

# 魚類プロテアーゼに関する研究(第5報)

## 魚胃液プロテアーゼの酵素化学的性質\*

藤 井 実

Studies on the Protease of Fishes (5)  
On the Enzymatic and Chemical Properties of  
Stomach-juice of Fishes.

By  
Minoru FUJII

The author studied enzymatic and chemical properties of stomach-juice of fishes and inferred that the main protease in stomach-juice is an enzyme allied to kathepsin.

The results obtained are as follows :

- 1) Optimum pH for proteolytic activity of stomach-juice of fishes is about 7 and optimum temperature is about 35°C.
- 2) Furaskin (an antiseptic) - 5 - nitro - 2 - furfural-semicarbazone - 1/20,000 prevents completely propagation of bacteria in the reaction solution, but inhibits the proteolytic activity of pepsin and protease of stomach-juice at a rate of ca. 10 % or less.
- 3) The proteolytic activity of stomach-juice is inhibited by hydrogen peroxide (concentration in solution : 0.6%).
- 4) Protease of stomach-juice of fishes treated with trypsin is as before strongly active at pH 6~7, but exerts as much activity at pH 2 notwithstanding the enzyme is treated with trypsin or not.

### 緒 言

既に発表した如く魚胃液が中性乃至微アルカリ性であるから胃液の蛋白消化も又陸棲動物の夫とは異なる条件で行われていると推察し得るので胃液プロテアーゼの酵素化学的性質に就いて実験を行つた。此の報告をなすにあたり非蛋白態水可溶性窒素の分析を担当された富田技官に謝意を表す。

### 実 験 の 部

1) 胃液プロテアーゼの至適水素イオン濃度に就いて

生魚の胃部を分離切開し、胃内容物及び胃液を再溜水で洗い出し遠心分離機に依り固形物を除去した上澄液を試料とし、基質としてエデスチン及びカゼインを使つた。魚種は主に鯛を用

\* 水産講習所研究業績 第137号。

いたが胃部の分化の程度の低いといわれる皮はぎの胃液に就いても実験した。其等の結果を示すと第1, 2及3表の通りである。

Table 1. Opt. pH of proteolytic activity of stomach-juice of fishes. Kind of fish : Red-sea-bream (Madai), Condition of temp. : 35°C. Period of react. : 24 hrs. Substrate : E destine.

pH	1	2	3	4	5	6	7	8
$\text{NH}_2\text{-N. (cc)} \times 10^{-2}$	5	4	6	7	5	9.6	9	8
Non-protein soluble-N. $\text{(mg)} \times 10^{-3}$	130	128	135	130	140	263	369	205

Table 2. Opt. pH of proteolytic activity of stomach-juice of fishes. Kind of fish : Red-sea-bream. Condition of temp. : 35°C, Period of react. : 24 hrs. Substrate : Casein.

pH	1	2	3	4	5	6	7
Non-protein soluble-N. $\text{(mg)} \times 10^{-3}$	105	105	105	112	120	120	161

Table 3. Opt. pH of proteolytic activity of stomach-juice of fishes. Kind of fish : File fishes (Kawahagi), Condition of temp. : 35°C. Period of react. : 40 hrs. Substrate : Casein.

pH	5	7	8.5
Non-protein soluble-N. $\text{(mg)} \times 10^{-3}$	93	206	196

以上の諸表の示す如く pH 6~7 に於いて非蛋白態水可溶性全窒素量及びアミノ態窒素量は最大を示しカワハギなどでは尙 pH 8.5 の様なアルカリ側でも強力な作用力を示している。

## 2) 胃液プロテアーゼの至適温度に就いて

主として鯛の胃液を使い、反応液の pH を 7 として各温度に於ける作用力を比較したがその一例を示すと第4表の通りである。

Table 4. Opt. temp. of proteolytic activity of stomach-juice of fishes. Kind of fish : Red-sea-bream. Period of react. : 20hrs. Substrate : Casein.

Temp.	5	20	30	35	40	55
Non-protein soluble-N. $\text{cc (as N/28 H}_2\text{SO}_4) \times 10^{-3}$	60.3	863.5	1105.7	1495.3	1337.3	1274.1

此の表の示す通り 35°C の附近に於て最も強い作用力が見られる。

## 3) 胃液プロテアーゼに対するフラスキン (5-nitro-2-furfural-semicarbazone) の影響に就いて。

胃液を其の儘使用するのであるから其の中に生存する細菌の繁殖、従つて細菌に依る基質の分解或は細菌プロテアーゼの分泌等の危険が考えられる。依つて之等の細菌の生存及び繁殖を妨げる為にフラスキンの飽和溶液の一定量を反応液に添加した。併し添加フラスキン自体が胃液プロテアーゼ作用力に抑制的影響を及ぼすことも当然考えられるので先づ予備試験としてペブシン製剤の水浸出液を使つてフラスキン添加に依る阻害作用の程度を検討し第5表の様な結果を得た。

Table 5. Influence of Furaskin (1/20,000)-(5-nitro-2-furfural-semicarbazone) on proteolytic activity of the pepsin. Condition of temp. : 35°C. Period of react. : 42 hrs.

pH	1	2.4	4.4	6.4
None add. of Furaskin. NH <sub>2</sub> -N. (mg) × 10 <sup>-3</sup>	66.1	79.9	64.0	35.5
Add. of Furaskin NH <sub>2</sub> -N. (mg) × 10 <sup>-3</sup>	64.4	69.9	33.3	22.2
Decrease of activity by adding of Furaskin (%).	-2.5	-12.5	-48.2	-36.0

第5表の結果を見るのにフラスキンの添加無添加何れの区に於ても pH 2.4 附近が最も強い作用力を示し、フラスキンの添加により opt. pH の変動を生ずる様な影響を受けない。而して両区の作用力を比較すると pH が 1 及び 2 の様な酸性度に於いては添加区の作用力は無添加区の夫に比して約 10% 或は其れより少い減少率を示しているが、pH が 4 以上になると両者の値の開きが大きくなっている。此のことは強い酸性度に於いては両者共細菌的活動がなくフラスキン添加の影響だけが現れ、pH 4.4 以上の微酸性の場合無添加区に於ては反応時間が長いことと共に細菌の汚染及び増殖が行われてその細菌作用が強くなり現れてきたため添加区の値に比し過大値を示したものである。更にアセトン・エーテル処理を施した幽門垂粉末試料を用いてアルカリ側に於ける酵素作用のフラスキンに依る阻害作用を検した場合に於いても 10% 内外の減少率を示した事実<sup>1)</sup> から考えてもフラスキンのペプシンに対する阻害作用は約 10% 内外と考えてよい。従つて此の種の実験の様な且反応時間の長いものには細菌の混入及びその繁殖による影響を充分考慮すべきであるから、フラスキンの様な比較的酵素作用に対し抑制力の少い細菌繁殖阻止剤を使用すべきである。依つて爾後の実験にはフラスキン飽和液 10cc を添加したが之の反応液中の濃度は約 1/20,000 である。

## 4) 胃液プロテアーゼに対する過酸化水素の影響

試料として鯛を用い其の胃液一定量に 30% 濃度の過酸化水素水 1 cc を添加して其の阻害作用を検したが第 6 表の様な結果を得た。尚過酸化水素の反応液中に於ける濃度は 0.6% である。

Table 6. Influence of hydrogen peroxide on proteolytic activity of stomach-juice of fishes. Kind of fish : Red-sea-bream. Condition of temp. : 35°C. Period of react. : 46 hrs.

pH	2	5	7
None add. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> -N. (mg) × 10 <sup>-3</sup>	23.5	28.7	55.1
Add. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> -N. (mg) × 10 <sup>-3</sup>	13.1	19.3	23.1
None add. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Non-protein-soluble-N. (mg) × 10 <sup>-3</sup>	142.0	200.8	231.7
Add. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Non-protein-soluble-N. (mg) × 10 <sup>-3</sup>	133.9	185.3	226.5

更にカワハギに就いても同じ実験を行い、第 7 表の様な結果を得た。

Table 7. Influence of hydrogen peroxide on proteolytic activity of stomach-juice of fishes as File-fishes. Condition of temp. : 35°C. Period of react. : 39 hrs.

pH	5	7	8.5
None add. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> -N. (mg) × 10 <sup>-3</sup>	28.2	128.6	97.6
Add. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> -N. (mg) × 10 <sup>-3</sup>	5.7	45.9	43.1

第 6, 7 表に示す通り胃液プロテアーゼは過酸化水素の添加に依りその作用を阻害されることを知る。併し作用力はいづれに於いても pH 7 附近で最も強力である。

#### 5) ペプシン系酵素の破壊を行つた胃液プロテアーゼの作用力

ペプシンの消化に就いては之をトリプシンで消化した P. S. YANG<sup>2)</sup> の報告があるので氏の実験条件を使つてペプシンがトリプシンにより消化される条件の検討を行つた。即ちペプシン粉末製剤 0.2g を水 10cc で抽出し此の抽出液 2 cc にトリプシン粉末製剤 0.4g を水 10cc で抽出した液 2 cc を加えて pH 5.4 とし、35°C に夫々 14, 25 及び 41 時間放置して消化させた後之に一定量のエデスチンを添加し反応液の pH を 2 とし 20 時間反応させた。別にペプシン、トリプシン抽出液とも予め加熱煮沸してその作用力を破壊したものを前者と同一条件に処理して対照とした。其の結果を示すと第 8 表の様になる。

Table 8. Digestive action of trypsin on pepsin. pH of reaction solution for digestion : 5.4. Condition of temp. : 35°C.

Period of digestion(hrs.).	14	25	41
NH <sub>2</sub> -N. (cc) × 10 <sup>-3</sup>	127	85	5

上表によつて明かな通り 41 時間放置の場合ペプシン作用力は殆どなくなつてゐる。即ち pH 5.4, 35°C, 41 時間の反応条件でペプシンはトリプシンに依り完全に消化されたのである。よつて胃液を 2 群に分け前記の様にトリプシン抽出液を添加し 35°C, 48 時間放置し (A), 別にトリプシン抽出液を予め加熱し其の作用力を破壊したものを添加し (B), 前者と同様に処理後基質エデスチンを添加し反応液の pH を夫々下表の様に調製して 20 時間反応させた。其の結果は第 9 表の通りである。

Table 9. Proteolytic activity of stomach-juice treated by destroying method for pepsin. Condition of temp. : 35°C. Period of react. : 45 hrs.

pH	2	5	6	7	8
A-group NH <sub>2</sub> -N.(mg) × 10 <sup>-3</sup>	5.6	22.5	41.6	39.3	35.9
B-group(control) NH <sub>2</sub> -N.(mg) × 10 <sup>-3</sup>	5.6	48.3	56.2	54.7	22.5

第 9 表の結果に依れば pH 2 に於てはペプシン消化操作を行ふと否とに拘らず A, B 二群共に同じ作用力を示している。此の事はペプシン系消化酵素の存在しない事を暗示するものである。pH 5, 6 及び 7 に於て A は B よりも作用力の低下を示した。即ち此の pH で作用する酵素系が添加トリプシンに依り相当消化された事を示すものである。而して A B 両群共 pH 6 ~ 7 に於てい最強の作用力を示し更に pH 8 にても相当に強力な作用力を示すのは添加トリプシンの作用が加つた為で之は pH 8 に於ける B の値が A の夫よりも低いことから説明できる。以上の様に A B 両群共に pH 6 ~ 7 に於いて最強の作用力を示すこと、胃液の pH がほぼ中性であること、又胃液には遊離塩酸の存在しない事実や過酸化水素により特に pH 7 附近に於て強い抑制を受ける事等から魚胃液プロテアーゼは主としてカテプシン系酵素であろうと考えるものである。

## 総 括

魚胃液プロテアーゼの酵素化学的性質を検討して其の本質につき推定を行つた。

- 1) 魚胃液プロテアーゼの至適水素イオン濃度は pH 7 附近である。
- 2) 該酵素の至適温度は 35°C 附近である。
- 3) 防腐剤フラスキン (5-nitro-2-furfural-semicarbazone) は酵素反応液中の細菌作用を完全に防除した。而して之がペプシン及び胃液プロテアーゼ作用に及ぼす阻害は約 10% 又はそれ以内であつたが、それ等酵素の至適条件 (温度, pH) を変動させる様な影響はあてなかつた。
- 4) 胃液プロテアーゼは過酸化水素 (0.6% 濃度) に依り阻害される。
- 5) 魚胃液プロテアーゼを予めトリプシン酵素により消化させペプシン系酵素消化の条件をあてた後其の作用力を測定した処、其の作用力は pH 1 及び 2 の様な酸性側では無処理と差なく、pH 6 ~ 7 に於いて相当影響を受けたが依然として最強の作用力を示した。(尙此の報告の概要は昭和 28 年 11 月 6 日の日本水産学会秋季大会に於て講演した)。

## 文 献

- 1) 藤井 実：未発表。
- 2) YANG, P. S. : 1936. chin. J. Physiol, 10.