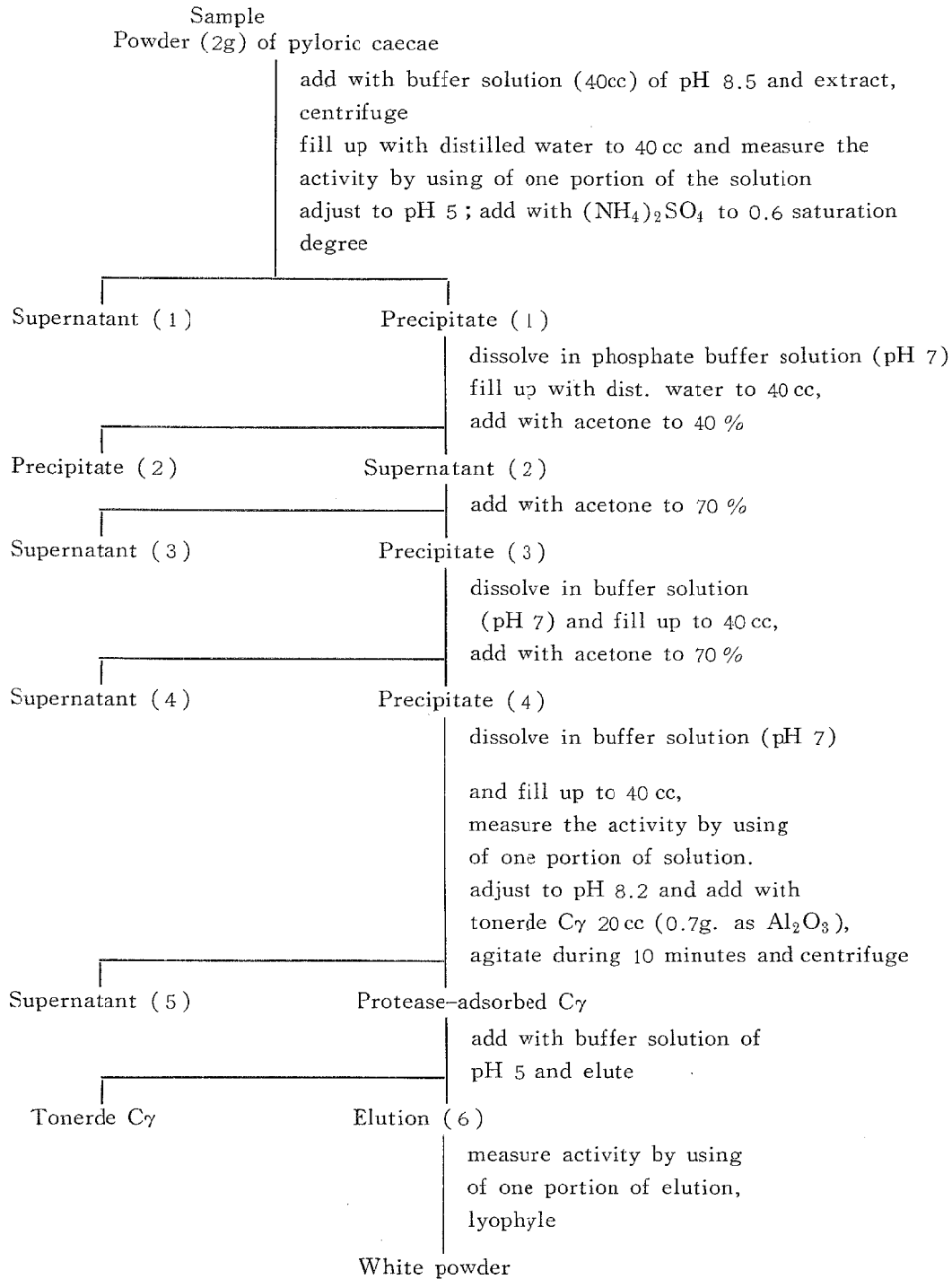


Fig. 1. The preparation of the powder having the powerful proteolytic activity.

時に非活性蛋白質をも選択的に吸着する性質があることを知ったので、これらの事実を組合せて酵素蛋白質の純化ができることが考えられる。よって次の方法により該酵素の純化を行ない、活性が原酵素液の有する活性の約13倍に達しAct/1mg蛋白質素が1,400以上の白色粉末を得た。即ち魚幽門垂粉末よりの水抽出液(一部の溶液で活性測定…A)に硫酸を加え%飽和となし、生ずる沈澱をpH7の水に溶かした後これにアセトンを加えて40%飽和となしその際生ずる沈澱を除去した後濾液にアセトンを添加して70%となし、生ずる沈澱を分離しこれにpH7の少量の水を溶かし再びアセトンを加えて70%とする。かくして生ずる沈澱をpH7の磷酸緩衝液(10倍稀釈)少量に溶かし(一部の液で活性測定…B)これにC_γ 20cc (Al₂O₃として0.7g)を添加してpHを8.2に調製し、10分間吸着操作を行なった後遠心分離してC_γ吸着部を分離しこれにpH5の緩衝液を加え、更によくpH5に調製して溶離を行ないその溶離液について活性を測定した(C)。

精製方法を図示すると第1図のとおりである。

第1図に示す方法で精製を行なった場合、活性の変化および収率の計算を行なったが結果は次のようになった。

Table 1. Increase in the activity according to refined process of protease and their yields.

Refined process Measurement	Extractives with water from crude enzyme preparation	Preparation treated with acetone two times	Preparation eluted at pH 5 from adsorbed C _γ
Act/1 mg of protein-N	113	202	1477
Yields (%)	100	19.8	16.7

上表の結果のように原酵素液がアセトン処理により約2倍の活性の上昇を示し次いでC_γの吸着溶離処理により更に原液の13倍強の活性を示す白色粉末製品を得ることができた。

総 括

マグロ幽門垂粉末の水抽出液に硫酸、アセトン処理を施し、更にTonerde C_γによる吸着溶離を行なった濃厚プロテアーゼ液を得、これを凍結乾燥して白色粉末製品を得た。この製品の活性(Act/1mg蛋白質素)は約1,450で原液の13倍強であった。なお収率は約17%であった。

第十五章 魚幽門垂プロテイナーゼの構成に就いて

魚類の幽門垂は腸の一部が分化したものといわれ、胃の幽門部の直後に存在する魚類特有の消化器官で、胃と腸の接着部に開口するものであり、その主要なる分泌物である蛋白分解酵素群が蛋白質消化に主要な役割を演じていることは疑いのないところである。したがってその分泌酵素をできるだけ細かく分割してそれぞれの作用機能を知ることができれば幽門垂分泌液の蛋白質分解機構を明きらかにすることができると共にその応用の基礎的知見をも得ることができると考える。しかして分割したそれぞれの精製酵素の基質蛋白質に対する分解能を知るには標準とする酵素の分解能に比較するのが最も簡単であると思われるが、幸い今日結晶プロテイナーゼが数種類市販せられるようになったので、これらを標準とすることにした。

結晶性プロテイナーゼとして哺乳動物(牛豚)の膵臓より得られたトリプシリン(商品名)および菌体より得られた結晶性-細菌-Al-プロテイナーゼ(Crystalline Bacterial Al-Proteinase: 商品名)が入手できたので、まずこれらのカゼイン蛋白質に対する分解能を検討し更に参考のため結晶性ではないが、高度精製の粉末酵素剤に就いても分解能を検討し次に幽門垂プロテアーゼを硫酸およびアセトン処理し更に水酸化

アルミニウム (C γ 型) を使用し種々の条件下で吸着および溶離操作を行なって得た3分画についてそれぞれのカゼイン分解能を測定し、結晶プロテイナーゼのそれに比較したところ、類似するものと相異なるものが存在することが明らかになった。

1) 結晶プロテイナーゼ及び精製粉末酵素剤のカゼイン分解能に就いて

酵素剤:

- a) Trypsilin (商品名: T-Pase と略する) 本品は持田製薬KKより出されている結晶製品である。その力価は1錠剤10,000 H. U. M. (会社の定めた力価) である。
- b) 結晶性-細菌-Al-プロテイナーゼ (商品名として Crystalline Bacterial Al-Proteinase : C. B. Al-Paseと略する) 本品は長瀬産業KK尼崎工場製造のもので 20×10^4 PUN/Vial (会社の定めた力価) の結晶である。
- c) ビオプラーゼ (NPN₄) …商品名上記b) と同一会社製で 20,000 PUN/gの活性を有するものといわれ中性プロテイナーゼである。b) と同じく *Bac. subtilis var Bioters* より製造されたものという。
- d) プロナーゼ (商品名である。P-Nase と略する) 本品は科研KK製品で *St. griseus* より抽出精製されたもので、その力価は50,000 PUK/g (会社の定めた力価) といわれるが、これも中性プロテイナーゼである。

実験条件及び測定方法

各種酵素剤を適量秤量しこれにpH 7 或は8.5の緩衝液を適量加えて溶解しそのまま或はこれを更に遠心分離して清澄液を得てこれを酵素試料とする。

5%カゼイン10ccに緩衝液 (pH 7 或は8.5) 30 ccを加え更によく pHを調整した後45°Cに温め、これに適量の酵素液を添加し更に蒸留水 (45°C) を加え全量を50 ccとなし一定時間 (ここではすべて1時間) 作用させた後20%の三塩化酢酸液16 ccを添加して酵素作用を止め、未消化蛋白質を除去し、濾液を100 ccにしてその一定量を分析に供する。

P-N…添加した酵素試料溶液中に含有される蛋白窒素量を示す。

N-P-S-N…上記酵素処理濾液に存在するいわゆる非蛋白可溶性窒素量を示す。

Poly-N…上記酵素処理濾液の一定量 (20 cc を使用した) を加熱しその中に溶存する三塩化酢酸を除去し液量を約9 cc前後となし、これに5%リンタングステン酸 (5%硫酸溶液) を添加する。しかるときは白色沈澱を生ずる。更にこれに蒸留水を加えて全容量を再び20 ccとなした後遠心分離を行なって上澄液を得、その上澄液について Folin 試薬による呈色を行なわしめ日立製作所製 EPU-2型分光光度計により波長280m μ を使用して比色定量を行なって得られる窒素量である。

Act/P-N…カゼイン基質に酵素試料を添加反応させて得られる N-P-S-N を同酵素試料中の P-Nで除したものである。したがってこれは酵素蛋白質 1 mg (又は 1 g) により基質より生成される N-P-S-N (mg又はg) を示すもので、その数値の大小は酵素活性の大小を示す。

Poly-N/N-P-S-N \times 100…これは酵素活性により得られた N-P-S-N のうち更に低分子 (いわゆるプロテオース, ペプトンと称する高分子化合物より以下の窒素化合物全部を意味する) の占める割合を示すものである。

次に実験結果を 第1~6表で示す

Table 1. Activity of "Trypsilin" on the casein.

Incubation time(min.)	pH 8.5		
	30	60	90
Value of measurement			
Act/P-N	338	430	520
Poly-N/N-P-S-N × 100	10	11	11

Note : Act.....Nitrogen (mg or g) of soluble compounds which were decomposed from casein by action of enzyme-N (mg or g)
 P-N.....Protein-nitrogen (mg or g) in enzyme preparation
 N-P-S-N.....None protein soluble nitrogen (mg or g) in the reaction solution
 Poly-N.....Polypeptide-nitrogen (mg or g) (include $\text{NH}_2\text{-N}$, amide-N and $\text{NH}_3\text{-N}$) in the reaction solution

また反応液のpHが7および8.5の場合の比較を行なった結果が第3および4表である。

Table 2. Activity of "Crystalline Bacterial Al-Proteinase" on the casein.

Incubation time(min.)	pH 8.5		
	30	60	90
Value of measurement			
Act/P-N	587	795	944
Poly-N/N-P-S-N × 100	22	19	23

Table 3. Activity of "Trypsilin" on the casein.

Incubation time(min.)	pH	
	7.0	8.5
Value of measurement	60	60
Act/P-N	450	408
Poly-N/N-P-S-N × 100	11	12

Table 4. Activity of "Crystalline Bacterial Al-Proteinase" on the casein.

Incubation time(min.)	pH	
	7.0	8.5
Value of measurement	60	60
Act/P-N	934	1035
Poly-N/N-P-S-N × 100	20	20

次に結晶ではないが高濃度酵素粉末として商品化されているビオプラーゼ (NPN₄-商品名) およびプロナーゼ (P-Nase と略する) に就いて同様に測定値を求めて第5および6表を得た。

Table 5. Activity of "Bioprase" on teh casein.

Incubation time(min.)	pH	
	7.0	7.0
Value of measurement	30	60
Act/P-N	254	414
Poly-N/N-P-S-N×100	30	31

Table 6. Activity of "Bronase" on the casein.

Incubation time(min.)	pH	
	7.0	7.0
Value of measurement	30	60
Act/P-N	43	49
Poly-N/N-P-S-N×100	57	65

以上の諸実験の結果を見るにカゼインを基質とした場合、アルカリ性反応 (pH 8.5) において Poly-N/N-P-S-N×100 の値は T-Pase の場合 : 10~11, C. B. Al-Pase : 19~23, で後者は前者の約2倍である (第1および2表)。そして両者とも反応時間の長短に関係なく同一値を示している (第1および2表)。これに反して Act/P-Nの値は反応時間の長いほど大きい数値を示したが、これは当然なことである。次に第3および4表の示すところによれば基質反応液のpHが異なる場合即ち中性 (pH 7) およびアルカリ性 (pH 8.5) の場合においても Poly-N/N-P-S-N の値は略同一値を示した。そして Act/P-N の値は T-Pase では中性側でやや強く、C. B. Al-Pase ではアルカリ性側で強かった。以上の諸測定値の結果から Poly-N/N-P-S-N×100の値は反応液のpH および短時間では反応時間に関係なく酵素に特有の数値を示すものと考えることができる。しかして両酵素 (T-PaseおよびC. B. Al-Pase) 共に結晶体であるから現在の製造工程が変わらない限り、その Poly-N/N-P-S-Nの値は上述のような値を示すこと明きらかで、両酵素の示す数値の差異は明きらかに両酵素のカゼインに対する分解機構の本質的差異に基くものと考えられる。

次にビオプラゼおよびプロナーゼに就いてみるに Poly-N/N-P-S-N×100の値は反応時間に関係なくそれぞれ30および60を示した。両酵素剤共結晶体でないで、なお数種類の酵素の混在が考えられるのであるが、NPN₄ の Act/P-N は T-Pase のそれと殆んど同一値を示したのにもかかわらず Poly-N/N-P-S-N×100の値は NPN₄の方が約3倍であった。更に P-NaseのPoly-N/N-P-S-N×100の値は約65 (60分の場合) という高い値を示すのに Act/P-Nの値は約49で T-Pase のその約1/2であることはそれぞれこれら酵素剤の特徴を示すものであると考えることができる。

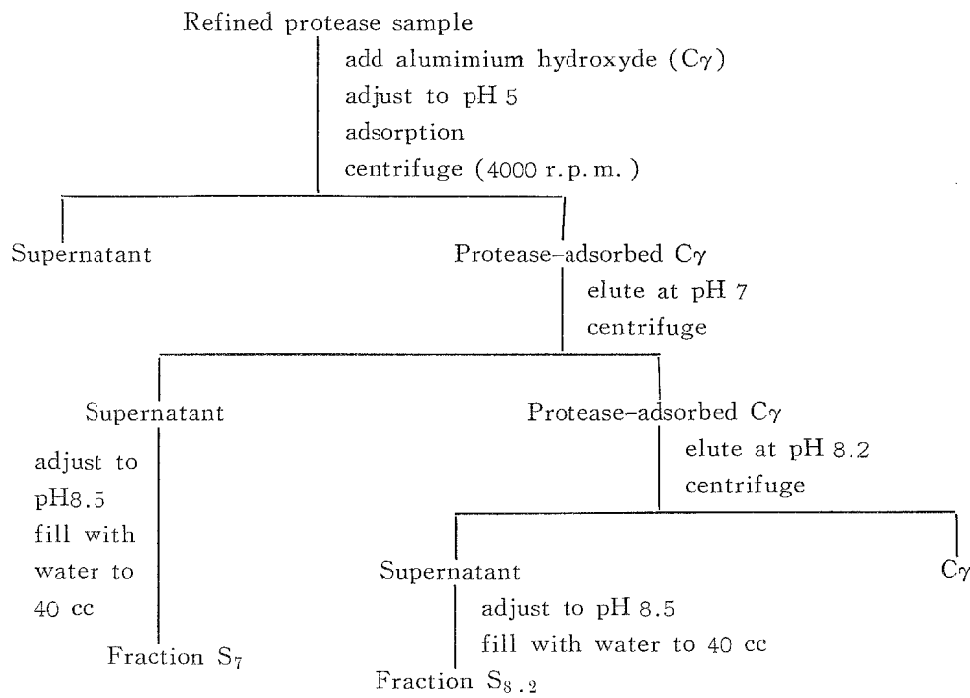
2) 精製魚幽門垂プロテアーゼのカゼイン分解能に就いて

魚幽門垂プロテアーゼ試料として鮪幽門垂のアセトン・エーテル処理粉末を使用した。その精製法は次のとおりである。即ち粉末の一定量にpH8.5の緩衝液を加えて抽出を行ない、その抽出液を微酸性 (pH5.2) にした後これに固形硫酸を加えて%飽和度となし、生じた沈澱を少量の水 (pH 7のMCILVAINE緩衝液使用) に溶かしこれにアセトンを加えて40%となし、生じた沈澱を除き上澄液に更にアセトンを加えて70%となし、生じた沈澱を分離しこれを水 (pH 7の緩衝液) に溶かし再びアセトン処理を繰り返す。アセトン処理を2回繰り返して得た沈澱をできるだけ少量のpH 7の水 (緩衝液) にとかし、これを3部に分ちそれぞれに水酸化アルミニウム (C_γ型) の一定量およびpH 5, 7および8.2の緩衝液一定量を添加し更にpH

をよく規正した後攪拌吸着を行ない, C γ -吸着部を水部と分離した後これらにそれぞれ酸性, 中性或はアルカリ性緩衝液を添加して攪拌溶離を行ないそれぞれ溶離された酵素液に就いて上述の方法に従ってカゼイン分解能を測定した。

次に酵素試料の分画方法および各分画試料のカゼイン分解能を示す。

a) pH5で吸着し pH7および8.2で溶離した場合



Note : Preparation of refined protease sample

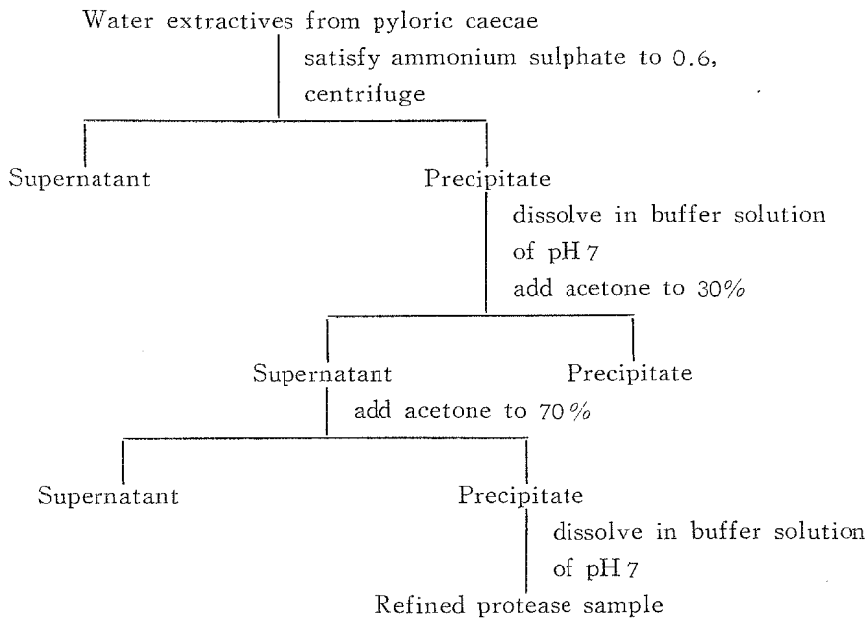


Fig. 1. Showing the preparation of refined enzyme fraction.

Table 7. Activity of refined enzyme fraction on the casein.

Fraction	S ₇	S _{8.2}
Value of measurement		
Poly-N/N-P-S-N × 100	23	24

b) pH 7 で吸着し pH 5 及び 8.5 で溶離した場合

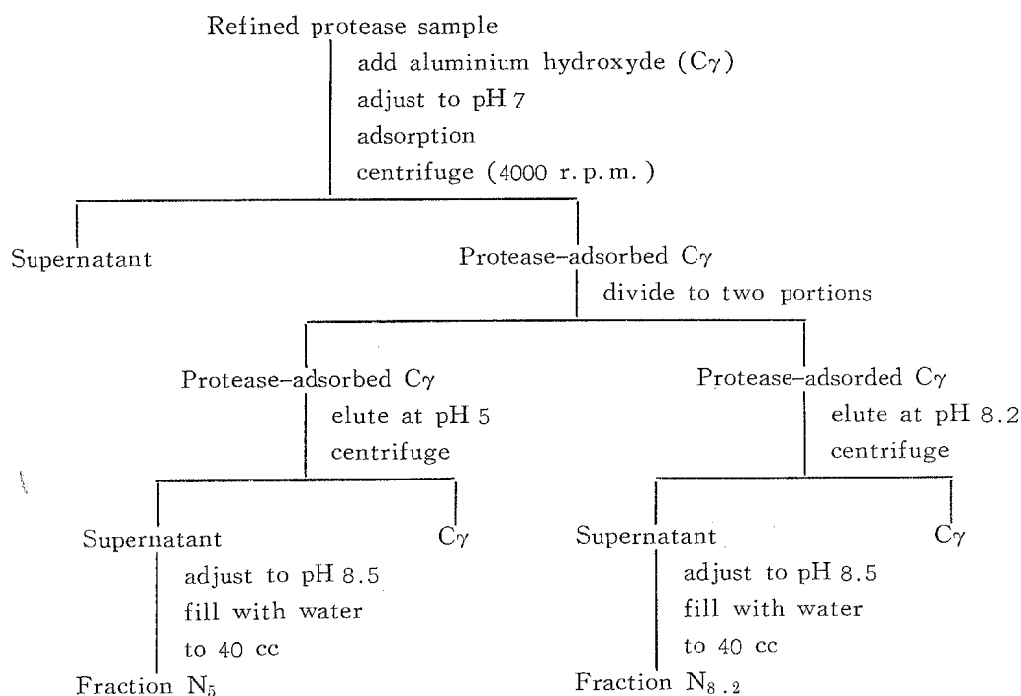


Fig. 2. Showing the preparation of refined enzyme fraction.

Table 8. Activity of refined enzyme fraction on the casein

Fraction	N ₅	N _{8.2}
Value of measurement		
Poly-N/N-P-S-N × 100	15	15

以上の諸実験結果をみるに第7表においてはS₇およびS_{8.2}の測定値はほぼ同値とみることができる。即ちC₇に対してpH5における吸着酵素はC.B. Al-Paseのそれに近似している。また第9表よりpH8.2における吸着酵素はA₅:10, A₇:13であって特にA₅の値はT-Paseのそれと全く同値を示した。A₅およびA₇のAct/P-Nの値はそれぞれ534および573であったので、A₅およびA₇とも同じ型の酵素であると考えられる。即ちA₅およびA₇共にトリプシン型であると考えられる。

次にpH7で吸着した酵素試料のN₅およびN_{8.2}の値は共に15であって(第8表)、この値は上述の結晶酵素の示した値の中間値を示した。以上の諸実験結果を総合すれば魚幽門垂プロテナーゼに対しpH5,

c) pH 8.2 で吸着し pH 7 及び 5 で溶離した場合

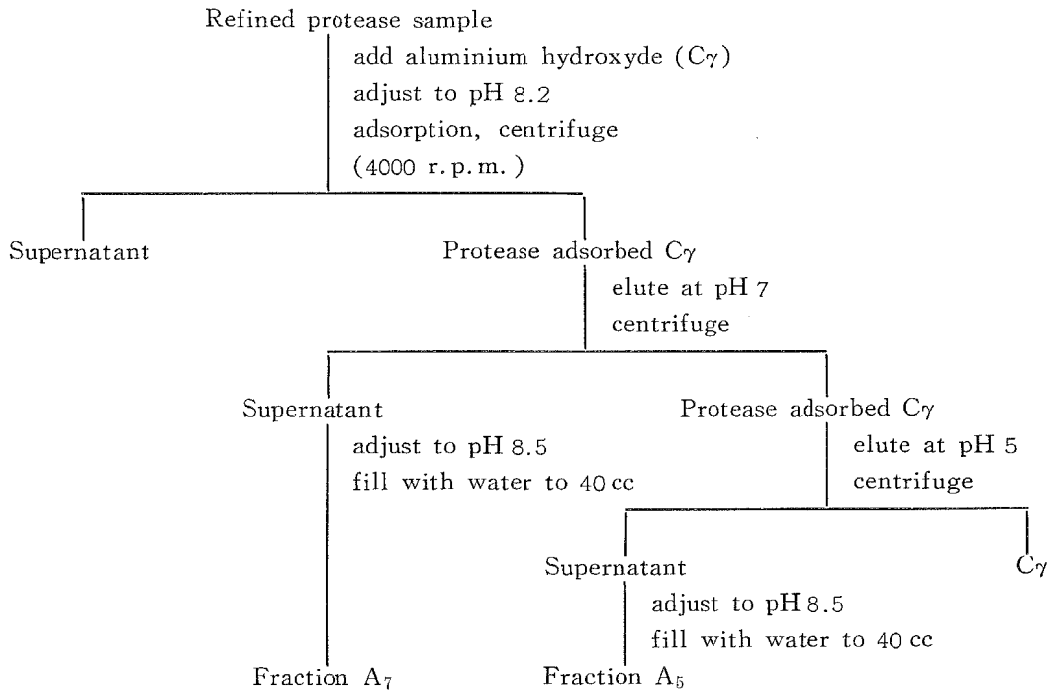


Fig. 3. Showing the preparation of refined enzyme fraction.

Table 9. Activity of refined enzyme fraction on the casein.

Fraction	A ₅	A ₇
Value of measurement		
Poly-N/N-P-S-N × 100	10	13

7および8.2においてC_γを使用することにより少くとも3つの型の酵素類を分離することができることは明らかである。即ちその一つは哺乳動物のトリプシン型であり、他の一つは細菌プロテイナーゼ型と同一とみなされるものである。そして第3の型は上述の2者の中間的性質を示すもので、これが魚類に特有のものかどうかは更に今後の研究により確かめる必要があるが、とにかく魚幽門垂プロテアーゼには哺乳および細菌プロテイナーゼの両型酵素が含有され更に魚類型ともいべき第三の型の酵素を有することは明らかである。

3) 精製魚幽門垂プロテアーゼの至適 pH 及び至適温度について

上述のようにC_γにより吸着分離した各分画の至適 pH および至適温度を常法に従って測定した。第10~15表はその結果を示す。

Table 10. The optimal pH value of S₇ and S_{8.2}.

Division	Activity	pH						
		5	6	7	8	8.5	9	
S ₇	Act/1 cc	5.18	9.44	14.15	14.34	14.43	14.01	
S _{8.2}		3.28	5.65	10.38	12.92	12.95	12.08	

Table 11. The optimal temperature of S₇ and S_{8.2}.

Division \ Activity		Temp. (°C)				
		35	40	45	50	55
S ₇	Act/1 cc	13.79	14.01	15.27	15.54	14.86
S _{8.2}	Non-protein-soluble-N (mg × 10 ³)	44.74	49.58	54.48	56.45	48.82

Table 12. The optimal pH value of N₅.

pH	5	6	7	8	8.5	9
Act/1 cc	3.25	4.27	5.71	6.04	6.13	6.01

Table 13. The optimal temperature of N₅.

Temp. (°C)	40	45	50	55
Act/1 cc	5.74	9.27	11.18	7.52

Table 14. The optimal pH value of A₅.

pH	5	6	7	8	8.5	9
Non-protein-soluble-N (mg × 10 ³)	26.10	26.45	45.74	48.94	59.96	54.51

Table 15. The optimal temperature of A₅.

Temp. (°C)	35	40	45	50	55
Act/1 cc	5.02	5.27	6.99	7.55	6.95

以上の諸表 (10~15) で明らかなように各分画の至適温度はいずれも pH 8.5 であり至適温度は 50°C であった。これは粗プロテアーゼの実験における 45°C よりも 5°C 高い。以上の事から各分画は C_γ に対する吸着能を異にする点で差異を示し、作用機能上は上述 2) に示されるようにそれぞれ特異性を発揮するものであることが明らかになった。

総 括

結晶プロテイナーゼおよび精製酵素剤によるカゼイン分解生成物から酵素の分類を試みた。即ち哺乳動物源であるトリプシリンと細菌源の C.B. Al-Proteinase とは分解機構を異にする別個の型に属するものである。また中性プロテイナーゼであるビオプラナーゼもその原料を異にするプロナーゼとは本質的に異なるものである。次にマグロ幽門垂プロテイナーゼを水酸化アルミニウム (C_γ型) により分画し各分画のカゼイン分解能を上記各プロテイナーゼのそれに比較したところ、哺乳動物型プロテイナーゼおよび細菌型プロテイナーゼの 2 つの型が認められ更に両者の中間型ともいふべきプロテイナーゼが存在するのを認めた。即ち各分画はいずれもその至適 pH は 8.5、至適温度は 50°C を示し同一であったが、Tonerde C_γ に対する吸着能を異にしカゼインに対する作用機作を異にする特異性を示した。

結 論

I 魚胃液の pH およびプロテアーゼに関する研究

- 1) 胃組織プロテアーゼは酸性側よりもアルカリ性側において強く示された。
- 2) 活魚(タイ、フグ、ベラ、チヌ、セイゴ、カサゴ、クロダイ、ウナギ等)の胃液の反応は中性ないし微アルカリ性を示し食餌で充胃の状態では常に微アルカリ性で空胃の際、微酸性(pH 6.4~6.6)を示した。大型魚であるマグロにおいても全く同様な結果であった。
- 3) 魚の死後において胃液の反応は酸性側(pH 6.4~6.6)に移行する。以上の事実は魚体処理の手段には影響を受けない。
- 4) 魚胃液中には遊離塩酸は存在しない。
- 5) 魚胃液プロテアーゼの至適水素イオン濃度は pH 6~7 にあり、至適温度は 35°C 附近であった(マダイ)。
- 6) 魚胃液を陽イオン交換樹脂(IRC-50型)カラムにかけて各分画を得、これらを全く同一条件でペプシン溶液より分離した各分画に比較したところ、両者の各分画の出現部位はそれぞれ異なり、且つそれらの酵素活性を比較すると哺乳動物のペプシン系のそれは pH 2.2 において強力な活性を示したが、pH 6 では全然活性を示さなかったのに、魚類のそれは pH 2.2 で全然活性を示さず、pH 6 で強力な活性を示した。以上の諸事実より魚胃液プロテアーゼは哺乳動物のペプシン系ではないと断定した。

II 魚幽門垂プロテアーゼに関する研究

- 1) イワシおよびマグロにおいては該酵素の至適 pH は 8.5 附近にあり、至適温度はイワシでは 35°C、マグロでは 45°C であった。また 95~97°C で 3 分間の加熱により失活した。
- 2) 各種試薬添加の影響をみるに、硫酸、塩酸等の無機酸を添加することによりその pH が 1.4 以下になると活性は完全に阻害される。
塩化ナトリウム、塩化カリウムのような無機中性塩を添加した場合、その濃度の増加につれて阻害作用も増大するが、塩濃度 30% のときもなお 40% 程度の活性が示された。
エチルアルコール、アセトンのような有機溶剤の添加により活性は阻害されるが、エチルアルコールの 15% 濃度で 50% の活性となり、30% 濃度でもなお 30% の活性が示された。
アセトンの場合その 15% 濃度で活性は 60% となるが、30% アセトン濃度でもなお 30% の活性を示した。しかし 90% 以上のアセトン液に 5 分間以内浸漬した場合、活性には殆んど損失をみなかった。
フラスキン(5-nitro 2-furfural-semicarbazone)の 50ppm の添加において 14% の活性阻害がみられたが、オーレオマイシンの同濃度の添加においては 31% の活性阻害が示された。
- 3) 組織粉末より該酵素を水抽出(常温)する場合、抽出される酵素量は 1 時間で一定値に達する。そして pH 8.5 での抽出量が最も多かった。そして抽出された割合は全酵素活性の 76% でなお 24% 程度の活性は残存した。
- 4) 該酵素の反応速度恒数を一次反応式に従って算出したところ、180 分位まではほぼ一定値を示したが、それ以上になると時間の経過と共に減少した。
- 5) 該酵素水抽出液に硫酸を添加して 1/2, 1/3 および 2/3 飽和度とした場合、2/3 飽和度の場合最も多くの沈澱を生じた。そしてこの条件で全酵素活性の 95~98% が捕捉回収された。またこの回収された沈澱化合物の窒素量は酵素液中の全蛋白質窒素量の約 70% であった。
そして硫酸を繰返して使用しても活性には何ら阻害作用をあたえないが、硫酸の使用は 1 回で充分であった。
- 6) アセトンによる沈澱生成を試みたが、80% 濃度の場合最大沈澱量を示したが沈澱の活性は 60% 濃度の場合が最大であった。したがってアセトンによる分画を行なったところ、50~60% および 60~70% 濃度

による両分画の活性が最も大きくて両者はほぼ等しい活性を示した。これに反し40~50%濃度分画は前2者の1/2程度であった。なお60~70%濃度分画には非活性蛋白質の含量が大であった。

7) マグロおよびイワシ幽門垂のアセトン・エーテル処理粉末およびトリプシン製剤(メルク製粉末)の活性を比較したところ、マグロはイワシの2倍の活性を示し、またトリプシン製剤よりも強力であった。しかし非活性蛋白質イワシもの2倍量を含有するので、窒素1mg当りの活性はトリプシン製剤が最も強く、イワシ、マグロの順であった。反応液のpHが5の場合は8.5の場合の約60%の活性を示した(マグロ)。

8) Tonerde C γ による蛋白質の吸着はpH5の場合最も多く、次いでpH7, pH8.2の順であった。しかしなおpH5で吸着され難い酵素蛋白質が存在することが明らかとなった。またpH8.2で吸着を繰り返すと酵素蛋白質を殆んど完全に吸着できることを知った。

9) Tonerde C γ による吸着溶離の条件をみるにpH5で吸着した場合、pH6で溶離すると酵素蛋白質が非活性蛋白質よりも多く溶離される。pH7, pH8.2となるにつれて溶離される非活性蛋白質量が増大する。pH8.2で吸着された酵素蛋白質はpH5で最もよく溶離され、次いでpH6およびpH7の順で溶離された。

したがって上記の各条件を組合わせてマグロ幽門垂水抽出酵素液から力価の高い粉末製品の製造を試みた。

10) マグロ幽門垂プロテイナーゼ系の構成をさぐる手段としてpHの差異によって Tonerde C γ に対する酵素の吸着性に難易を生ずる事実を利用して該酵素系を Tonerde C γ に pH5, 7および8.2において吸着させた後、酸性、中性またはアルカリ性において溶離を行ないそれぞれの分画を求めた。そして各分画のカゼイン分解の様式から少くとも3種類の分画の存在を認めることができた。即ち第1の分画は哺乳動物のトリプシン型で、第2の分画は細菌型プロテイナーゼと同型であり、第3の分画は前2者の中間的分解能を示すものであった。そしてそれら3分画の至適pHおよび至適温度をしらべたところ、いずれも至適pHは8.5にあり、至適温度は50°Cを示した。即ち3者は Tonerde C γ に対して吸着性を異にする点で区別されるものである。

文 献

- 1) 大谷・島田, 1923: 水講報告, 19.
- 2) 大谷・畑中, 1927: 水講報告, 22.
- 3) 町田, 1933: 農化, 9.
- 4) 大谷・横田, 1933: 水講報告, 28.
- 5) 大島・佐々木, 1925: *J. Soc. Agric. Forest Tokyo*, 70.
- 6) 島田, 1936: 日水誌, 4.
- 7) 二戸, 1936: 水産研誌, 31.
- 8) 高橋・広沢, 1936: 日水誌, 5.
- 9) 奥田, 1948: 水産化学(産業図書株式会社).
- 10) 大谷・中井, 1937: 日水誌, 6.
- 11) 末広, 1951: 魚類学(岩波書店).
- 12) 赤堀, 1955: 酵素研究法(朝倉書店).
- 13) 藤井・立川・西野, 1957: 本報告, 6.
- 14) MacKay, M. E. 1929, *Biological Bulletin*, 5.
- 15) 大谷・富士川, 1937: 魚類の化学(厚生閣・恒星社).
- 16) 大谷, 1944: 実験酵素化学(南山堂書店).
- 17) 藤井, 1942: 農化, 18.
- 18) 斗ヶ沢・勝又, 1956: 日水誌, 25.
- 19) ——・——, 1959: ——, 28.
- 20) 斗ヶ沢・勝又・石川: ——.

Summary

Studies on the Protease of Fishes

By

Minoru FUJII

1. On the pH value and the proteolytic activity of gastric juice

- 1) The proteolytic activity of gastric tissues was stronger in alkaline solution than in acidic.
- 2) The pH values of gastric-juice of living fish such as red sea-bream, puffers, wrasses, black porgy, common sea-bass, rock-cod and eel were neutral or slightly alkaline, and proved to be slightly alkaline when the stomach was filled with food, and tended to be slightly acidic (pH 6.4~6.8) when the stomach was empty.

The same results were obtained in experiments on large fish such as tuna (albacore and yellow fin tuna)

- 3) The pH values of the gastric-juice became acidic when the fish were killed, but were not influenced by vivisection or narcosis.
- 4) The gastric-juice of living fish does not contain any free hydrochloric acid.
- 5) The optimal pH value for the proteolytic activity of the gastric-juice of fish is about pH 6~7, and the optimal temperature is about 35°C (in red sea-bream).
- 6) Several fractions having peptic activity were separated by column chromatography of the crude pepsin preparation from mammalian animals and from the gastric-juice of fish (such as red sea-bream) by using Amberlite IRC-50 at pH 4.

By differences between chromatograms, obtained from both preparations, and the optimal pH value for proteolytic activity, it is assumed that the gastric-juice of fish does not contain peptic protease similar to that obtained from the gastric-juice of the mammalian stomach by a similar preparation, but contains a protease, that shows strongest proteolytic activity at pH 6~7.

2. Studies on the enzymatic and chemical properties of the protease in pyloric caecae of tuna and sardine

- 1) The optimal pH value of the proteolytic activity of the pyloric caecae of sardine and tuna respectively is about pH 8.5, and the optimal temperature is about 35°C for sardine. On the contrary it is about 45°C for tuna.

The activity of this enzyme is completely inactivated by heating for more than 3 minutes at 97°C.

- 2) The proteolytic activity is inhibited completely, when, by adding inorganic acid, such as sulphuric acid or hydrochloric acid, the pH value drops below 1.4.

In the case of adding neutral salt such as sodium chloride or potassium chloride,

the activity decreases gradually against increasing concentration of salt; but 40% of the activity still remains at 40% concentration of the salt.

By adding of organic solvent such as ethyl alcohol or acetone the activity is inhibited, but 50% of the activity remains at 15% concentration of alcohol; similarly, 30% of the activity remains at 30% concentration of alcohol.

By adding acetone, 60% of the activity remains at 15% concentration of acetone; similarly, 30% of the activity remains at 30% concentration of acetone.

When the tissues are immersed in acetone solution of 90% concentration for less than 5 minutes, there is practically no loss in activity.

A decrease of 14% in proteolytic activity is brought about by adding 50 ppm. of Furaskin (5-nitro-2-furfural-semicarbazone). On the contrary, a decrease of 31% in proteolytic activity is brought about by adding 50 ppm. concentration of Aureomycin (chlortetracycline).

3) When the protease is extracted, with water, from the powdered tissues at chamber temperature, we obtain maximum protease quantity after 1 hour at pH 8.5, and 76% of the protease can be extracted, but 24% remains in the tissues.

4) The velocity constant, calculated by use of the first order formula, shows a constant value up to 180 minutes, but decreases after 180 minutes.

5) By adding ammonium sulphate of various degrees of saturation (c.f. 1/3, 1/2, and 3/5) to the enzyme solution extracted from the powder of pyloric caecae of tuna, we found the greatest precipitation occurred using the 3/5 saturated solution.

The proteolytic activity of the enzyme was ca. 95% or more of the original activity.

Nitrogen content of this recovered precipitate was ca. 70% of the total protein-nitrogen in the enzyme solution.

The proteolytic activity was not inhibited at all, though the precipitation of protease compound was repeated by means of adding of ammonium sulphate. One treatment by ammonium sulphate was sufficient.

6) By adding of acetone of various concentrations to extractives of powdered pyloric caecae of tuna, nitrogen compounds increased gradually according to the range of acetone concentration of each fraction (40~50, 50~60 and 60~70%). The proteolytic activity and nitrogen content of each fraction was determined and the results obtained are follows: precipitates caused by acetone increase in proportion to the concentration of acetone, but the proteolytic activity, per 1 cc of enzyme solution and 1 mg of nitrogen in the precipitate, is strongest in the fraction used with 50~60% concentration of acetone.

7) By use of aluminium hydroxyde (C_{γ}) for protein adsorption, maximal adsorption was obtained at pH 5, but some part of the enzymatic protein still remained in the soluble state, and was difficult to adsorb on the aluminium hydroxyde (C_{γ}).

In repeated adsorption tests, using aluminium hydroxyde (C_{γ}) for protein, the greater part of the enzymatic protein was adsorbed at pH 8.2.

From the protein adsorbed C_{γ} , (using the pH 5 adsorbed protein) the greater part of the enzymatic protein was eluted at pH 6.

The non-enzymatic protein began to elute increasingly as the pH became alkaline.

8) Three refined but different fractions were obtained from the refined protease by adsorption using aluminium hydroxyde ($C\gamma$). The refined protease was made by treatment of water extractives of pyloric caecae of tuna with ammonium sulphate and acetone. The activity of each of the refined fractions was compared with that of crystalline trypsin and "Crystalline Bacterial Al-Proteinase".

The results were as follows: The first fraction was analogous to the mammalian proteinase as trypsin, and the second to the Crystalline Bacterial Al-Proteinase in bacteria, but the third was not analogous to the former two and showed characteristic activity, the value which lay between that of the first and second fractions.

However the optimal pH and temperature of each fraction showed the same value, namely, pH 8.5 and 50°C.