

# 0 °Cの条件下に於けるビンナガ鮪幽門垂 プロテアーゼと基質 (カゼイン) との複合体に就いて\*

藤井 実・西野 イチ

On the So-called Enzyme-substrate-compound Formed from  
Protease Extracted from Powder of Long Fin Tuna *Thunnus alalunga*  
and Casein under the Condition of 0°C

By

Minoru FUJII and Ichi NISHINO

We studied on the formation of Protease-casein-compound (-Symplex-) at 0°C.

The results obtained are as follows : the formation of the so-called symplex began as soon as protease and casein were mixed, and its maximum quantity was obtained in about eight minutes.

酵素作用の機構に関しては未だ決定的な説はないが、基質が酵素表面に結合することが酵素作用の第1階梯であるといわれる。<sup>1)</sup> 即ち酵素が基質を分解する場合、先ず酵素と基質の複合体を生じ、次に酵素分子が基質を分離するとき基質を分解するといわれている。

B. CHANCE<sup>2)</sup> はペルオキシダーゼの研究に於いて酵素-基質-複合体の存在を吸収スペクトルの変色の観察に依り証明した。著者等は魚類幽門垂プロテアーゼの研究に於て其の基質として主にカゼインを使用しているが、該酵素も其の至適条件に於いて瞬間的にカゼインと複合体を作り次の瞬間には基質を分離すると共に基質分子の分解を行うものと当然推定出来る。それならば酵素-基質-複合体の分離速度をおそくすることによつて所謂酵素-基質-複合体を捕捉することが出来るなら酵素の精製及び単離を行う上にも好都合であると考えた。そこで酵素の分解力を抑える手段として使用する試薬及び反応液の温度をすべて 0 °C に保つたが、之に依り酵素の基質分解速度を抑制すると共に基質に対する親和力を尙温存せしめ所謂複合体の生成を時間的に捕捉することが出来た。

## 実 験 の 部

酵素液及び基質溶液を 0 °C に保ちその酵素液の一定量をカゼイン反応液 (pH5.2) に添加して一定時間 0 °C に保つた後之に%飽和度硫酸溶液になるよう一定量の固形硫酸を添加して濾過し、沈澱物を%飽和度硫酸溶液でよく洗滌した後其の濾液にトリクロール酢酸を添加して生ずる沈澱物を硫酸分解に附し窒素量を測定した。同時に対照として酵素液及びカゼイン反応液を混合することなく一定の時間 0 °C に放置した後夫々固形硫酸を加えて%飽和度となし、生ずる沈澱物を別々に濾別した後両者の濾液を一緒にして之にトリクロール酢酸を添加して生ずる

\* 水産講習所研究業績 第224号, 1957年7月25日 受理

沈澱を分解し其の窒素量を定量した。

Table 1. Formation of so-called symplex from protease and casein.

a)

Cooling period of mixture. (minutes)	8	13	18
Protein-N. in filtrate of mixture. ( $\text{mg} \times 10^{-3}$ )	4.47	4.23	8.55
Control: total protein-N. in filtrate obtained by filtrating independently casein and enzyme. ( $\text{mg} \times 10^{-3}$ )	10.65	11.01	11.28

b)

Cooling period of mixture. (minutes)	4	6	8	10	12
Protein-N. in filtrate of mixture. ( $\text{mg} \times 10^{-3}$ )	9.69	9.23	7.83	10.02	9.13
Control: total protein-N. in filtrate obtained by filtrating independently casein and enzyme. ( $\text{mg} \times 10^{-3}$ )	—	10.53	10.63	—	—

c)

Cooling period of mixture (minutes)	8	13	18
Protein-N. in filtrate of mixture ( $\text{mg} \times 10^{-3}$ )	4.31	6.85	7.78
Control: total protein-N. in filtrate obtained by filtrating independently casein and enzyme. ( $\text{mg} \times 10^{-3}$ )	9.18	8.85	9.04

以上の実験諸結果から  $0^{\circ}\text{C}$  の反応温度に於いては8分前後に於て沈澱生成量は極小値を示している。之に対し対照値は放置時間と関係なく大体一定値を示している。此のことからプロテアーゼ分子とカゼイン分子は混合された瞬間から酵素-基質-複合体を生じ始めるが約8分附近で最大量に達するものようである。その後沈澱量が徐々に減少するのは複合体の分離速度が徐々に増してくるためであろう。而して各放置時間に於ける測定値が対照区の夫より少い値を示しているが、これは酵素分子がカゼイン分子と結合し或は接触するために硫酸添加に際し沈澱性を増大することに依り逆に濾過性蛋白質は対照に比してより少くなるものと考えられる。濾紙は東洋濾紙株式会社製 No. 7 を使用した。この濾紙の濾過孔の大きさは厳密な意味での均一性を有していないのであるが多数の実験結果は常に上述の傾向を示しているのである。

### 総 括

ビンナガ鮪幽門垂プロテアーゼと基質カゼインを $0^{\circ}\text{C}$ に冷却した後混合して生じた所謂酵素-基質-複合体を捕捉することが出来た。複合体の生成量は混合後約8分附近に於て最大値を示した。本研究は農林省水産講習所後援会研究費によつたことを附記し感謝の意を表します。

- 1) 神前 武和: 1952. 酵素学, 至文堂, 東京.
- 2) 江上・三浦・田沢訳: 1956. 生化学.