

# 魚類プロテアーゼに関する研究 (第 X 報)\*

ビンナガ鮪幽門垂プロティナーゼの構成について

藤 井 実

Studies on the Protease of Fishes ( X )

On the Components of the Proteinases in the Enzyme solution

Extracted from Powder of Pyloric caeca of Long

Fin Tuna *Thunnus alalunga*\*

By

Minoru FUJII

In this investigation, the author reported on the classification of the crystalline proteinase as trypsin (called as Trypsilin), Crystalline Bacterial Al-Proteinase and refined enzyme preparation as Pronase and Biopraxe by means of the ratio of nitrogen of the lower compounds-fragment to the total soluble nitrogen decomposed from the casein by action of enzyme, and compared the activities of refined enzyme fractions which were separated by aluminium-hydroxide (C $\gamma$ -type) from the refined protease sample, which was made by using ammonium-sulphate and acetone (Fig 1.) from the water extractives of pyloric caeca of long fin tuna to the above described enzyme type.

The results were as follows:

The three fractions were separated from the enzyme solution extracted from powder of pyloric caeca:

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 not analogous to the formers and showed the characteristic activities.

魚幽門垂は腸の一部が分化したものと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消化に主要な役割を演じていることは疑のない所である。従ってその分泌酵素を出来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出来れば幽門垂分泌液の蛋白分解機構を明きらかとすることが出来ると共にその応用の基礎的知見を

\* 水産講習所研究業績 第319号, 1961年1月18日 受理.

Contribution from the Shimonoseki College of Fisheries, No. 319.

Received Jan. 18, 1961.

も得ることが出来ると考える。而して分割したそれぞれの精製酵素の基質蛋白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もっとも簡単であると思われるが、幸い今日結晶プロティ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。

結晶プロティナーゼとして哺乳動物(牛、豚)の臍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一細菌-Al-プロティナーゼ(Crystalline-Bacterial-Al-Proteinase:商品名)が入手出来たので、先ずこれらのカゼイン蛋白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(Cr-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三分画について、それぞれのカゼイン分解能を測定し、結晶プロティナーゼのそれと比較した所、類似するものと異なるものが存在することが明らかになった。

### 1) 結晶プロティナーゼおよ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 (会社の定められた力価)である。

b) 結晶性一細菌-Al-プロティナーゼ(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 $20 \times 10^4$  PUN/Vial (会社の定めは力価)の結晶である。

c) ビオプララーゼ(NPN<sub>4</sub>)……商品名

上記b)と同一会社製で20,000 PUN/gの作用力といわれ中性プロティナーゼである。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 (会社の定められた力価)といわれるが、これも中性プロティナーゼである。

## 実験条件および測定方法

各種酵素剤を適量秤量しこれにpH7或いは8.5の緩衝液を適量加えて溶解しそのまま或い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(pH7或いは8.5)30ccを加えて更によくpHを調製した後45°Cに温ため、これに適量の酵素液を添加し更に蒸溜水(45°C)を加えて全量を50cc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16cc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100cc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態窒素量を示す。

N-P-S-N……上記酵素処理濾液に存在する所謂非蛋白態可溶性窒素量を示す。

Poly-N……上記酵素処理濾液の一定量(20cc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9cc前後となしこれに5%燐タングステン酸(5%硫酸溶液)を添加する。しかるときは白色沈澱を生ずる。更にこれに蒸溜水を加えて全容量を再び20cc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わしめ日立製作所製EPU-2型分光光度計により波長280m $\mu$ 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せしめて得られる

N-P-S-Nを同酵素試料中のP-Nで除したものである。従ってこれは酵素態蛋白1mg(または1g)

により基質より生成される N-P-S-N (mg または g) を示すものでその数値の大小は酵素作用力の大小を示す。

$\text{Poly-N} / \text{N-P-S-N} \times 100$  …… 酵素作用により得られた N-P-S-N のうち更に低分子 (所謂プロテオーズ, 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 Table 1~6 で示す。

Table 1. Activity of trypsin on the casein.

Value of measurement	pH	8.5		
		Incubation time (mins.)	30	60
Act/p-N		338	430	520
$\text{Poly-N} / \text{N-P-S-N} \times 100$		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……Non-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.

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

Value of measurement	pH	8.5		
		Incubation time (mins.)	30	60
Act/p-N		587	795	944
$\text{Poly-N} / \text{N-P-S-N} \times 100$		22	19	23

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 3. Activity of trypsin on the casein.

Value of measurement	pH	7.0	8.5
		Incubation time (mins.)	60
Act/p-N		450	408
$\text{Poly-N} / \text{N-P-S-N} \times 100$		11	12

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

Value of measurement	pH	7.0	8.5
	Incubation time (mins.)	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ゼ (NPN<sub>4</sub>……商品名) およびプロナーゼ (P-Nase と略する) につ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 the casein.

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

Table 6. Activity of Pronase on the casein.

Value of measurement	pH	7.0	7.0
	Incubation time (mins.)	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程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表の示す所によれば基質反応液の pH が異なる場合すなわち中性 (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られる。而して両酵素 (T-Pase 及び C. B. Al-Pase) 共に結晶体であるから現在の製造過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らかで、両酵素の示す数値の差異は明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づくものと考えられることも決して無理ではないと考えられる。

次にビオプララーゼ及びプロナーゼについてみるに Poly-N/N-P-S-N $\times$ 100 の値は反応時間に関係なく夫々30及び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、NPN<sub>4</sub> の Act/P-N は T-Pase のそれと殆んど同一値を示したのにも拘わらず Poly-N/N-P-S-N $\times$ 100 の値は NPN<sub>4</sub> の方が約3倍であった。更に P-Nase の Poly-N/N-P-S-N $\times$ 100 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  $\frac{1}{3}$  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ついて

魚幽門垂プロテアーゼ試料として鯨幽門垂のアセトン・エーテル処理粉末を使用した。その精製法は次の通りである。即ち粉末の一定量に pH 8.5 の緩衝液を加えて抽出を行いその抽出液を微酸性 (pH 5.2) 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 MC ILVAINE 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 $\gamma$ 型) の一定量及び pH 5, 7 及び 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い、C $\gamma$ -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いそれぞれ溶離された酵素液につ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及び各分画試料のカゼイン分解能を示す。

a) pH 5 で吸着し pH 7 及び 8.2 で溶離した場合

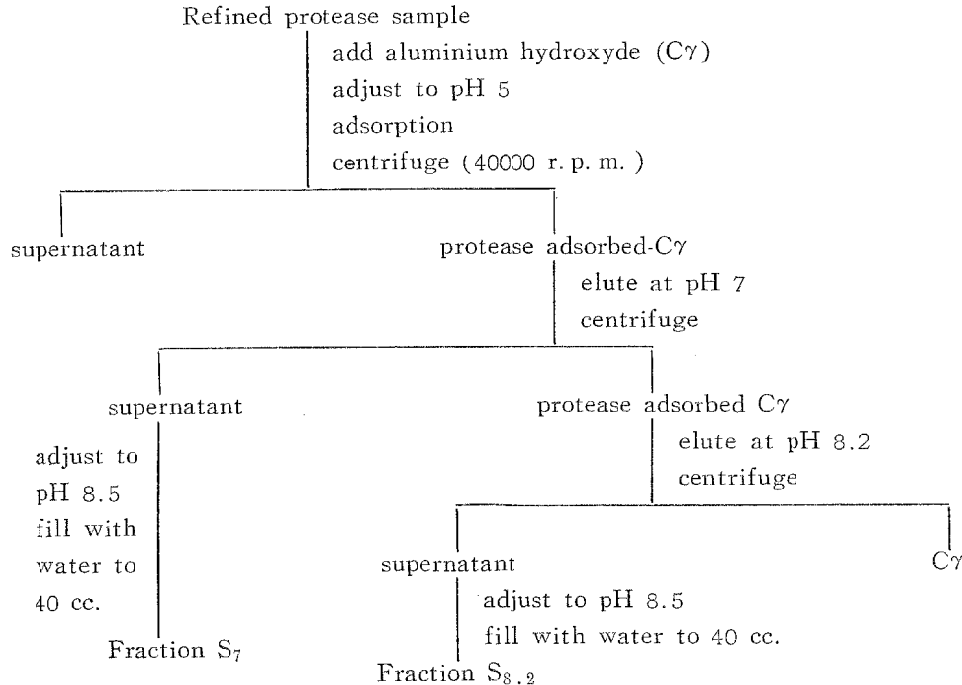


Fig. 1. Showing the preparation of refined enzyme fraction

Note : Preparation of refined protease sample

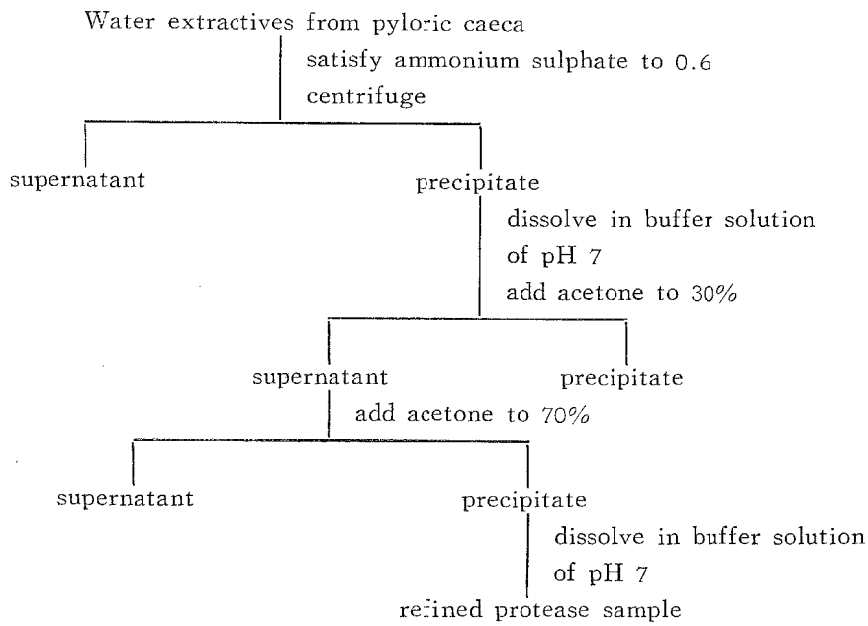


Table 7. Activity of refined enzyme fraction on the casein.

Value of measurement \ Fraction	S <sub>7</sub>	S <sub>8.2</sub>
Poly-N/N-P-S-N × 100	23	24

b) pH7で吸着し pH5及び 8.2で溶離した場合

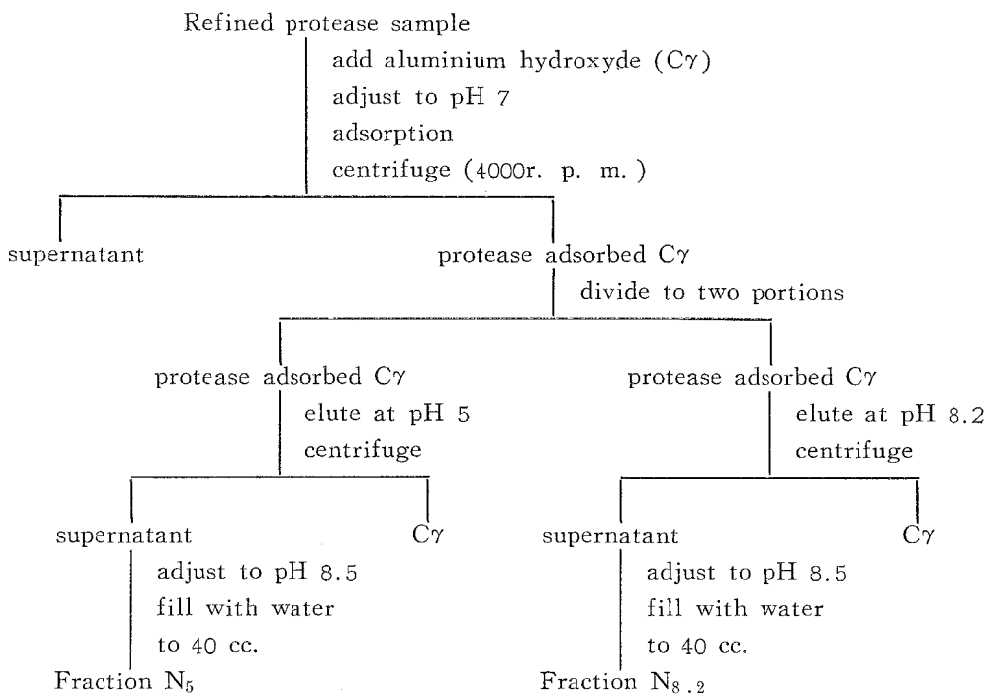


Fig. 2. Showing the preparation of refined enzyme fraction.

Table 8. Activity of refined enzyme fraction on the casein.

Value of measurement \ Fraction	N <sub>5</sub>	N <sub>8.2</sub>
Poly-N/N-P-S-N × 100	15	15

c) pH 8.2 で吸着し pH 7 及び 5 で溶離した場合

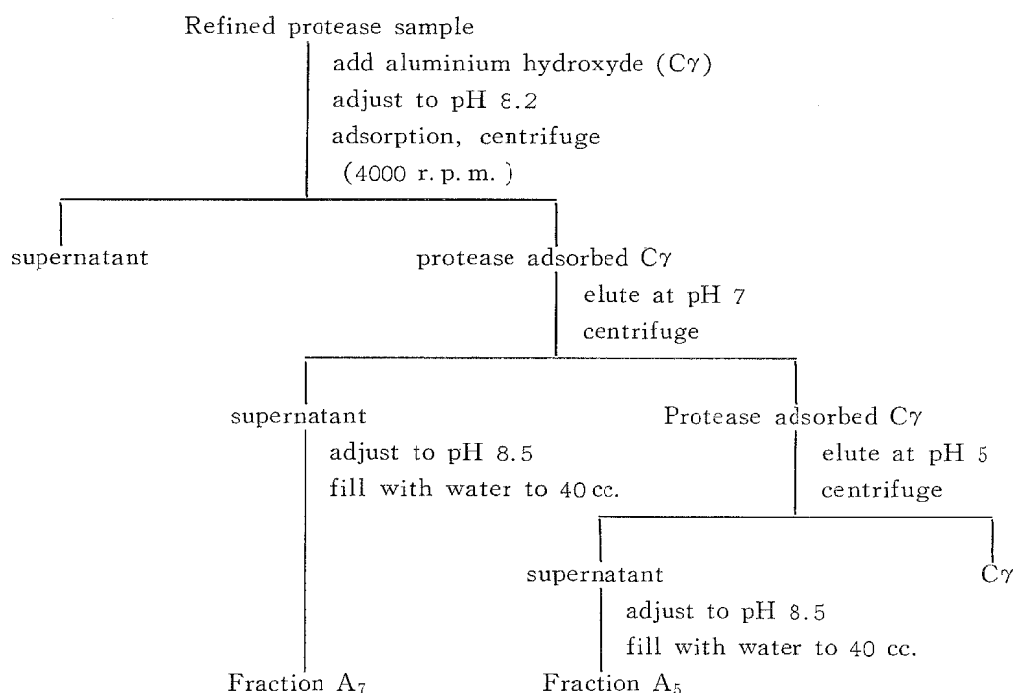


Fig. 3. Showing the preparation of refined enzyme fraction.

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

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

以上の諸実験結果をみるに第7表においては S<sub>7</sub> 及び S<sub>8.2</sub> の測定値は略同値とみることができる。即ち C<sub>γ</sub> に対して pH 5 における吸着酵素は C. B. A1-Pase のそれに近似している。又第9表より pH 8.2 における吸着酵素は A<sub>5</sub> : 10, A<sub>7</sub> : 13 であって特に A<sub>5</sub> の値は T-Pase のそれと全く同値を示した。A<sub>5</sub> 及び A<sub>7</sub> の Act/P-N の値はそれぞれ 534 及び 573 であったので A<sub>5</sub> 及び A<sub>7</sub> とも同じ型の酵素であると考えられる。即ち A<sub>5</sub> 及び A<sub>7</sub> 共に Trypsin 型であると考えられる。

次に pH 7 で吸着した酵素試料の N<sub>5</sub> 及び N<sub>8.2</sub> の値は共に 15 であって (Table 8) この値は上述の両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類門垂プロテイナーゼに対し pH 5, 7 及び 8.2 において C<sub>γ</sub> 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。そして第三の型は上述の二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及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ふべき第三の型の酵素を有することは明きらわである。

## 総 括

結晶プロテイナーゼ及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ンと細菌源の C. B. Al-Proteinase とは分解機構を異にする別個の type に属するものであり、又中性プロテイナーゼであるビオプララ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。次に鮪幽門垂プロテイナーゼを水酸化アルミニウム (C<sub>γ</sub> 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及び細菌型プロテイナーゼの2つの type の存在が認められ、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。

この稿を終るに当り、種々御高見を賜った九大船津教授に対し深甚の謝意を表します。

(註：この報告の大要は昭和34年10月の日本水産学会（於大阪）において報告した。)