[農化 第 35 卷, 第 14 号, p.1361~1364, 1961]

パパイソその他プロテアーゼの微量定量法*

堀 江 雄 (麒麟麦酒株式会社研究所尼崎分室)

昭和 36 年 4 月 28 日 受 理

緒 言

パパイソの作用機構の研究に際しては、その酵素活性の測定法が不可欠である。通常のパパイソ力価測定法としては Davis ら⁽¹⁾が記す如く、ヘモグロビン法^(2,3)、カゼイン法⁽⁴⁾、合成基質法⁽⁵⁾、ゼラチン法⁽⁶⁾、凝乳法⁽⁷⁾等が挙げられるが、これらの方法では検出し得ないような微量のパパイソ或いは他のプロテアーゼの作用機構の検討には、一層微量化した方法が必要である。著者は極めて微量のプロテアーゼを測定する基質として Gates ら^(8~10)の用いた写真フィルムについて検討した。その結果、彼らの原法とは別の見地に立って原法より一層微量、かつ広い範囲の濃度で、溶存するパパイソその他のプロテアーゼを定量する方法を考案確立し、ここに報告する次第である。以下主としてパパイソの場合について記す。

パパイソ微量定量法

1) 試料の調製 本報に提案する方法(以下本法と称する)は、濁度測定を伴う故、まずパパイソ含有試料を遠心処理により清澄化する必要がある。たとえば Spinco-L 型超速心機を用い、20,000 G にて 0°, 15 分間遠心して透明な試料を得る (Spinco-L 型のローター No.30 を用いる場合は 15,000 r. p. m. である)。

2) 試料中パパイソによる写真フィルム・ゼラチン膜の消化 上記の如く調製した試料 5 ml をビベットで比濁管にとる。これに 0.6 M シス테인塩酸塩水溶液 0.1 ml および 2.0 M 硫酸マグネシウム水溶液 0.1 ml および 2.0 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0, ただし種類及び pH は目的により適宜変更する) 1.0 ml を加える。ついで基質として黒化した写真フィルム片 (4.5×7.0 mm 角) 1 枚を入れ、ゴム栓を施し、直ちに 40° の恒温水槽中に浸す。15 分毎に比濁管を振盪後濁度を測定して、時間を横軸に、濁度を縦軸にとって「時間濁度曲線」を描く。

3) 試料中パパイソ力価の決定 試料と同一組成の液に標準とする結晶パパイソを種々の力価になる如く加え、上記方法によって時間濁度曲線群 (第 1 図) を基質フィルムについて前もって作成しておき、これと比較することにより、試料 1 ml 中のパパイソ力価を求める。

第 1 図 パパイソ微量定量標準曲線

方法の原理 Gates⁽⁸⁾ によって創始されたフィルム・ゼラチン膜を使う方法は、次の原理によっている。すなわち、露光現像定着して銀の析出したフィルムをペプシン溶液に浸した場合に、ゼラチンが溶解して膜が薄くなり、従ってゼラチン膜に含まれ銀粒子が減少してフィルムが光を透過し易くなるので、ペプシン作用前後におけるフィルムの光透過率の変化をデュボスク型等の比色計で測定し、変化の大小によって

ペプシン力価を測定するものである。Walton⁽¹⁰⁾ はこの方法を殆どそのまま医薬用パパイソの力価検定に用いた。

一方、本法では Gates らの方法と同じく感光黒化したフィルムを用いるが、パパイソ含有液に写真フィルムを浸漬し、ゼラチン膜が消化溶解して銀粒子が液中に分散することによって生ずる濁度を測定し、濁度増加の時間的経過からパパイソ等の力価の測定を行なう。従って本法はこれを Gates らの方法と比べると、(a) 部分的感光フィルムでなく完全黒化フィルムを用いるのでフィルム調製が容易、(b) 広範囲濃度の定量が可能、(c) 感

* Microassay of Papain and Other Proteases.

By Yū HORIE (Amagasaki Laboratory, the Research Laboratories of Kirin Brewery Co., Ltd.)

度鋭敏等の利点を有する。しかし、測定のための酵素作用時間は Gates 法では 10 分間であるのに、本法では 1 時間ないし数時間を要する。

実 験

I. 濁度測定法 フィルム・ゼラチン膜消化容器である試験管で直接比濁を行なうため、次の如き装置を用いた。日立 EPO-B 型光電比色計を用い、チンダル光を直角方向の光電池で受け、生ずる光電流を島津 RA 型検流計に通し、縦型ランプスケールの振幅によって濁度を測定した。試料が着色している場合は色による光の吸収を避けるため、試料によって吸収されない波長の光を与えるフィルターを装置する。常法⁽¹¹⁾により選んだ直径 18 mm の試験管に純水を入れた場合のランプスケールの読みを零とし、次に試料に置きかえ、スケールの振幅 (mm 単位) で濁度を表わした。

II. フィルム・ゼラチン膜消化作用が微量プロテアーゼによることの証明 清澄化したパパイン含有試料 (パパイン 1.0 [PU]/ml 含有) にフィルム切片を加えて 40° に保つと、時間とともに濁度が増加し、その濁度はゼラチン膜が消化しつくされると最高に達し一定になる。試料にシステイン塩酸塩を 0.0002 M~0.02 M 加えると濁度の進行は速くなる。一方、試料 50 ml に毎分約 1 ml の空気を 30 分間通すと濁りの進行はおそくなり、また過酸化水素 0.05% の添加によりゼラチン膜消化は殆んど停止し、0.1% で完全に停止する。また試料を水で薄めると消化は弱まる。第 2 図に示す以上の諸事実はパパイン含有試料によるフィルム・ゼラチン膜の消化がパパインに由来することを証明するものである。

III. 定量諸条件の検討 前項の実験からプロテアーゼ作用の強さと、フィルム・ゼラチン膜消化の速さに関係があることが明らかになったので、消化速度からプロテアーゼを定量するため、次の各種条件を検討した。

(A) 試料中のガス除去法： 醗酵生産物等を試料とする場合、試料中に炭酸ガスが含まれていると、一定量の試料の採取が不可能であり、またガス気泡は濁度測定を妨害する。よって炭酸ガスを除くために、A：ビーカーに入れた試料をデシケーター中におき、発泡がなくなるまで吸引してガスを除く、B：試料を 2 個のビーカーで 100 回うつしかえを行なってガスを除く、C：試料をろ紙で自然ろ過する際のガス離脱を利用する、の 3 法について比較したところ、第 3 図に示す如くパパイン含有試料では B と C の場合は、A に比べてゼラチン膜の消化がおそく、従って酵素の酸化失活が考えられるのでガス除去を要する場合には A の減圧法を採用した。

(B) 試料の清澄化： 濁度の増加を測定するためには、測定開始時に試料が透明でなければならない。(A) の結果から見て、ろ紙ろ過によることはできないから、定量法の項に記したように遠沈法を採用した。

(C) 試料の量： 口径 18 mm の試験管を用い前記 EPO-B 型で比濁するため、プロテアーゼ含有試料の量はこれを 5 ml とした。

(D) 基質フィルムの調製： 試料中のプロテアーゼの定性的検出には、フィルムの種類及び調製法を問わないが、定量の場合には基質フィルム・ゼラチン膜の硬度を規制せねばならない故、次の如くフィルムを調製した。35 mm ポジ・フィルム (一般撮影用フィルムに比べて銀含量が高い) 150 cm を室内自然光に 1 分間直接露光後、10 分間微粒子現像し (たとえば富士フィルム F D 122 処方を用いる)、ついでフィルム用酸性硬膜定着液 (たとえば富士 FFH 4) にて定着し (各 20°)、流水にて 1 時間水洗後乾

第 2 図 希薄パパイン溶液のゼラチン膜消化作用に影響をおよぼす因子
A: 対 照
B: システイン塩酸塩 0.01 M 添加
C: 通 気
D: 水で希釈
E: 過酸化水素 0.05% 添加

第 3 図 試料ガス除去法とゼラチン膜消化速度との関係
A: 減圧ガス抜き
B: 揺しかえによるガス抜き
C: ろ紙ろ過によるガス抜き

第 4 図 ゼラチン膜消化速度と温度との関係

第 5 図 比濁管気相ガス交換の影響
A, B, C: CO₂ 置換
a, b, c: CO₂ 置換せず

第 6 図 ゼラチン膜消化速度とシステイン塩酸塩濃度との関係

A: システイン塩酸塩 0.01 M
B: " 0.0075 M
C: " 0.005 M
D: " 0.02 M
E: " 0.001 M
F: " 0 M

燥する。定着時間は 30 分間または 60 分間とし、得たフィルムをそれぞれ No. 30 および No. 60 と称する。定着時間が長いと硬膜になる故、プロテアーゼ力価の比較的高い試料では No. 60 を、力価の低い試料には No. 30 を用いて測定所要時間を調節する。消化に際しては 7.0×4.5 mm 角のフィルム切片として用いた（この大きさは任意に決めればよい。濁度測定に際して管底に沈降し、比濁光を妨げない大きさであればよい）。

(E) 消化温度： パパインを 0.4 [PU]/ml 含む試料に、Gates⁽⁶⁾の方法に従って非硬膜処理フィルムを 25° で 10 分間浸漬した場合、ゼラチン膜は全然消化されない。消化させるため時間を延長し、かつ温度を上げると、35° では 1 時間でゼラチン膜が脱離する。従って硬膜処理をしないフィルムはその温度で数時間は膜が脱離しない 30° までしか用い得ない。一方夏期の室温を考えると 35~40° で測定せねばならないので Gates 法によるフィルムは使用し得ない。前記のフィルム No. 30 を用い、0.4 [PU]/ml 含有試料で時間濁度曲線を求めると第 4 図の如くである。すなわち、35° 以下の場合に比べて 40° では消化は速かである。45° ではさらに速かであるが、この温度でフィルム No. 30 及び 60 は純水中でそれぞれ 4 時間及び 8 時間でゼラチン膜が軟化脱離する。従って純水中で 30 時間、0.01 M システイン塩酸塩を含んだ定量条件で 10 時間、これらフィルムのゼラチン膜が軟化しない 40° を消化温度として採用した。第 4 図においては、たとえばパパインによるヘモグロビン消化の場合などに比し、温度変化による酵素作用速度の変化が大きいが、この現象は本法が固体のゼラチン膜を基質とする故、温度変化が酵素活性の変化と同時に基質の硬度をも変化させることに起因するものと考えられる。

(F) 賦活剤： パパイン 0.4 [PU]/ml 含有試料 5 ml を比濁用試験管にとり、第 5 図に示すごとくフィルム No. 30 各 1 片を入れ、3 列消化を行なうと、時間濁度曲線は再現性を示さない。しかし試験管気相を炭酸ガスで置換すると、良好な再現性を示す。また、前記の如くパパイン含有試料のゼラチン膜消化作用は通気により弱められる。これら両事実はパパインの酸化によるものと考えられるから、パパイン含有試料が採取並びに測定を通じて空気に触れることを極力避けねばならない。しかし、完全に嫌氣的に扱うことは不可能であるので、酸化の影響を防ぐために賦活剤を採用し、常法に従いシステイン塩酸塩を用いた（実験の結果青酸カリは用いられないことを知った⁽¹²⁾。詳細は別報に記す）。第 6 図に示すごとくシステイン塩酸塩の濃度が増すと酵素賦活の度が強まり消化が速になるが、0.02 M 以上になるとシステイン塩酸塩の影響でゼラチン膜が脱離するので 0.01 M とした。

システイン塩酸塩の添加により第 5 図に示す如き試験管内のガス交換は不要となる。

(G) 凝集作用防止剤： パパインの場合、酵素溶液を蛋白質含有液と混合すると、酵素・蛋白質間に凝集がおこり、被測定試料が濁濁するとともに溶存するパパイン力価が低下するので⁽¹²⁾、標準曲線作成時及び未知試料定量時ともに凝集作用防止剤を用いねばならない。パパインの凝集作用については別に報告した故⁽¹²⁾、本報では凝集作用防止剤として硫酸マグネシウム (0.03 M) を添加するべきことを記すにとどめる。

(H) フィルム片の乾湿および賦活剤の添加時期： 第 1, 5 図等に見られるように、フィルム片の消化は初期に緩慢で、かつ非直線的である。しかしフィルム片を前もって 40° の水に 2 時間浸漬して湿らせても、また、

第 1 表 本法及び各種プロテアーゼ
定量法の定量範囲および最小検出
限界量の比較 (ただし賦活剤使用時の試
料 1 ml 中のパパインの [PU] で示す)

方 法	定量適当範囲	検出限界
本 法	0.07~1.25	0.005
Gates 法 ⁽⁸⁾	25~40	20
ヘモグロ ビン法 ^(2,3)	20~200	4
凝 乳 法 ⁽⁷⁾	40	40

フィルム片添加の 2 時間前に試料にシステイン塩酸塩を加えても、時間濁度曲線の形状は変らない。従って測定開始時に乾いたフィルム片と賦活剤とを加えた。

(I) 標準曲線の作成：以上の如き条件により被験液と同組成であって、プロテアーゼを含まない液に力価既知の標準プロテアーゼを加えて、ゼラチン膜消化の時間濁度曲線群 (第 1 図) を作る。パパインの場合は Kimmel および Smith の方法⁽⁶⁾によって得た結晶パパインを 0.05 M のシステイン塩酸塩で賦活した上、ヘモグロビン法^(2,3)

によって蛋白分解力価を求めたのち、その溶液を標準として用いる。フィルム No. 30 は試料 1 ml 中 0.4~0.07 [PU], No. 60 は 1 ml 中 1.25~0.2 [PU] の測定に適するが、前記の如く、この範囲は基質調製の度毎にそのフィルムについて測定して決めるべきである。

IV. 本法及び各種定量法の比較 本法の定量範囲及びプロテアーゼ最小検出限界を各種の方法と比べると第 1 表の如くである。すなわち、本法は比較した方法中、検出限界が最小であり、また定量しうる濃度範囲が広い。

本法の精度は第 1 図に見られる如く酵素力価及びフィルム・ゼラチン膜硬度等により影響されるが、1.25~0.07 [PU]/ml の範囲で、図に示す如く識別定量が可能である。

考 察

本法は鋭敏でかつ測定可能範囲が広いことを特徴とし、それ故従来知られていない希薄溶液におけるパパイン挙動の解明等に有用であろう。なお、フィルム No. 60 および No. 30 以外に、使用目的に適した硬度のフィルム・ゼラチン膜の調製が望ましいことは当然であり、また温度等測定条件の変更により、本法の応用範囲を広くすることができる。著者はまた、ペプシン、麦芽プロテアーゼ等に対しても本法の適用が可能であることを確めた故、かかる酵素の研究への応用も期待されるところである。

本報の内容は昭和 35 年 4 月農芸化学会大会において報告したが、写真フィルム・ゼラチン膜の利用について最近二、三の報告がある。すなわち、岡田ら⁽¹³⁾はビール中のパパインの存在をフィルム・ゼラチン膜の脱離で検出し得ることを指摘した。一方 Glenister ら⁽¹⁴⁾は未現像の写真生フィルム切片をパパイン等のプロテアーゼで処理されたビールの中に浸漬すると、ゼラチン膜の消化に伴いフィルムベースのみになることにより、ビールに含有されるプロテアーゼの定性的検出を行なった。その後、彼らは定量法化を試みた結果を 1961 年 4 月開催の American Society of Brewing Chemists の会合で発表した如くであるが、方法の詳細に接し得ない故、著者の方法との比較検討は未だ行ない得ない現状にある。

本研究の発表を許可された麒麟麦酒株式会社川村社長、時国専務、熊沢常務、御指導賜った奥田譲先生並びに所長梅田博士および直接御教示、御鞭撻を賜った研究所尼崎分室長黒岩博士に深甚の謝意を表します。

- (1) N. C. Davis, E. L. Smith : D. Glick, ed. "Methods of Biochemical Analysis", Vol. II, Interscience Publishers, Inc., New York, 1955, p. 215.

- (2) M. L. Anson : *J. Gen. Physiol.*, 22, 79 (1938).

- (3) 萩原文二：赤堀四郎編“酵素研究法”，第 2 巻，朝倉書店，p. 237 (1956)。

- (4) Assoc. Offic. Agri. Chem., "Method of Analysis-A. O. A. C.", 8 th. Ed., 1955, p. 307.

- (5) J. R. Kimmel, E. L. Smith : *J. Biol. Chem.*, 207, 515 (1954).

- (6) J. H. Northrop : *J. Gen. Physiol.*, 15, 29 (1931).

- (7) E. T. Hinkel, Jr., C. E. Alford : *Ann.*

- N. Y. Acad. Science*, 54, 211 (1951).

- (8) F. L. Gates : *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 24, 936 (1926~1927).

- (9) A. Gilman, G. Cogwill : *J. Biol. Chem.*, 88, 743 (1930).

- (10) R. P. Walton : *J. Lab. Clin. Med.*, 17, 459 (1932).

- (11) 柳沢文正編：“光電比色計の実際”，共立出版，p. 15 (1954)。

- (12) 堀江 雄：本誌，35, 1237 (1961)。

- (13) K. Okada, M. Ashida : *Rept. Res. Lab. Kirin Brew. Co.*, No. 3, 1 (1960).

- (14) P. R. Glenister, M. Berger : *Am. Soc. Brewing Chemists, Proc.*, 1960, 117.