レンネットに関する研究 IV 結晶性 Rennin の性質について (2)

大 条 方 義・河 西 京 甫

(日本獣医畜産大学)

Studies on rennet IV A study of some properties of crystalline rennin (2)

MASAYOSHI OEDA and KYOSUKE KASAI

(Nihon Veterinary and Zootechnical College)

第Ⅲ報¹⁾の方法で調製した結晶 Rennin の歩留りは、調製の条件に依り影響を受ける。歩留りよく結晶させる試験については先に報告した²⁾。それに依ると力価の 50 %以上を結晶として得られる。かくして得られる結晶 Rennin の組成や性質の一部についてはすでに報告した²⁾。引続き結晶 Rennin の性質に関し試験を行つたので報告する。

1 Rennin 及 Pepsin の Rf について

哺乳動物の胃内 proteinase として、rennin と pepsin とはよく似ている点があり、人の乳児の乳凝固機作に関しても、それが rennin に依るか pepsin に依るのか明でないとする報告もある³⁾。そこで我々は略純粋な rennin を得た機会に、rennin と pepsin との鑑別に paper partition chromatography を試みた。一つは爾後の各研究の資料の一部にする目的をも兼ねしめて試験した。

実験方法

1 展開方法：東洋濾紙 2 号を巾、1cm、長 25cm の Strip に切り、断端より 1.5cm の処に鉛筆で線を引き、線上に原点をとる。毛细管で原点に塗着し、spot の径を 3 mm 以下とした。この strip を真空デシケーターに入れ

室温で数分間で減圧乾燥する。この塗着を 3 回繰返して spot の拡散を防ぎ乍ら材料を充分量附着せしめた。

2 材料：用いた pepsin は初め N. F. Granular (U. S. A.) を、後に国産品を、NORTHROP 等の方法⁴⁾で結晶化したものであり、rennin はⅢ報¹⁾の方法で 3 回再結晶を繰返して純化したものである。(しかしこの標品は後に電気流動で調べた処、極めて僅かの附随蛋白分屑を有するものであることが判つた——後出。)

3 展開：展開は上昇法に依つた。標本用ガラス槽、内法 65×133×深 150mm の底に展開剤を入れ、ガラス槽の口に両端をゴムパッキングで固定してガラス棒を渡し、濾紙 strip をこのガラス棒に懸吊して展開剤を上昇させた。上昇距離は 100mm とし、一組数本宛行つたが、100mm の上昇に約 3 時間を要した。

4 呈色：Patterns の呈色には初め Pauli 反応 (di-azobenzensulfon 酸-ソーダ) を用いてみたが、後には 0.1% ninhydrin butanol を用いた。ninhydrin は水溶液でもよいとの報告⁵⁾もあるが、我々の成績ではやはり butanol sol. の方がやや明瞭であつた。

実験結果

Rf-values of crystalline rennin and pepsin with various solvents.

Solvents		Rf		Note
Components	pH	rennin	pepsin	
n-butanol-H ₂ O, acetic acid (1)	4.2	.77		40ml. of n-butanol sat'd with water and J.P. acetic acid 0.2ml.
n-butanol-H ₂ O, acetic acid (2)	4.4	.13	.37	water sat'd butanol 10ml. + J.P. acetic acid 0.04ml.
n-butanol-HCl (1)	3.2	.29		water sat'd butanol saturated with 0.1 N-HCl
n-butanol-HCl (2)	2.0	.12	.04	water sat'd butanol saturated with 0.05 N-HCl
n-butanol-HCl (3)	4.5	.43		butanol-HCl (2) washed with water
n-butanol-pyridine-H ₂ O (1)	6.3	.26	0	5 : 3 : 2
collidine-H ₂ O (1)	6.3	.18		water sat'd collidine
collidine-H ₂ O (2)	6.5	.23	.05	(1) washed with water
collidine-H ₂ O (3)	6.4	.22		
phenol-NH ₄ OH (1)	4.6	.11, (.22)		phenol + 1/5 vol. 0.1% NH ₄ OH
phenol-NH ₄ OH (2)	6.3	.10, .21, .84	.19, .80	
ethanol (60%)-H ₂ O (1)	5.8	.78		
ethanol (60%)-H ₂ O (2)	5.9	.80	.84	
ethanol (80%)-H ₂ O (3)	5.9	.85	.63	
iso-amyl alc.-urea (1)	6.0	.25		5 % urea
iso-amyl alc.-urea (2)	5.9	.02	0	
methanol (50%)-H ₂ O (1)	5.9	.72, .81, .89	.77	
methanol (70%)-H ₂ O (2)	5.9	.72, .81, .91	.46	
methanol (90%)-H ₂ O (3)	6.0	.83	0	

iso-amyl alc.-H ₂ O	6.0	.04	0	
n-butanol-Na-citrate	5.9	.10	0	water sat'd butanol+ 3% Na-citrate
iso-amyl alc.-Na-citrate	5.9	.20	.20	water sat'd amyl alc.+ 3% Na-citrate
n-butanol-H ₂ O	5.9	.13	0	n-butanol sat'd with water.

考 察

溶剤のpHが低いとRfは小さい傾向がある。pepsin と rennin は Rf の差で鑑別出来る。概して rennin の方が pepsin よりも Rf が大きい。(電気泳動に於ける移動度も pepsin に比し rennin が大きい——後出。) 溶剤に依つては pepsin か rennin かの何れかのみを移動せしめるものがある(例えば n-butanol-H₂O) から両酵素の分離に利用出来よう。

2 結晶性 rennin の電気泳動に於ける観察

(a) 先づ rennin 純化の操作過程に伴つて電気泳動図にどのような変化があらわれるかを見た。又, rennin を精製するにはどんな方法がよいかと云うこと及精製純化したとき, それが純単一蛋白質としての電気泳動図を示すかどうかを見た。

(b) 結晶 rennin はそれが由来した原動物の血液像に照応してどのような関係にあるかを電気泳動的に観察して rennin 酵素蛋白の種類を推定した。

(c) Rennin と pepsin との電気泳動に於ける比較を行つた。

実験方法

日立電気泳動装置 (HT-A型) チェリウスを用いた。

すべて 0.1M KH₂PO₄ 及 0.1M Na₂HPO₄ の組合せによる緩衝液を用い, 試料調製法及取扱いは, 電気泳動研究会の Tiselius 電気泳動法実施規定に従つて行つた。但し試料濃度, 緩衝液の pH 等規定と異なるものはその都度示す。用いたセルは長脚及四節型両方, セルの断面は 3×25mm である。試料は今まで報告した方法で用意したものである。

実験結果並に考察

(a) Rennin を精製結晶化させる過程で rennin に随伴する蛋白分屑が如何に離脱して行くか, 又, 精製された rennin が果して単一の蛋白質であるかどうかを知るために, エキス—粗製沈澱酵素—結晶—再結晶を夫々電気泳動にかけて比較した。

先づレンネットエキスを透析して Cl⁻ の含量が 40mg/dl. 以下となつた酵素溶液を真空デシケーター中減圧で一晩で乾燥し, 粉末試料を作つた。この試料を磷酸緩衝液中 1.0% の濃度に溶解し常法に従つて透析後電気泳動にかける。その泳動図は Fig 1. である。次に透析エキスを攪拌しつつ醋酸を滴下して, pH を 4.4~4.5 として生ずる粗酵素沈澱 (固形分 17%, 水分 83%, 約 150×10⁴ 単

Fig. 1. Electrophoretic pattern of dialysed and dried rennet extract. 100 mg/10 ml, phosphate buffer, pH 7.0, ionic strength 0.14, 120 volt, 14 mA, 3900 sec., at 5°C.

Fig. 2. Electrophoretic pattern of crude-rennin-acetic acid ppt. (moisture 83%), 1000 mg/20 ml., phosphate buffer, pH 7.0, ionic strength 0.14, 120 volt, 14 mA, at 5°C., 1800 sec.

Fig. 3. Electrophoretic pattern of recrystalline rennin. 100 mg/10 ml, phosphate buffer, ionic strength 0.14, pH 8.0, electr. field 5.0 V/cm, at 1°C, 2580 sec. for Ascend. boundary and 2700 sec. for Descending. Photo; by Prof. M. Maeno.

位) を集め, 同様電気泳動図を撮ると Fig. 2. が得られた。更に3回再結晶を繰返したものでは Fig. 3. に示す泳動図が得られる。これらの patterns から次のような考察が可能である。即ち, エキス中では蛋白分屑が3つの峰としてあらわれるが, その後の精製過程に於ける patterns と比較して中央の峰が rennin を示すと考えてよい。又, 中央の峰が rennin であることを確めるために次の試験を行つた。先づ精製純化して単一の蛋白を示す(後出) rennin 結晶の無水物の力価を測定すると約 1,300×10⁴u. である。次にエキスの各峰の示す蛋白質の割合は, 電気泳動図を分割して重量法で, 移動度の大き

い方から順に、平均約 4.2%, 31.3%, 64.5% となり、粗酵素沈澱物の夫れは、5.7%, 62.6%, 31.7% となる。処がエキス試料無水物の力価は 381×10^4 u., 粗酵素沈澱物無水物の力価は 760×10^4 u. であつて、エキスの力価は純 rennin の力価の 29.3%, 粗酵素沈澱物の力価は 58.4% に相当した。DE BAUN⁶⁾ の実験にも見られるように電気泳動に於ける rennin の峰以外の随伴蛋白分層は乳凝固力がない点から考えてこの試験によつて、力価測定の誤差、試料中水分、蛋白分層の割合の算定等の誤差を考慮すれば、Fig 1 及 Fig 2 の中央の峰が rennin であることは略確実である。純化して単一の峰を示すようになった rennin 標品を混合して patterns をとつてみても、Fig. 1, Fig. 2, の中央の峰が rennin であることを示す。

こうして中央の峰が rennin であるが、易動度の大きい側に少量の蛋白分層があり、小さい側に大きい分層が随伴している。しかもエキスでは rennin の約 3 倍もある。このエキスを醋酸で落すと Fig 2. のように rennin が主として沈澱して来る。即ち透析酵素液から醋酸で粗酵素を沈澱させる方法は酵素を撰択的に落す方法であつて合理的であつたと考えてよい。しかし尚易動度の大きい蛋白分層が少量と易動度の小さい分層がかなり残っているのがみられる。このうち易動度の大きい方の分層は結晶化によつて容易に離脱するが、他方の分層は未だ微量乍ら結晶と共にある。即ち粗酵素沈澱物から結晶をとる場合に再結晶を行つても、前報⁷⁾の方法では Fig. 3 に示す通り未だ単一な蛋白質の rennin とはならない。

処が 4 回結晶化を繰返した後念のために 0.5N-HCl で洗滌した結晶の pattern をとつてみると Fig. 4 のように結晶は単一蛋白の峰だけとなつてあらわれる。これらの経験から初結でも dil. HCl で洗滌すると単一蛋白の峰を

Fig. 4. Electrophoretic pattern of recrystallized rennin washed with 0.5 N-HCl. 500 mg of wet recrystallized rennin in 10 ml of phosphate buffer, pH 7.0, ionic strength 0.14, 120 volt, 15 mA, at 10°C, 3600 sec.

示す純 rennin が得られるのではないかと考えて初結の結晶を 20 倍量の 0.5N-HCl で洗滌してみた処、果して Fig. 5 のように初結でも単一蛋白の峰のみの rennin が得られた。後には、従来の洗液でも充分量用いて洗滌すれば、Fig. 5 に示すものと同じものが得られることが

Fig. 5. Electrophoretic pattern of crystalline rennin (crystals from first crystallization) washed with 0.5 N-HCl. 500 mg crystals (wet) in 10 ml. phosphate buffer, pH 7.0, ionic strength 0.14, at 6°C, 120 volt, 12 mA, 4300 sec.

Fig. 6. Electrophoretic pattern of crystalline rennin by M. DE BAUN et al. Ionic strength 0.1, protein conc. 0.8, protein in each fraction, per cent of total; A₁ = 11.7, A₂ = 5.7, B = 83.6 (descending boundary), mobility ($\times 10^5$) of descending boundary; A₁ = -2.08, A₂ = -3.81, B = -5.83, phosphate buffer, pH 6.55~6.60.

判つた。(結晶の洗滌に用いる dil. HCl は 0.3N よりも稀薄になるに従つて結晶を溶解する。0.3~0.4N 程度でも多少結晶は溶去する。)

以上のように我々の得た結晶性 rennin は単一の蛋白質であることが明になつた。

R. M. DE BAUN 等⁶⁾の報告に依ると彼等の得た結晶は市販 (Hansen) のエキスから、HCl, NaCl で落し、almina に suspend し、その透析液に少量宛 HCl を加えて行つて結晶させる方法で収率 5% 程度であり、その電気泳動図は Fig. 6 に模写した通りである。彼等の結晶は多量且つ多種類の随伴蛋白分層を有し、その割合は 5.7% 及 11.7% 又は計 17% に及んでいる。図に於て rennin は B の峰であつて、全蛋白の 83.6% となつている。

(b) Rennin が globulin の一種であることは抽出精製の処理過程や他の性質から明であるが、いかなる globulin に属するかは明でないので rennin が犢胃の分泌物質である処から犢血清の電気泳動像をとつて血液蛋白質との関係を調べてみた。犢血清の電気泳動図は Fig. 7 のようであり、これは従来よく知られた人の血清の pattern と類似している。これに単一蛋白の rennin を

Fig. 7. Electrophoretic pattern of calf-serum, protein conc. 2.0%, phosphate buffer, pH 7.0, ionic strength 0.14, 120 volt, 14 mA, at 5°C, 4980 sec.

Fig. 8. Electrophoretic pattern of calf-serum and rennin mixed. protein conc. 2.0 %, phosphate buffer, pH 7.0, ionic strength 0.14, 120 volt, 14 mA, at 5°C, 5400 sec.

加えた場合の pattern は Fig. 8. になる。

この2つの patterns を比較すると descending boundary に明かなように、rennin は α -globulin の部分に重なる。今これを更に明確にするために同じ血清から globulin を分離して来てその pattern をとり、又その globulin に純 rennin を加えて得る pattern を重ねてみると、rennin はやはり α -globulin と一致する。即ちその状況は Fig. 9 及 Fig. 10 に示す通りである。(血清 globulin は硫酸飽和で塩析し、塩析を3回繰返して精製し、透析後、真空デシケーター中減圧で、室温下、一夜で乾燥し、粉末として用いた。Fig. 9 に見られるように globulin 中に微量の albumin と fibrin とが尚残存している。)

Fig. 9. Electrophoretic pattern of calf-serum-globulin, protein conc. 2.0%. Phosphate buffer, pH 7.0, ionic strength 0.14, at 10°C, 120 volt, 14 mA, 5400 sec.

Fig. 10. Electrophoretic pattern of calf serum-globulin and rennin mixed, protein conc. 2.0 %, phosphate buffer, pH 7.0, ionic strength 0.14, at 10°C, 100volt, 12 mA, 8800 sec.

(c) 我々の用意した純 rennin 結晶は蛋白分解作用が極めて低く、乳凝固力のみ高いと云う報告があることについては第Ⅲ報で触れたが、その詳細については追って試験するつもりである。そこで近似酵素としての pepsin と rennin とを比較するために両者の電気泳動性を調べた。pepsin は国産品 1 : 5000 を buffer に溶解し、

透析したが尚濁濁があり、遠心、濾過を行つたが透明にはならず、かなりの蛋白濁及淡黄褐色があつたために泳動図は暗い。この pepsin の pattern は Fig 11. に、又 pepsin に rennin を加えた場合の pattern は Fig 12. に示す。

Fig. 11. Electrophoretic pattern of pepsin ; pepsin conc. 1.5%, phosphate buffer, pH 7.0, ionic strength 0.14, at 8°C, 120 volt, 14 mA, 9,000 sec.

Fig. 12. Electrophoretic pattern of pepsin and rennin mixed ; pepsin conc. 1.2%, and 200 mg of wet rennin crystals in 10 ml., phosphate buffer, pH 7.0, ionic strength 0.14, at 6°C, 120 volt, 14 mA, 2700 sec.

図に示すように粗 pepsin は易動度の大きい側に、粗 rennin は Fig. 2. 及 Fig. 3. のように易動度の小さい側に夫々随伴蛋白分層を有し、この粗 pepsin と粗 rennin を混合すると、その pattern では rennin は pepsin の随伴蛋白分層上に、又 pepsin は rennin の随伴蛋白分層上に夫々重なる。純化されず、従つて夫々随伴蛋白分層を有していた従来の pepsin 及 rennin では、夫々の酵素の一部が不純物と重なり合うか、或はそのために阻害作用を受ける状態にあつたと思われる。しかしこの点に関しては更に同種蛋白が蛋白酵素の作用時に阻害作用⁷⁾をするか否かをしらべる必要があろう。

要 約

結晶性 rennin の性質について引つづき試験を行い、Rf と電気泳動性について報告した。

Paper partition chromatography に於ける純 rennin の Rf は概して pepsin よりも大きく、同じ溶媒なら pH が高い程大きい傾向がある。又展開剤によつては rennin と pepsin の混合物から一方のみを移動させることが出来る。

電気泳動性については、先づレンネットエキスから粗酵素沈澱、結晶、再結晶の順に純化するに従つて酵素に随伴する蛋白分層は離脱して単一蛋白質の rennin が得られる。しかし初結でも 0.5N-HCl か又は多量の CaCl_2 -

HCl洗液で洗滌すると rennin は純粋な蛋白になる。

結晶性renninの電気泳動に於ける易動度は、そのrenninをとつた犢の血清 globulin 中の α -globulin と同じである。

粗製renninに随伴する蛋白分層は pepsin と、又粗pepsin に随伴する蛋白分層は純 rennin と、易動度が略同じである。

この実験について御援助を賜つた東大農化佐々木林治郎先生、同教室山内邦男氏、北大前野教授に感謝する。

(1955. 1. 21. 受付)

文 献

- 1) 大条・河西 (1954): 日畜会報 25, 2~4; 209.
- 2) 大条・河西 (1954): 日本獣医畜産大学紀要 3.; 73
- 3) 糸賀 (1954): 小児科学会 (仙台)
- 4) 化学実験学 II, 12. 河出. p. 765.
- 5) 武藤 (1951): 農化, 24; 323.
- 6) R. M. DE BAUN et al. (1953): Arch. Biochem. Biophysics, 43; 324.
- 7) 奥貫 (1952): 酸酵化学, 共立. p. 25.

Résumé

The Rf-values of crystalline rennin are generally larger than those of pepsin, and if pH-values of solvents are higher, the Rf-values are larger.

On the properties of crystalline rennin, we studied with the result that crude rennin prepared from dried extract or precipitated crude rennin from dialysed rennet extract, has three peaks in the electrophoretic pattern—one in the side of larger mobility and another in the smaller, and the central third is of rennin.

From these crude rennin preparations, we obtained purified rennin of single protein fraction by

repeating the recrystallization or washing the first crystallized rennin crystals with 0.5 N-HCl solution.

The mobility of the purified rennin in the form of crystal is almost the same with that of the α -globulin prepared from the serum of a calf, from which rennin was prepared.

The mobility of the protein fraction accompanying crude rennin is almost the same with that of purified pepsin, and the protein fraction accompanying crude pepsin is the same with that of purified rennin.