

Protease 活性の迅速な新定量法

所謂“Pad-Method”に就いて*

藤 井 実 ・ 富 田 輝 雄

Studies on a New Rapid Determination of Proteolytic Activity
by Means of the So-called “Pad-Method”.

By

Minoru FUJII and Teruo TOMIDA

We have studied how to determine the proteolytic activity by using pad (Pulpdisk).

By means of this new method can be determined the proteolytic activity of trypsin (minimum limit of 0.22 μ g as crystal) within 24 hours.

The procedure runs as follows.

The pad containing ca. 0.0274 ml of enzyme solution is put on the surface of a casein-agar-agar layer with a diameter of 87 mm which is kept in the petri-disk, and incubated at a temperature of 45°C for a certain time.

By the way this layer is composed of 2 ml of 5% casein solution and 10 ml of 1.5% agar-agar solution (pH 8.5).

When ca. 2—3 ml of 5% trichloroacetic acid is added to the agar-agar layer which has been incubated for some time, transparent circle can be seen around the pad in proportion to the length of incubated time.

The diameter of the transparent circle is in proportion to the logarithm of the concentration of enzyme solution.

Thus we can draw the standard curve, which is nearly a straight line, showing the interrelation between the diameter of the transparent circle and the logarithm of the concentration of enzyme solution.

So in this way we may determine the degree of concentration of the enzyme (as crystal trypsin) concerning an unknown sample, referring it to the standard curve.

緒 言

プロテアーゼ作用力の比較値を得る方法として、割合に簡単な方法は、リントナー氏法を応用する稀釈法であるが、此の方法も比較的多量の試料を必要とする。又定量的方法として、

* 水産講習所研究業績 第272号, 1959年7月21日 受理

乾燥量当りの活性度 [ACT/g],²⁾ 蛋白窒素量当りの活性度 [ACT/mg PN]²⁾ 等を測定する方法があり、我々は主として ACT/mg PN に依り酵素力の比較を行っている。即ち酵素試料の蛋白態窒素 1 mg に依り基質カゼインから生成される非蛋白態可溶性窒素量 (mg 単位) で表わしている。勿論比較に便ならしめるために反応条件は特別の目的の場合以外は、反応時間 1 時間；反応温度 45°C である。此の場合窒素の分解はマイクロ・キールダル法に依って硫酸分解し、生成した $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - \text{N}$ をヨードメトリー³⁾ で測定する。そしてその測定限度は蛋白態窒素 0.46 μg 迄可能である。併し此の方法も試料の分解に時間を要するため試料が多くなると、試料の硫酸分解に長時間を要することになり実験は渋滞する。而して酵素の精製過程に於ける酵素力の変化を知るには、迅速に作用力の強弱を測定する必要がある、而もこの場合絶対的な数値でなくてもよい場合もある。又未知の試料のプロテアーゼ作用力の有無及びその強弱を検索する場合、而も僅少な試料に就いて試験する場合も多いのであるが、前記の諸測定方法は此等の目的に合致する方法とはいえないのである。

以上の観点から又実際に実験を推進する必要上、簡単に且つ迅速にプロテアーゼ力を推定し得る方法を実施する必要を生じたので、種々考案実験の結果、Pad を使用する定量法を案出し定量の為の基礎条件を検討した所、本法が操作簡易で上記の諸条件に合致し且つ定量的方法としても使用し得ることを認めた。

実験の部

1) Pad : 直径 6.35 mm の円形濾紙で Carl Schleicher a. Schnell Co. 製で抗菌性物質の測定用に製造されているものである。

Pad の吸水量 (蒸留水) を測定した所 0.0274 ml であった。

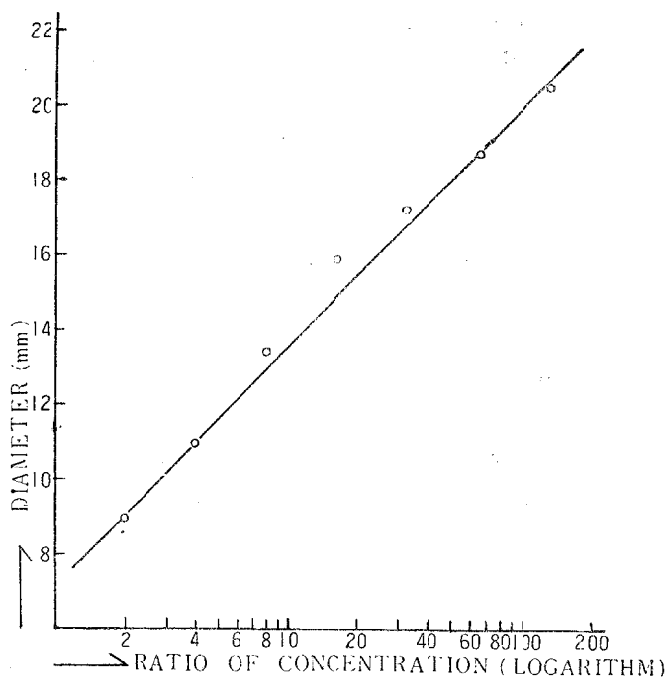


Fig. 1. The standard curve between the ratio (logarithm) of concentration of enzyme solution and the transparent circle.

2) カゼイン寒天平板

内径約87mm のシャーレーに 5% カゼイン液 (pH 8.5) 2 ml と予め加温して溶解した 1.5% 寒天液 (pH 8.5) 10 ml を入れ良く振盪混合した後平板上に置いて放冷したもの。

3) 標準検量線の求め方及び定量操作法

トリプシリン結晶 (持田製薬の製品で商品名トリプシリン… Trypsilin) 25 mg を pH 8.5 の硼酸一苛性曹達一緩衝溶液 (Clark & Lubs 緩衝液) に溶かし全容を 50 ml となし之を酵素原液として倍量希釈法に依り順次酵素濃度を $1/2, 1/4, 1/8 \dots$ の希釈液を作り各液に Pad を

垂直にその $\frac{1}{3}$ 程度浸漬する。然るときは直ちに Pad の全面に液が浸透するので之を液より引き上げて予め 45°C に保温したカゼイン寒天平板上に接着せしめ24時間放置反応させる。反応後直ちに5%三塩化酢酸液約 3 ml を寒天面に注加すると未消化の寒天面は真白くなり消化された部位は透明となり所謂透明二重円（以後透明円という）を生ずる。夫等の円の直径（外径）をノギスで正確に測定する。次に酵素液の濃度比（原酵素液の濃度を1とした場合の比較値）の対数値を求め之を横軸上に目盛りし透明円の直径（単位：mm）を縦軸上に記入してプロットすると第1図のような略直線に近いものを得る。これを標準検量線として未知酵素溶液に浸漬した Pad に依り生じた透明円の測定値を縦軸上に記入し之と標準検量線から透明円の直径に應ずる濃度比を求め次に依り Pad 中の酵素力価（Trypsilin として）を算出する。

$$0.218 \mu\text{g} \times \frac{\text{求めた濃度比}}{2}$$

従って 1 ml の酵素液中の力価は

$$0.218 \mu\text{g} \times \frac{\text{求めた濃度比}}{2} \times 36.5$$

Table 1. The relation between the concentration of enzyme solution and the diameter of the transparent circle correspond to concentration.

Relationship of concentration	1	2	4	8	16	32	64	128
Logarithm of relative concentration $\times 10^3$	0	301.03	602.06	903.09	1204.12	1505.15	1806.18	2107.21
Diameter of circle (mm)	—	8.88	10.95	13.40	15.95	17.25	18.75	20.50
Calculated value of trypsin in pad (as trypsin: μg)	0.109	0.218	0.437	0.873	1.746	3.493	6.985	13.972

尙上記標準検量線を求めた際の酵素溶液濃度と透明円の関係は第1表の示す通りである。第2図は酵素濃度と透明円の直径の関係を示す。

4) 透明円の直径と反応時間

一定濃度の酵素液を使用した場合、Pad の接着時間の長短と透明円の大小との関係を検討した。作用時間を夫々3、6及び9時間とした場合生じた透明円の直径は第2表に示す通りである。（反応温度は 45°C ）之を図示すれば第3図の如くである。

更に他の例を示すと第3表第4図の如くいずれにしても作用時間と透明円

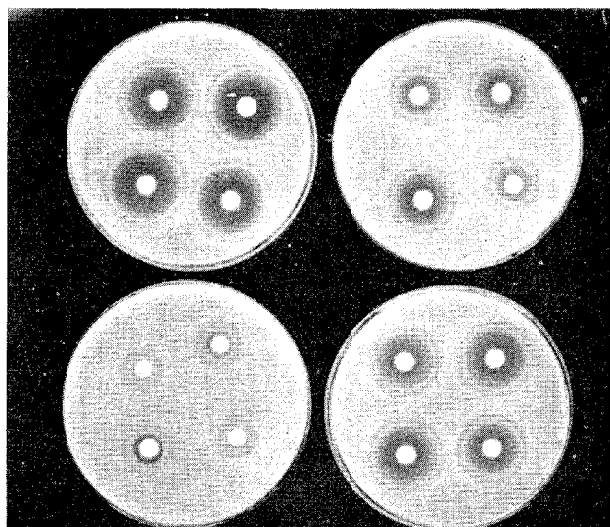


Fig. 2. Showing the transparent circle proportional to concentration of enzyme solution.

の直径は略比例的関係にあることが推定される。即ち此の時間の範囲内に於いては時間と透明

Table 2. The relation between the diameter of the transparent circle and the time of incubation.

Time of incubation (hours)	3	6	9
Diameter of transparent circle(mm)			
Sample (a)	12.47	15.33	18.32
Sample (b)	11.10	13.60	16.60

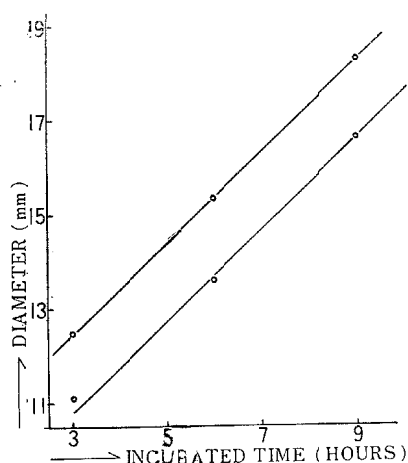


Fig. 3. The relation between diameter and incubated time.

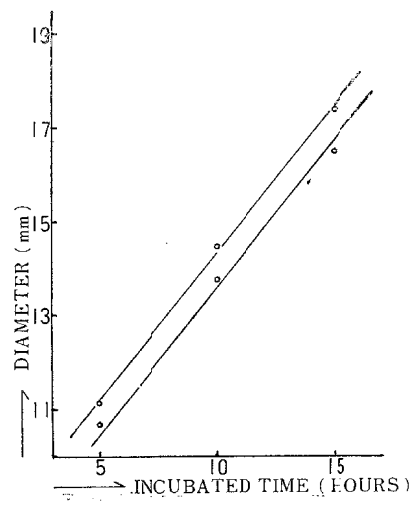


Fig. 4. The relation between diameter, concentration and incubated time.

Table 3. The relation between the diameter of the transparent circle and the time of incubation.

Time of incubation (hours)	5	10	15
Diameter of transparent circle(mm)			
Sample (a)	11.15	14.50	17.40
Sample (b) (concentration: $\frac{1}{2}$ of sample a)	10.75	13.78	16.50

円の直径は直線的関係にあるといえる。

5) 同一シャーレーの位置の差に基づく透明円の直径の差異

同一濃度の酵素液でもシャーレーの部位に依り、即ちシャーレーの底面の僅少な凹凸が寒天の厚さに及ぼす影響により生成される透明円の直径にも差異を及ぼすか否かを検討した。勿論此の実験を行うにあたり先ず第一に問題になるのは各 Pad の酵素溶液吸水量である。之は絶対的に同一量とはいえないが、略同一量吸水するものと仮定する。

同一濃度の酵素液に同一条件で漬浸した Pad をシャーレーの四ヶ所に貼布し生ずる夫々の透明円の直径を測定した結果は第 4 表に示す通りである。

之等の直径値から誤差限界は ± 0.05 mm となるので直径値は 28.64 ± 0.05 (mm) で示される。此の結果から同一シャーレーの場合殆んど差異はないと考えられるが、出来るだけ誤差の原因を除去する為シャーレーは出来るだけ平滑なものを使用すべきである。

6) 寒天平板の厚さと透明円

Table 4. The diameter of the transparent circle caused by the four different positions in the same petri-disk.

Exp. No.	1	2	3	4
Diameter of transparent circle (mm)	28.64	28.70	28.66	28.58

平板の厚さと透明円の関係に就いても予備的検討を行った。薄層を使用すれば円直径も大となるので感度をあげることも可能である。併しシャーレーの底面は完全な平面ではなく、わずかではあるが凹凸がありその為に寒天平板に厚薄を生じるため、プロテアーゼ活性の拡散速度に方向に依る差異を生じ従って透明円は不完全な円形となるのであろう。又寒天平板が厚さを増すにつれてその酵素活性への影響も生ずるものと思われる。之らの事柄を明らかにするため次のような実験を行った。直径を同じくする一組のシャーレーに 5%カゼイン液及び 1.5%寒天液を加えてカゼイン-寒天平板を作る。その際カゼイン濃度はすべて同一で唯寒天平板の厚さが異なるようにする (pHは 8.5)。之等に同一濃度酵素液を浸漬した Pad を接着させて 45°C, 24時間反応せしめて得られる夫々の透明円に就いてその円形及び直径に就いて検討をした。実験の結果は第 5 表の示す通りである。

Table 5. The relation between the thickness of casein-agar-agar plate and the transparent circle.

Exp. No.	1	2	3	4	5
5% Casein sol. (ml)	1	2	3	4	5
1.5% Agar-agar-sol. (pH8.5 : ml)	5	10	15	20	25
Form of circle	non round	round	round	round	round
Diameter of circle (outside : mm)	29.75	29.40	28.25	28.00	26.60

第 5 表で明らかなように寒天平板の厚さが薄い程透明円の直径は大となる。(No. 1 及び No. 2) 併しあまり薄いと透明円そのものが不完全円となる (No. 1)。又寒天平板の厚みが増加してくると透明円の直径は次第に小さくなる。(No. 3, No. 4, No. 5) No. 2 は円形も完全で且つ円の外側輪 (透明) も明瞭でその直径も最大である。即ち No. 2 の条件が目的に叶うものである。

7) カゼイン濃度と透明円

寒天平板中のカゼイン濃度と透明円の関係に就いて検討した。カゼイン濃度を変える方法として 1.5% 寒天液 10 cc に 5% カゼイン液を種々異にして添加した。併し此の場合カゼイン濃度が異なると同時に寒天平板の厚みをも変化せしめたことになり、従って濃度の影響に更に平板の厚みの影響が加算されることになると考えられるが一応実験結果を検討する。

第 6 表に示すような条件に依り実験を行ったのであるが、No. 1 及び No. 2 に於いてはカゼイン濃度不足のため透明円の出現が不明で従って円の直径の測定は不能であった。No. 3 では明瞭な外輪が現われ所謂透明二重円を生じた。

No. 4 も No. 3 と同じく明瞭な透明二重円を生じたが、円の外径及び内径共に No. 3 の夫より小であった。No. 5 になると円の外側透明円がやや不明瞭となり未反応白濁部との区別が出来にくくなる。更に No. 6 及び No. 7 に於いては外側透明円は白濁して周囲との区別は出来

Table 6. The relation between the concentration of casein and the diameter of the transparent circle.

Exp. No.	1	2	3	4	5	6	7
Added casein sol. (5%) (ml)	0.5	1	2	3	4	5	6
Added agar-agar sol. (1.5%) (ml)	10	10	10	10	10	10	10
Transparent circle (outside)	indistinct	indistinct	distinct	distinct	partially indistinct	indistinct	indistinct
Diameter of transparent circle a : outside b : inside	—	—	a. 28.00 b. 23.94	a. 25.10 b. 22.35	a. 24.75 b. 21.85	a. — b. 20.73	a. — b. 19.80

ず内径部のみが透明となる。以上の事実からNo. 3及びNo. 4のカゼイン濃度は透明二重円の出現には適当である。但し第5表の結果からも明らかなように平板の厚さの影響によりNo. 4はNo. 3よりその感度が劣ったものと考えられるので寒天平板の条件はNo. 3の方がより合目的であるといえるのである。又No. 5以上のカゼイン濃度では透明二重円は得られない。而してNo. 3よりNo. 7に至る透明円の内側直径が之れ又順次に小さくなって行くのは第5表の結果と併せ考えると平板の厚薄の影響よりもカゼイン濃度の影響が強くと現れているものと解釈される。又この実験において各寒天平板中の寒天濃度は同一でなくNo. 1が最も高く、それ以下順次減少してNo. 7が最も低い。従って寒天濃度の差異に伴う影響も考えられるのである。この点について1%及び1.5%の寒天液10mlを使用した場合得られる透明円を比較して何ら差異がないという結果を得ている。而してNo. 7の寒天濃度は1%寒天液使用の寒天濃度よりも高いので、その影響は無いものと考えてよい。

総 括

著者等はペニシリン等抗生物質の抗菌力測定に使用されている Pad をプロテアーゼ活性測定に応用する為の実施条件に就き種々検討し所謂 Pad 法を制定した。此の方法は著者等が現在行っている可溶性窒素測定に依る作用力の比較法に比べて操作が実に簡単で然も特異な利点を有する。即ち

1) 一時に多数の試料の測定を容易に行い得る。

2) 試料が僅少の場合、従来の方法では処理不可能であったが、此の方法に依ると酵素活性の有無を明らかに成し得ると同時に酵素含量を定量的に測定出来る。而して此の方法に依る測定の限界は0.22 μ g (結晶トリプシン…商品名 Trypsilin を使用…として)である。

3) 測定に要する時間は24時間以内である。然し予めあらゆる時間(1時間より24時間迄)に応ずる標準検量線を求めておかなば未知試料の酵素濃度に応じて出現する透明円とその任意の反志時間に応ずる標準検量線から任意の短時間に定量的測定が可能である。此の実験を遂行するに当り Pad の寄贈を受けた大洋漁業株式会社下関研究所に厚く御礼を申上げる。尙写真の撮影は小林博助教授にお願いした。記して謝意を表する。

(此の報告の大要は昭和33年10月の日本水産秋季大会(於新潟市)で発表した。)

文 献

- 1) 大島 幸吉：1950. 水産化学実験法.
- 2) 赤堀 四郎：1950. 酵素研究法 1.
- 3) 藤井 実・立川成章・西野イチ：1957. 本報告 6.