ヒアルロニダーゼの抽出

高橋 茂 孝

(浪速大学農学部畜産学教室)

Preparation of Hyaluronidase

SHIGETAKA TAKAHASHI

(Laboratory of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture, Naniwa University, Osaka)

ヒアルロニダーゼ (以下 H-ase と略す) の抽出に就ては今日まで多くの研究がある。⁽¹⁻¹⁵⁾ 筆者は MADINAVETIA⁽¹⁰⁾ & OUISELL⁽¹³⁾ 並びに DORFMAN⁽¹⁴⁾ 等の方法を参照し硫酸分割沈澱法により抽出した。更に高単位の H-ase 抽出について DORFMAN^(13, 15) 等, TINT⁽¹⁴⁾ 等の研究がある。筆者は吾々の実験設備の許す範囲内で且今後 H-ase の研究に当り大した支障も見ない程度の酵素分離を目的として抽出を行った。

実験方法

酵素単位の測定に用いる基質ヒアルロン酸は人の臍帯から抽出したものをを用いた。その 0.2% 水溶液は水に対する比粘度 19.0 であった。H-ase の単位測定は粘稠度法によつた。⁽¹⁶⁾ 即ち McCLEAN⁽¹⁶⁾, HAAS⁽¹⁷⁾, KURZROK⁽¹⁸⁾ 等の方法に準じ次の如く行つた。単位は任意に定めたので某市販製品と比較した。

基質溶液 : 1 M グルコン酸曹達緩衝液 pH 4.6 に NaCl を 1 M となるように溶解したもの 1 容と 0.2% ヒアルロン酸水溶液 4 容を混合する。

酵素溶液 : H-ase 乾燥粉末を蒸留水にて 2000 倍に希釈した。

上記両溶液を夫々 25°C で 10 分間恒温水槽に保つた後基質溶液 2.5 cc と酵素溶液 0.5 cc を混合し之から 2.0 cc を取つて OSTWARD 氏の粘度計で測定した。単位の計算は次の如く行つた。

アルロン酸を除く他の全てを含む混合液の落下速度を t_2

H-ase を加熱不活性化した混合液の落下速度を t_0
被検活性酵素を含んだ混合液の落下速度を t_1 とする

$$(t_0 + t_2)/2 = \mu = \text{半減値}$$

とし $t_1 = \mu$ となるまでの反応時間 (分) R を求め上記条件下で R=20 のものを 1 粘稠度低減単位 (VRU) と定め希釈倍率, 反応時間 R から次式により計算した値を酵素乾燥粉末 1 mg の単位と定めた。

$$\text{希釈倍率} (2000) \times 20/R$$

H-ase の硫酸アンモン分割沈澱

凍結牛睪丸の固有鞘膜, 白膜を除いて睪丸実質をとり

出し磨碎し之と等量の N/10 醋酸溶液を加え更にトルオールを加えて 24 時間抽出する。之を濾過して上澄をとり硫酸 30% 飽和と 70% 飽和の間の沈澱物を取り之を冷水に溶解して 5°C 以下で硫酸がなくなるまで水で十分透析する。この酵素溶液を硫酸 36%, 60%, 70% 飽和で分割沈澱し水に溶解し十分透析したる後濾過し 0°C で冷却 Acetone を加え速沈して沈澱を採り之を真空乾燥して粉末とした。

H-ase の抽出は二区に分けて行つた。

実験結果

各分割酵素の落下速度と反応時間との関係は第一図に示す。半減値に達するまでの反応時間 R 及び力価 V. R. U. は第一表の通りである。

考 察

粘稠度の温度に対する感度は甚だ敏感である。38°C では基質及び酵素溶液を混合するとただちに落下速度は半減値以下になるのでこの際は $H_1 H'_1$ は 2 万倍に希釈しなければならなかつた。それで反応を緩慢ならしめるため本実験では 25°C の恒温水槽中で行い且各酵素はグラフ上での比較に便ならしめるため何れも 2000 倍希釈とした。然し乍ら $H_1 H'_1$ は反応混液を粘度計に注加して第一回の測定をした時既に半減値に近いので単位の決定には更に希釈した方が好ましい。

今回は 36—60% 飽和で沈澱したものは何れも 16000 V. R. U. であったが常に同じ単位のものが得られるわけではない。抽出の度毎に変異があるものと思う。然し何れの場合にも硫酸 30—70% 飽和の間で分割沈澱したものを更に 36—60% 飽和で分割すると高単位のものが得られることは疑いないようだ。DORFMAN^(13, 15) 等は更にこまかく分割し硫酸及びエタノールによる分割沈澱をくり返し行い一層高単位の酵素を抽出している。然し未だ純粹に抽出はしていないようであり、そのために受ける研究上の支障は残っている。従つて吾々の研究に於ては本実験に於て 36—60% 飽和の間で得られた程度のものの H-ase の研究を進めている。(1951. 10. 1. 受付)

第一表

酵素 記号	硫酸分割区	R (分)	V. R. N. mg
第一区 H ₁	36%~60%	2.5	16,000
H ₂	{ 30%~36% 60%~70%	20.5	1,951
第二区 H ₁ ¹	36%~60%	2.5	16,000
H ₂ ¹	{ 30%~36% 60%~70%	5.5	7,272
H ₀	市販品	10.0	4,000

参考文献

- 1 DURAN-REYNALS F (1929) : J. Exp. Med., 50 327.
- 2 MORGAN W. J. J. & McCLEAN D (1932) : J. Soc. Chem. Ind., 51, 912.
- 3 FAVILLI & McCLEAN (1934) : J. Path. & Bact., 38, 153.
- 4 AYLWARS F. X. (1937) : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 36, 477.
- 5 CLAUDE A. & DURAN-REYNALS F. (1937) : J. Exp. Med., 65, 661.
- 6 MADINAVEITIA J. (1938) : Biochem. J., 32, 1806.
- 7 ————— (1939) : Ibid 33, 347.

- 8 ————— (1939) : Ibid 33, 1470.
- 9 ————— (1941) : Ibid 35, 447.
- 10 MADINAVEITIA J. & OUIBELL (1940) : Biochem. J., 34, 625.
- 11 HAHN L. (1943) : Biochem. Z., 315 83
- 12 PERLMAN P. L., LEONARD S. L. & KURZROK R. S. (1948) : Endocrinol., 42, 26.
- 13 FREEMAN M. E., ANDERSON P. OBERG M. & DORFMAN A (1949) : J. Biol. Chem., 180, 655
- 14 TINT H. & R. BOGASH (1950) : J. Biol. Chem., 184, No. 2.
- 15 FREEMAN M. E., D. ANDERSON, M. E. WEBSTER & A. DORFMAN (1950) : J. Biol. Chem., 186, No. 1.
- 16 McCLEAN D (1943) : Biochem J., 37, 169.
- 17 Haas E (1946) : J. Biol. Chem., 164, 63.
- 18 SHERBER D. A., C. H. BIRNBERG & R. KURZROK (1948) : Endocrinol. 42, No. 1.

稿を終るに当り御稿閱を賜りました浪速大学産学教室主任安田徳治助教授に深く感謝致します。

Résumé

A procedure has been detailed for the Preparation of high activity enzyme hyaluronidase from bovin testes under this laboratory's conditions. By refraction of the preliminary fractional precipitate which was fractionated between 30% and 70% of saturation with ammonium sulfate, a comparatively voluminous amounts of 16,000 V.R.U. enzyme was obtained between 36% and 60% of saturation with ammonium sulfate.