幽門垂蛋白分解酵素に関する研究—I*

鮪幽門垂蛋白分解酵素の結晶分離

斗ヶ澤 宜久・勝 又 悌 三

(1958 年 12 月 26 日受理)

STUDIES ON THE PROTEINASE OF PYLORIC CAECA—I.
PREPARATION OF CRYSTALLINE PROTEINASE OF
TUNNY PYLORIC CAECA

Yoshihisa TOGASAWA and Teizo KATSUMATA**

The purification of the proteinase of tunny pyloric caeca was carried out as follows; the distilled water extraction of ground material, salting-out with ammonium sulphate, dialysis, rivanol treatment for removal of amylase, fuller's earth treatment, and precipitation and crystallization with acetone (Fig. 3).

The crystals of proteinase were obtained in the form of needles (Fig. 4).

The crystalline proteinase was obtained with an yield of 1.5% in activity and a specific activity increased 20.6 times as compared with the original solution (Table 3).

蛋白分解酵素の結晶は NORTHROP 等¹⁾の研究以来、近時種々の微生物から分離され²⁻¹⁶⁾、また水棲動物では鯨、海豹などの胃から結晶 pepsin が分離されている¹⁷⁾。一方魚類酵素としては結晶として分離されたのは NORRIS 等^{18,19)}による鮭及び鮭胃の pepsin が報告されているに過ぎない。

著者等は鮪幽門垂から蛋白分解酵素を結晶として分離したのでその結果を報告する。

実験方法

1. 酵素液の調製法: 新鮮な鮪 *Thunnus orientalis* TEMMINCK et SCHLEGEL 磨碎幽門垂の 3 倍量水抽出液をガーゼ及び脱脂綿で濾過して得た不透明酵素液を原液 (A 液) として供試した。

2. 酵素力測定法: proteinase は前報²⁰⁾に従って行い、また amylase は WILLSTÄTTER, WALDSCHMIDT-LEITZ²¹⁾の方法に準じ 50 ml フラスコに 1% 可溶性澱粉 25 ml, M/5 phosphate buffer (pH 6.8) 10 ml, N/5 NaCl 1 ml, 酵素液 2 ml をとり、水を加えて全量を 40 ml とする。トルオールを少量加えて 37° ± 1°C の恒温槽中で反応させ、一定時間毎にその 5 ml をとり、1 N HCl 2 ml を加えて酵素作用を停止させ、一定量の N/10 沃度液を加え、0.4 N NaOH でアルカリ性として 15 分室温に放置後 0.5 N H₂SO₄ で酸性とし過剰の沃度を N/20 Na₂S₂O₃ で滴定、blank test も同時に行つて滴定値を補正した。

3. 酵素単位表示法: 酵素力測定法に従い、pH 7.6, 37° ± 1°C で 1 時間作用させた時の酵素反応液 0.2 ml に対して N/100 alcoholic KOH 0.05 ml を消費するような酵素量を 1 proteinase 単位とした。

4. 酵素純度表示法²⁰⁾: 蛋白態窒素 1 mg 当りの proteinase 単位で表した。

結果並びに考察

1. 塩析範囲の決定

A 液を硅藻土の薄層を作つた濾紙で吸引濾過する事により透明液 (B 液) を得、これを塩析範囲の決定に

* 昭和 33 年 10 月、日本農芸化学会東北支部大会講演

** 岩手大学農学部 (Fac. of Agr. Iwate Univ., Morioka, Iwate Pref. Japan).

Fig. 1. Salting-out of enzymes with ammonium sulphate.

- — ● Proteinase
- △ — △ Amylase
- ▲ — ▲ Protein-N

7.5, 8.0 に調整, 蒸留水で 10ml に希釈, 2時間室温に放置後遠心分離 (10000 r.p.m., 5分) し, 沈澱を同濃度の硫酸溶液で洗滌後 pH 8.0 の ammonium buffer 5ml に溶解, 遠心分離してその上澄液の酵素力を測定したが, 溶液の pH に基く塩析効果の相違は殆んど認められなかつた。

3. Rivanol による proteinase と amylase の分離

B 液に粉末硫酸を加えて 0.3 飽和とし生じた沈澱を除去後更に 0.7 飽和にして得られた沈澱を蒸留水に溶かし, 氷室中コロジオン膜に入れ外液 M/1000 KH_2PO_4 に 3 日間透析する。この透析液を硅藻土濾過して得た透明液 (C 液) を 5ml メスフラスコに各 4ml とり,

Fig. 2. Removal of amylase from the extract by the use of rivanol.

- — ● Proteinase
- △ — △ Amylase

使用した。即ち 10ml の目盛付試験管に B 液を各々 5ml とり, 所要量の粉末硫酸を加えて溶解させ 2% NH_4OH で pH を 6.0 に調整し, 蒸留水で 10ml に希釈, 室温に 2 時間放置後遠心分離 (10000 r.p.m., 5分) し, 各沈澱をそれぞれの飽和度の硫酸溶液で 1 回洗滌後 5ml の ammonium buffer (pH 8.0) に溶かし遠心分離 (10000 r.p.m., 5分) して不溶部を除き, 上澄液を酵素力の測定に供した。

結果は Fig. 1 の如くであり, 硫酸の飽和度は OSBORN 飽和度で示し, また蛋白態窒素は塩析物の母液について定量したが, proteinase, amylase 共に 0.29 飽和で殆んど塩析されず, また 0.66 飽和以上では塩析物の酵素力最大で且殆んど等しく, 結晶化の目的のためには 0.3 から 0.7 飽和までの間で塩析される区分を採用した。

2. 塩析に対する pH の影響

10ml の目盛付試験管に B 液各 5ml とり, 各々に粉末硫酸 3g 加え (0.464 飽和), N/50 HCl 及び 2% NH_4OH で pH をそれぞれ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0,

1% rivanol を最終濃度 0.02~0.16% になるごとく加え, 蒸留水で 5ml に希釈し良く攪拌する。遠心分離 (10000 r.p.m., 5分) してその上澄液について酵素力を測定した結果を示すと Fig. 2 のごとくであり, proteinase 並びに amylase の酵素力はそれぞれ N/100 alcoholic KOH 及び N/20 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の ml 数で表した。

結果 proteinase は rivanol の 0.08% 添加まで全く影響されず, 0.1% 以上に於て漸次酵素力を減少する。一方, amylase は 0.04% 添加から酵素力が減少し始め, 0.12% で amylase-rivanol 沈澱の形成が完全に行われる。以上のことから rivanol 0.12% で処理することにより完全に amylase を含まぬ proteinase 溶液が得られ, また rivanol 0.08% 以下で処理する事により逆に proteinase を含まぬ amylase-rivanol 沈澱が得られる。

4. Rivanol 除去に対する酸性白土の影響

rivanol の存在は酵素の結晶化を妨害するので予めこれを除く必要があり, 多くの場合この目的のため酸性溶液中で酸

性白土を使用しているが、既報²⁰⁾のごとく酸性白土はよく *proteinase* を吸着するので *rivanol* 除去の際の酸性白土の影響を試験した。

即ち 5ml メスフラスコに C 液 4ml とり、1% *rivanol* 0.6ml (0.12%) を加えて生じた沈澱を汙別し、汙液に Table 1 のごとく酸性白土を加え蒸留水で 5ml にし攪拌後 10 分間室温に放置し、遠心分離 (10000 r.p.m., 5 分) してその上澄液を *proteinase* の測定に供した。一方 *rivanol*-*amylase* 沈澱は 0.5M acetate buffer (pH 6.0) 5ml に溶かし、これに各量の酸性白土を加えて遠心分離し上澄液を *amylase* の測定に供した。

Table 1. Effect of fuller's earth on the removal of *rivanol*

Fuller's earth (%)		0.2	0.4	0.8	1.0	1.2	1.6	2.0	Control
Proteinase	Hrs. of hydrolysis								
	1	0.09	0.10	0.10	0.10	0.07	0.04	0.03	0.10
	3	0.22	0.22	0.20	0.18	0.17	0.10	0.09	0.22
	6	0.33	0.33	0.29	0.27	0.25	0.19	0.16	0.33
	20	0.50	0.51	0.46	0.45	0.45	0.43	0.40	0.51
Amylase	Hrs. of hydrolysis								
	1	0.10	0.09	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.11
	3	0.38	0.31	0.26	0.25	0.22	0.20	0.16	0.40
	6	0.70	0.62	0.52	0.48	0.43	0.41	0.29	0.72
	20	1.74	1.69	1.57	1.50	1.38	1.36	1.11	1.84

Table 1 は *proteinase* 並びに *amylase* の酵素力をそれぞれ N/100 alcoholic KOH 及び N/20 Na₂S₂O₃

の ml 数で表わしたものである。即ち酸性白土 1% 添加により上澄液が殆んど無色となり *rivanol* が除去され、しかも *proteinase* は殆んど吸着されず、添加酸性白土量がこれより増加するに従い *proteinase* の損失も増加する。一方 *amylase* の場合は添加酸性白土量の増加につれて漸次吸着され、酵素力も極めて徐々に減少する傾向が見受けられた。

結局 *amylase* を含まない *proteinase* 溶液は C 液に *rivanol* (最終 0.12%) を添加して生じた沈澱を汙別し、汙液に酸性白土 1% 添加する事により得られ、一方 *proteinase* を含まない *amylase* 溶液は C 液に *rivanol* (最終 0.08%) を添加して生じた沈澱を 0.5M acetate buffer に溶かし、酸性白土 1% 添加する事により得られる。

5. *Proteinase* の結晶分離

実験 1~4 までに得られた結果を応用し Fig. 3 に示す方法で *proteinase* の結晶化を行つ

Fig. 3. Crystallization procedure of tunny pyloric caeca *proteinase*

Fresh tunny pyloric caeca 590g.	
added with 1770ml. of distilled water and ground with Waring blender	
Filtrate (A) 2060ml.	Precipitate
filtered through a layer of celite on a Buchner funnel	
Filtrate (B) 1660ml.	Precipitate
added with ammonium sulphate to 0.3 satn. (pH 7.0~7.2), filtered, then added to 0.7 satn., held at 0°C for one day	
Precipitate	Filtrate
washed with 0.7 satd. ammonium sulphate soln., dissolved in 120ml. of distilled water, then filtered through celite	
Filtrate	Precipitate
dialyzed against M/1000 KH ₂ PO ₄ soln. (pH 7.0~7.2) at 2~3°C. for 3 days, then filtered through celite	
Filtrate (C) 200ml.	Precipitate
added with 30ml. of 1% <i>rivanol</i> soln. and 20ml. of distilled water, then centrifuged	
Supernatant	Precipitate
decolorized with fuller's earth, centrifuged	
Supernatant (D) 250ml.	Precipitate
added with acetone to 70% at -5°C., held at 0°C. for one day	
Precipitate	Supernatant
washed with 70% acetone, and dissolved in 5ml. of distilled water, added with acetone up to formation of turbidness and held at 0°C. for 10 days	
Crystal (E) 7mg.

Fig. 4. × 600

た。Fig. 4 は得られた鮪幽門垂蛋白分解結晶酵素である。

6. 精製過程における酵素力, 収量並びに比活性度

上記精製過程における proteinase 酵素力を N/100 alcoholic KOH の ml 数で示すと Table 2 の如くであり, その収量, 比活性度を示すと Table 3 の如くである。

Table 2. Activities of fractions of proteinase

Hrs. of hydrolysis	A	B	C	D	E
1	0.09	0.10	0.26	0.10	0.09
3	0.30	0.35	0.35	0.18	0.15
6	0.41	0.42	0.37	0.27	0.19
20	0.50	0.51	0.50	0.45	0.35

Table 3. Yields and specific activities of fractions of proteinase

	A	B	C	D	E
Volume (mL.)	2000	1660	200	250	30
Total protein N (mg.)	1382	495.48	122.8	20	1.0
Total proteinase unit	240000	221332	69332	33332	3600
yield (%)	100	92.2	28.9	13.9	1.5
Specific activity	174	447	565	1666	3600
Ratio of specific activity to A	1	2.6	3.2	9.6	20.6

なお表中の収量は酵素原液 (A 液) 中の酵素単位で各精製過程における酵素単位を除して求め百分率で表し, 比活性度は proteinase unit/protein-N (mg) で表したものである。

結晶 proteinase の収量は酵素原液に対して 1.5%, 比活性度は 20.6 倍であつた。

要 約

鮪幽門垂から proteinase を結晶状に得た。

即ち鮪幽門垂磨砕物の水抽出液を原液とし, 硅藻土沱過, 硫酸分別沈澱, 透析, リバノール処理による amylase 除去, 酸性白土処理, アセトン沈澱等を経て proteinase の針状結晶を得た。

該酵素の収量及び比活性度は酵素原液に対してそれぞれ 1.5%, 20.6 倍であつた。

文 献

- 1) J. H. NORTHROP et al.: *J. Gen. Physiol.*, **13**, 739 (1930). **16**, 295 (1932). **16**, 615 (1933). **19**, 991 (1936).
- 2) W. G. CREWETHER, F. G. LENNOX: *Nature*, **165**, 680 (1950).
- 3) S. D. ELLIOTT: *J. Exptl. Med.*, **92**, 201 (1950).
- 4) J. FUKUMOTO, H. NEGORO: *Proc. Japan Acad.*, **27**, 441 (1951).
- 5) A. V. GUNTELBERG, M. OTTESSEN: *Nature*, **170**, 802 (1952).
- 6) 三宅 捷・清水淳一: 兵庫農大報告 (農化篇), **1**, 11 (1953).
- 7) 三宅 捷・浜口陽一・高橋慶子: 生化学, **26**, 105 (1954).
- 8) 三宅 捷・吉村貞彦・柳下一愛: 兵庫農大報告 (農化篇), **1**, 47 (1954).
- 9) 三宅 捷・吉村貞彦・吉村康郷: 兵庫農大報告 (農化篇), **2**, 81 (1956).
- 10) 赤堀四郎・萩原文二・池田徳治・迫田直一: 酵素化学シンポジウム, **8**, 49 (1953).
- 11) F. YOSHIDA: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 252 (1956). 農化, **29**, 175 (1955).
- 12) K. MORIHARA: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**, 11 (1957).
- 13) T. MIZUNUMA, N. IGUCHI: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **22**, 35 (1957).
- 14) 中浜敏雄・今原広次: 農化, **32**, 115 (1958).
- 15) 福本寿一郎・山本武彦・市川和宏: 農化, **32**, 230 (1958).
- 16) B. HAGIHARA, H. MATSUBARA, M. NAKAI, K. OKUNUKI: *J. Biochem. (Japan)*, **45**, 185 (1958).
- 17) 斎藤恒行・石原義雄: 農化, **30**, 426 (1956).
- 18) E. R. NORRIS, D. W. ELAM: *J. Biol. Chem.*, **134**, 443 (1940).
- 19) E. R. NORRIS, J. C. MATHIES: *J. Biol. Chem.*, **204**, 673 (1953).
- 20) 斗ヶ沢宜久・勝又悌三: 本誌, **23**, 157, 163 (1957).
- 21) R. WILLSTÄTTER, E. WALDSCHMIDT-LEITZ, A. R. F. HESSE: *Z. physiol. Chem.*, **126**, 143 (1923).