磷の結合状態の異常についてしらべた結果は次の通りである。

(1) 不安定乳は乳腺細胞の乳蛋白質生成の際にカゼインが減少するがアルブミン, グロブリン, プロテオース, ペプトンおよび非蛋白の分布には顕著な異常は認められなかった。また細菌乳でもないことから乳房炎乳とは性質を異にした一種の生理的異常乳であると推察された。

(2) 不安定乳はカゼイン減少のためカゼインに対するカルシウム, 磷の結合状態が変調となっていた。すなわちカルシウム, 磷のイオン化が増加し, 且つカゼイン結合のカルシウム及び磷の絶対量が過剰又は不足となり結合 Ca/P が不均衡となり, とくに結合磷の低下が目立っていた。

(3) すなわち牛乳の安定性とカゼイン結合のカルシウム, 磷の均衡は密接な関係をもっていることが認められた。

本研究は森永奉仕会研究奨励金により行ったものの一部である。また御指導御鞭撻を賜った岩田久敬教授に対して併せて厚く御礼申し上げます。

(1) 宮辺豊紀 : 本誌, 34, 344 (1960).	(12) L. Seekles, W. Smeets : <i>Nederlands Melk Zuiveltjdschr.</i> , 9, 249 (1955).
(3) 柳沢文正 : 生化学実験法 (文光堂), p. 1 (1953).	(13) W. Smeets : <i>Nederlands Melk Zuiveltjdschr.</i> , 9, 249 (1955).
(3) F. Subbarow : <i>J. Biol. Chem.</i> , 66, 375 (1925).	(14) J. Boogaardt : <i>Nature</i> , 174, 884 (1954).
(4) 佐々木林治郎, 津郷友吉 : 乳の化学 (地球出版), p. 198 (1957).	(15) L. A. Allen : <i>J. Dairy Res.</i> , 3, 1 (1931).
(5) S. J. Rowland et al. : <i>J. Dairy Res.</i> , 10, 108 (1939).	(16) F. H. McDowall, R. M. Dobby : <i>J. Dairy Res.</i> , 6, 218 (1935).
(6) 前野正久 : 日畜会報, 28, 4, 197 (1957).	(17) 宮辺豊紀 : 香大農学報, 11, 241 (1959).
(7) S. J. Rowland : <i>J. Dairy Res.</i> , 9, 47 (1938).	(18) 宮辺豊紀 : 香大農学報, 11, 244 (1959).
(8) K. M. Shahani, H. H. Sommer : <i>J. Dairy Res.</i> , 34, 1010 (1951).	(19) 前野正久 : 畜産製造学, カゼイン篇 (地球出版) p. 22 (1953).
(9) 津郷友吉 : 本誌, 30, 10, A 105 (1956).	(20) D. V. Josephson, C. B. Reeves : <i>J. Dairy Sci.</i> , 30, 737 (1947).
(10) H. H. Sommer, E. B. Hart : <i>J. Biol. Chem.</i> , 40, 137 (1919).	(21) H. E. Otting : <i>Ind. Eng. Chem.</i> , 41, 457 (1949).
(11) H. H. Sommer, E. B. Hart : <i>J. Dairy Sci.</i> , 5, 6 (1922).	(22) 佐々木林治郎, 津郷友吉, 矢島有信 : 本誌, 29, 288 (1955).
	(23) 佐々木林治郎, 津郷友吉, 中井秀了 : 本誌, 29, 292 (1955).

小豆種子蛋白の代謝に関する研究 (第1報)*

小豆種子の蛋白分解酵素

阿久根了, 高木茂明 (九州大学農学部農芸化学科)

昭和34年11月17日受理

緒言

果実中のプロテアーゼであるパパイン, フィシン等は従来多くの報告があるが, 之に反して種子中のプロテアーゼに関する報告は落花生種子中の arachain⁽¹⁾, 大豆種中の soyn⁽²⁾ 等の外は現在迄に報告されたものがほとんど見当らない。著者等が研究を行ったプロテアーゼ (アズキプロテアーゼと呼ぶ) は種子中に存在する一種の蛋白分解酵素である。一般に種子中には多量の貯蔵蛋白, 糖蛋白の如き粘質物が含まれていてこれらの物質が酵素精製の際に非常な障害となり, 精製を一層困難ならしめている。

アズキプロテアーゼは既知植物性プロテアーゼの作用機構の上で多少特異性が異なり, 後述の如く pH 4.5 附近に最適 pH を有している。他の大部分のプロテアーゼが中性附近に於て作用するのに比較して, カテブシンに似た性質を有するのではないかと考えられる。植物性プロテアーゼは従来研究されたものでは, pH 4.2~4.5 に

* Studies on the Metabolism of Azuki Seed Protein. Part I. Protease in Azuki Resting Seed. By Satoru AKUNE, and Shigeaki TAKAGI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

最適域を有し, SH プロテアーゼでないものは皆無である。例えば *Bromelia pinguin* の果肉中にある Pinguinain⁽³⁾ と *Tabernamontana grandiflora* の果肉中にある Taberna-Montanain⁽⁴⁾ が基質にミルク、ゼラチンを用いた場合夫々 pH 3.0, pH 5~6 に最適域を有しているが、これらは共に SH プロテアーゼである。

アズキプロテアーゼは、長期間の透析によって活性は殆ど減少しない故に補欠分子簇を持っていないものと思われる。又各種の酵素阻害剤、賦活剤によって殆ど影響を受けない。このようなプロテアーゼは今迄にその報告例がなく、休眠種子中のプロテアーゼを調べることは種子発芽の際の種子蛋白の代謝並に酵素系の遷移を知る手懸りとなると考えたので、その実験結果を報告する。

実験方法並びに材料

(1) 供試酵素溶液調製：昭和 32 年度産市販小豆を衝撃切断粉碎機により粉碎し大部分を 100 メッシュ通過とした。これに約 10 倍容の 2 M 食塩水（磷酸緩衝液により pH を 7.0 に合せ、磷酸の終濃度を 0.01 M とした）を加えて時々攪拌しながら 12 時間冷室に於て抽出を行い、ガーゼによって濾過した。濾液は黄褐色不透明である。これを原液とした。

(2) 酵素試験：基質にはカゼイン、ヘモグロビン、卵アルブミンを用いた。カゼインは Kunitz⁽⁵⁾ の方法に準じて市販品（メルク製ハンマーシュタイン）を各 pH の緩衝液に 2% となるように溶かし、これに尿素を加えて終濃度を 6 M とし、沸騰水中に 30 分間浸漬して完全に透明としてから使用した。ヘモグロビンは馬血球から調製⁽⁶⁾した結晶を Anson の方法⁽⁷⁾に準じて尿素変性溶液を作った。卵白アルブミンはカゼインとほぼ同じ様にして基質溶液とした。

酵素試験には特別の場合を除き全て Folin-Ciocalteu⁽⁸⁾ のフェノール試薬による比色法を使用した。操作は特に説明しない限りは次の方法に従って行われた。酵素溶液 1 ml を試験管にとり、36° の恒温槽に 3 分間浸し、予め同じ温度に保ってあった基質溶液 1 ml をを加えよく振盪した後所定の時間反応させた。この時基質の終濃度は 1% となっている。適時に 0.4 M 三塩化酢酸溶液 2 ml を加えて反応を中止せしめ、そのまま 30 分間放置後濾過する。

無色透明な濾液 1 ml に 0.4 M 炭酸ソーダ液 5 ml を加えた後 5 倍稀釈のフェノール試薬 1 ml を入れて手早く振りまぜる。この溶液を 36° に 30 分間保ち取り出して冷却後直ちに東京光電製 V 型光電比色計を用いて、660 mμ に於ける吸光度を測定し、ブランクとの差をもって各々の測定値とした。ブランクは次の順に各溶液を混合したものである。酵素溶液-TCA-基質。普通の酵素試験には次の 2 つの基質溶液を用いた。0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解させた 6 M 尿素変性ヘモグロビン。同じくカゼイン。

この酵素試験の条件下では、蛋白分解率は酵素蛋白濃度に比例した。

蛋白濃度測定は O. H. Lowry 等⁽⁹⁾の Cu-Folin 法に従って行われた。標準曲線は結晶卵アルブミンを用いて描き、蛋白濃度は 0~400 γ/ml の範囲で測定した。なお硫酸沈澱をした時のように濾液に硫酸根の多量にある場合は、この方法を用いると非常に低い発色率が得られるので、ベックマン DU 型分光光度計を用いて 278 mμ に於ける吸光係数から蛋白濃度を算出した。

実験結果並びに考察

(1) pH とプロテアーゼ活性との関係：反応液の pH 2~9 の範囲に於て酵素活性を測定した結果を第 1 図に示す。アズキプロテアーゼはヘモグロビンに対しては 4.2~4.3 に、カゼインに対しては 4.4~4.6 に最適 pH があった。

以上は後記第 3 表の C₂ を用いた時の結果である。原液について同一実験を行った結果熱変性カゼインを用いると中性附近に一つの山が現われた。この山に相当する酵素は尿素に対する抵抗性弱く、基質を 6 M 尿素溶液とすると、活性は全く失われてしまう。

第 2 図に示される通り、カゼインはヘモグロビンより約 2 倍の基質適応性を有する事がわかった。本測定は加水分解により TCA 可溶となったチロシン、トリプトファン残基が測定されることから考えて蛋白のアミノ酸組成、配列順序、作用を受ける結合部位等の相異によって差異を生ずるものと考えられるけれども、大体に於てカゼインの方がよく分解されるように認められた。卵アルブミンに対しては殆ど作用しなかった。

(2) 温度の影響と安定性：ヘモグロビンを基質として pH 4.2 で酵素活性の温度による影響を測定した結果は第 1 表の通りで、最適温度は 40° であった。第 3 図に示す如く 2 時間後の活性は 35° におけるものが 45° のも

第1図 pH と酵素活性との関係
基質: ○—○ 尿素変性カゼイン
●—● 尿素変性ヘモグロビン
反応時間: 30 分, 蛋白濃度: 624 γ /ml

第2図 カゼイン, ヘモグロビン, 卵アルブミンの被水解の比較

基質: ○—○ カゼイン, ●—● ヘモグロビン
●—● 卵アルブミン
蛋白濃度: 179 γ /ml

のより大となっている。このことはプロテアーゼが比較的高温に長時間放置されたことにより失活して来たためであろうと思われる。耐熱試験の結果は第4図に示す。40° に於て 30 分後には酵素活性は約 72% に減少することがわかった。それ故アズキプロテアーゼは熱に対し比較的に弱いのではないかと考えられる。又アズキプロテアーゼは 0.01~0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解されている場合が比較的安定であって、冷室に於て長期の保存に耐えることを経験的に知ることが出来た。酢酸緩衝液中に於てはかなり不安定であり、中性付近でも酢酸根の存在によって失活し易いようである。

第1表 アズキプロテアーゼに対する温度の影響 (I)

反応温度 (°C)	30分後の活性 (%)
35	61
40	100
45	75
50	51

第3図 アズキプロテアーゼに対する温度の影響 (II)

反応温度: ○—○ 40°, ●—● 35°, ●—● 45°
蛋白濃度: 342 γ /ml

第4図 アズキプロテアーゼの耐熱性試験

基質: 尿素変性ヘモグロビン
浸漬温度: ○—○ 40°, ●—● 50°

(3) 基質濃度の影響: アズキプロテアーゼの活性に対する基質濃度の影響は Lineweaver & Burk⁽¹⁰⁾ の方

第5図 基質濃度の影響

Lineweaver-Burk 法による図解により K_m を求めた。pH 4.3, 35° で1時間反応させた。蛋白濃度 1.03 mg/ml

第4表 精製フラクションとその活性比

フラクション	活性比
原液	1.0
C ₁	1.8
C ₂	4.5
C ₃	0.7
C ₂ -S	7.0
C ₂ -Ac	11
溶出液 A	25

第2表 各種賦活剤, 阻害剤の影響

試薬	濃度 (M)	活性比	
		アズキプロテアーゼ	アラキシン
—	—	1.0	1.0
Cysteine	5.0×10^{-3}	1.05	1.0
モノヨード醋酸	1.0×10^{-3}	1.18	—
Cyanide	1.0×10^{-3}	0.91	1.0
Guanidine·HCl	5.0	1.14	—
EDTA	1.0×10^{-3}	0.74	—
Cu ⁺⁺	5.0×10^{-3}	0.90	—
Ca ⁺⁺	5.0×10^{-3}	0.90	—
Ascorbic acid	5.0×10^{-3}	1.04	1.1
過酸化水素水	5.0×10^{-3}	1.23	0.83

第3表 アズキプロテアーゼの精製

原液	
沈澱 C ₁	上澄 S ₁
硫安 0.25 飽和として2時間放置後ハイフロスパーセルを使用して吸引濾過	
硫安 0.5 飽和	
上澄 S ₂	沈澱 C ₂
硫安 0.7 飽和	
沈澱 C ₃	上澄 C ₂ -S
多量の蒸留水に対して3昼夜透析	
多量の 0.1M 醋酸緩衝液に24時間透析 pH 4.0	
上澄 C ₂ -Ac	
磷酸カルシウムゲルによるカラムクロマトグラフィー	
溶出液 A

第6図 C₂-Ac の磷酸カルシウムゲル吸着クロマトグラフィー

●—● 蛋白濃度 ○—○ プロテアーゼ活性
 溶出液: 0.15M phso+0.2M NaCl+各濃度の硫安 カラム: 径 3.5 cm・長さ 15 cm

法に従ってプロットすれば第5図の通りであって, Michaelis 恒数を求めると $K_m=2.7$ であった.

(4) 各種賦活剤, 阻害剤に対する挙動: アズキプロテアーゼは各種のプロテアーゼ賦活剤, 阻害剤に対してかなりの抵抗性を示した. $10^{-2}M$ の CN^- , $10^{-2}M$ のモノヨード酢酸によって殆ど影響されない. これらの事からアズキプロテアーゼは SH 酵素ではないと云い得る. これを一括して第2表にまとめた. なお同時に arachain⁽¹⁾ のこれら物質に対する挙動を示した.

以上の諸事実からみるとアズキプロテアーゼは arachain とほぼ同じような被賦活, 阻害性を有することが認められ, 何れも SH プロテアーゼはないことが想定される. 然し arachain, soya 是最適 pH が中性附近にある点でアズキプロテアーゼと異なる.

(5) 酵素の精製: 抽出原液を第3表に従って処理操作し精製を行った. 本表に於て S1 は完全に透明となり, 原液の濁りの原因であった粘質物の類は C_1 に入ってしまうので後の処理が大変し易くなった. C_2 の量は抽出液中の蛋白量に比べて僅かであって, 大部分は C_3 に入る. この C_3 は貯蔵蛋白と考えられる. C_2-S は C_2 を多量の水に対して 24~36 時間透析することによって得られる上澄液であって, アズキプロテアーゼ活性は全てこの区に入ってくる. C_2-S を pH 4.0 の 0.1 M 酢酸緩衝液に透析した時の上澄液 C_2-Ac は更に活性を増した. これらの精製操作により第4表の如く酵素活性比は約 25 倍に増加した.

C_2-Ac は電気泳動, 超遠心的に単一なものでなかったのに更に燐酸カルシュームゲルを用いた吸着クロマトグラフィーを行い, 一層精製されたものを得た. 操作は Tiselius 等⁽¹¹⁾ に準じて行われた. 被吸着蛋白の溶出には比較的高濃度の燐酸緩衝液を用いねばならなかったが, 冬期は 0.3 M 以上は結晶が析出して使用不能となるので, 硫酸をイオン強度増加に使用した. 溶出図は第6図に示す. 硫酸濃度を 0.3 M から 0.4 M に上げると C_2-Ac は2つの部分に分れる. 全体の蛋白回収率は 90% 以上である.

酵素活性の強い部分の蛋白量は活性の弱い部分のその約 1/2 であった. 数回の実験を行ってかなり再現性のある結果が得られた. 更に活性のある部分の再クロマトグラフィーを行ったが, 0.1 M 硫酸以下の溶媒を用いると蛋白は全く溶出せず, 溶媒中の硫酸濃度を少しずつ増加させた場合燐酸濃度の増加に比べて, 脱着溶出に対し鋭敏な影響を示さない為分割は必ずしも完全に行われなかった. この溶出液の内活性のある部分の電気泳動, 超遠心像を観察すると不純物の相当量の混入が想像される.

上記のような溶媒を用いた場合, 燐酸カルシュームゲルによるクロマトグラフィーによって単一の酵素を得ることが出来なかった. アズキプロテアーゼの精製は今後更に研究を要するものである.

要 約

小豆種子中に存在する酸性側プロテアーゼの部分精製を行い次の事を明らかにした.

- (1) 最適 pH は基質としてヘモグロビンをういた場合は 4.2, カゼインをういた場合は 4.4 であった.
- (2) 最適温度は 40° であるが, この温度に於ては 30 分後に活性は 72% に減じた. 比較的熱に弱い酵素であることが知られた.
- (3) Folin 法により活性の測定を行った結果, アズキプロテアーゼに対する基質適応性はカゼインがヘモグロビンの約 2 倍であった. アルブミンは殆ど作用されなかった.
- (4) アズキプロテアーゼは所謂プロテアーゼ賦活剤によってほとんど影響されず, 阻害剤に対しては非常に強い抵抗性を有している. 又これにより SH プロテアーゼではないことが認められた.
- (5) 部分的精製を行い酵素活性は約 25 倍に増加した.

(1) G. W. Irving Jr. et al. : <i>Arch. Biochem.</i> , 6, 351 (1945).	(7) M. L. Anson : <i>J. Gen. Physiol.</i> , 22, 79 (1938).
(2) "The Chemistry and Technology of Enzymes" H. Tauber : John Wiley & Sons, New York (1945).	(8) O. Folin, V. Giocalteu : <i>J. Biol. Chem.</i> , 73, 627 (1927).
(3) C. F. Asenjo, M. del Capella de Fernández : <i>Science</i> , 95, 148 (1942).	(9) O. H. Lorry et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 193, 256 (1951).
(4) W. G. Jaffé : <i>Rev. Brasil. Biol.</i> , 3, 149 (1943).	(10) H. Lineweaver et al. : <i>J. Ann. Chem. Soc.</i> , 56, 658 (1934).
(5) M. Kunitz : <i>J. Gen. Physiol.</i> , 30, 291 (1947).	(11) A. Tiselius et al. : <i>Arch. Biochem. & Biophys.</i> , 65, 132 (1956).
(6) M. Heiderberger : <i>J. Biol. Chem.</i> , 53,	