柔魚内臓の生化学的研究—IV.

蛋白質分解酵素について (その2)

高 橋 喬

(1960 年 1 月 5 日受理)

BIOCHEMICAL STUDIES ON THE VISCERA OF CUTTLE-FISH,
OMMASTREPHES SLOANI PACIFICUS—IV.
ON THE PROTEOLYTIC ENZYMES OF VISCERA (PART—2)

Takashi TAKAHASHI*

The experiments described below deal with the proteolytic activity shown by liver extract of cuttle-fish. The results are summarized as follows:

1) As shown in Fig. 1, it was found that the optimal pH of enzymatic activity for digestion of casein or hemoglobin by liver extract and the value of activity which was shown at the same pH changed with the time of reaction.

2) The relationship between the degree of casein hydrolysis and the time of reaction was shown in Fig. 2. From the results it is evident that the activity is different between the initial stage (0~40 min.) and the subsequent one, the activity in the latter being 1.7 times stronger than that in the former.

3) From the results described in this paper and previous one¹⁾ it may be concluded that the desirable pH value is about 5 and temperature is 50°C for autolysis of cuttle-fish viscera (Fig. 3 and Table 1).

スルメイカ内臓各器官の proteolytic activity を検討した結果、器官の total activity では肝臓が他の器官よりはるかに高いことをさきに報告したが¹⁾、ここでは引き続き肝臓抽出液について proteolytic activity を検討するとともに、その結果並びに既報¹⁾の結果を内臓の自己消化による液化と関連づけて考察し若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

実験材料： 実験に供したスルメイカは 1958 年 12 月から 1959 年 5 月までの間に、三重県尾鷲市附近で漁獲された新鮮なものを用いた。

実験方法： 酵素液 (抽出液) の調製法、proteolytic activity の測定および表示法は前報¹⁾と同様である。基質としては casein のほかに hemoglobin (東京化成の市販品をそのまま用いた) をも使用した。hemoglobin 使用の際は pH 8.0~6.0 の間は 0.05 M 磷酸加里溶液を 6.0~3.0 の間は 0.05 M 醋酸緩衝液をそれぞれ緩衝液として用いた。基質溶液の調製は酵素研究法²⁾に記載されている方法にしたがつた。

結果および考察

1. 肝臓抽出液の proteolytic activity と pH との関係

肝臓抽出液の proteolytic activity と pH との関係を検討した結果は Fig. 1 のようである。Fig. 1 は casein に対して 30°C で 20 分、4 時間、20 時間各々作用させた時の、hemoglobin では 30°C で 20 分、

* 三重県立大学水産学部 (Fac. Fish. Pref. Univ., Mie).

Fig. 1. Proteolytic activity-pH curves for the enzymatic hydrolysis of casein and denatured hemoglobin by liver extract (at 30°C).
 ○ casein, for 20 minutes.
 ○ casein, for 4 hrs. ◐ casein, for 20 hrs.
 ● denatured hemoglobin, for 20 minutes.
 ○ denatured hemoglobin, for 20 hrs.

“Unit Activity”: Proteinase unit per ml of original extract which was obtained by extracting the ground organ with 5 times weight of 35% glycerol.

One proteinase unit was defined as activity which liberated per minute the hydrolyzated products of protein which give the same Folin color as γ of tyrosine.

では activity が減少するに反し、これ以上では時間の延長にしたがい高くなる。Fig. 1 に示した activity-pH 曲線からも知られるように、casein および hemoglobin を基質とした場合短時間の作用できわめて高い activity を示す pH 2.5 および pH 3.5 は activity の至適な pH 価であるが、安定な pH 価ではないように考えられる。(これらの pH で 20 時間作用させた時に示す activity は 20 分間作用時に示される activity の約 50~60% の値を示した。)ところがこれと逆に、casein を基質とした場合も hemoglobin を基質とした場合もそうであるが、pH 5.0~6.0 においては作用時間の延長に従って activity は増大するが 20 時間作用させた場合には 20 分間作用させ時の約 1.7 倍の activity を示した。以上述べたことと、すでに報告¹⁾したように肝臓抽出液の proteolytic activity の至適温度は casein 基質では pH 2.5 において 40°C、pH 6.0 においては 50°C を示すことを考え合わせると、casein 基質に対し proteolytic activity の至適 pH が 5.0~6.0 で至適温が 50°C である酵素と、至適 pH が 2.5 で至適温度は 40°C を示す酵素とは同一なものではなさそうに思われる。

2. activity と時間との関係

pH 5~6 附近において肝臓酵素液の proteolytic activity は作用時間の延長にしたがい、著しく増大す

20 時間作用させた時の各々の activity-pH 曲線を描いたものである。作用時間 20 分間の場合は原酵素を 7.5 倍に、4 時間では 75 倍に、また 20 時間の場合には 450 倍にそれぞれ希釈したものを酵素液として使用した。この結果から知られるように activity と pH との関係は作用時間により全く異つて来る。casein を基質とした場合には反応の初期 (20 分) では至適 pH は 2.5 にあつてここでは高い activity を示すが、pH 5~6.0 附近 (casein を基質とした時には pH 3.5~5.5 の間は測定不能であるからはずきりしたことは分らない) には activity-pH 曲線の山は見られない。しかし作用時間の延長にしたがい、pH 5~6.0 附近にも activity-pH 曲線の山が見られるようになる。また hemoglobin に対しては、反応の初期ではその至適 pH が 3.5 附近に見られるが、20 時間作用させた場合その至適 pH は 4.0~4.5 にあつて、casein の場合と異り至適 pH は一つとしか見られなかつた。さらにまた作用時間の長短により activity の至適 pH が異なるのみでなく、activity も変つて来ることが観察された。作用時間の相違によつて activity に差異を生ずることは考えられることであるが、スルメイカの肝臓においては pH 域によつてその変化の傾向は全く逆であり、このような現象は肝臓以外の器官では見られないことであつた。すなわち casein を基質とした場合には pH 3.5 以下と pH 6.5 以上の範囲では作用時間の延長にしたがい activity が減少し、pH 5.0~6.5 までの間は逆に activity が高くなる。hemoglobin では大体 pH 5.0 以下

る傾向にあることを観察したが、この点をさらに検討した。Fig. 2 は原酵素液を 32 倍に稀釈したものを酵素液とし、pH 6.0, 30°C で casein に作用させた時の optical density の増加と時間の経過との関係をあらわしたものである。これから知られるように、0~40 分までの間もまた 40 分~5 時間までの間も optical density の増加は時間と大体比例的な関係にあるが、これらの optical density の増加の傾向は異っている。各時間間隔の単位時間当り (1 分間) の unit activity を示すと 0~20

分の間では 31.6, 20~40 分では 31.6, 40~60 分では 46.6, 60~90 分で 50, 90 分以後 30~60 分間隔では何れも 50~51 を示し、反応開始後 1 時間以後ではその activity が反応初期に示す activity の約 1.7 倍になることが分つた。5 時間以後については実験を行わなかったが、前項における試験結果を考慮に入れると、5 時間以後少なくとも 20 時間までは単位時間当りの activity は 50~51 を示すものと考えられる。また前項における試験では反応時間が相違するのみでなく、酵素液の濃度も異っていたので、酵素液の濃度と optical density との関係をも調べたが、これらは全く比例的な関係にあつた。したがって前項において観察された現象は酵素液の濃度の差によつて生ずるものでなく時間的な関係において生ずるものと考えて差支えないと思う。反応開始後 40~60 分までの間に急激に activity が高くなり、それ以後においてはほとんど変化の見られない原因については今後さらに検討したい。

3. 内臓液化条件に関する考察

先に述べたように、スルメイカ内臓各器官の total activity においては、肝臓が他の器官よりはるかに高い¹⁾から内臓の自己消化による液化は肝臓の proteolytic activity が最も高い値を示すような条件で行うのが妥当であると考えられる。しかしながらスルメイカの盛漁期においては内臓は 30% 以上の油分を含有している³⁾ので、油の品質低下を最少限にとどめることにも考慮を払う必要がある。スルメイカ肝臓抽出液のトリブチリン分解に対する至適 pH は 7.5~7.8 で、至適温度は 30°C 附近にあり、かなり低温においてもその activity はさほど減少しないが、40°C 以上の高温においてはその activity は急激に減少する⁴⁾。したがって内臓の液化は高温においてできるだけ短時間に行うことが望ましい。これらの結果から hemoglobin を基質として 50°C で activity と pH との関係を検討した。反応は 1, 2, 3 時間行つたが、これらの結果を示すと Fig. 3 のように

Fig. 2. Time curve of enzymatic hydrolysis of casein by liver extract at pH 6.0, 30°C.

Fig. 3. Effect of pH and incubation time on proteolytic activity of liver extract. substrate: denatured hemoglobin. temperature: 50°C.

ある。これから知られるように3時間までは pH 5.0 附近において最も高い activity を示している。そして pH 4.5 以下では急激に activity が減少する。pH 5.0 における各時間毎の単位時間（1分間）当りの unit activity を示すと 0～1 時間では 622, 1～2 時間では 460, 2～3 時間では 280 となり、これ以上の時間の延長は内臓の液化にとつてあまり意味がないように考えられる。今まで

の試験結果は casein, hemoglobin について行つたものであるが、実際に肝臓を自己消化させた場合は Table 1 のとき結果となる。Table 1 は肝臓を2倍量の水とともに5分間ブレンダーで処理して得られた均一な懸濁液 1ml を緩衝液 5ml 中に入れ 50°C で

3時間自己消化させ（反応液中の蛋白濃度は大体 0.5% 位になる）後、これに 0.44 M トリクロール醋酸を 5ml 加え除蛋白した汙液について、生成された可溶性窒素化合物の量を Folin 試薬により呈色させて比色測定し、これをチロシン量としてあらわしたものである。この結果から pH 4.5～5.0 においてチロシンが最も多く生成されることがわかつた。したがつて自己消化による内臓の液化は pH 5.0 附近で温度 50°C で行うことが妥当であろうと考えられる。

Table 1. The effect of pH on the autolysis of liver.

pH	3.0	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
γ of produced tyrosine	490	825	1045	1045	880	680

Autolysis of liver was carried out at different pH values for 3 hrs. at 50°C. The extent of autolysis was observed by measuring the hydrolytic products of protein which was expressed as γ of tyrosine according to the colorimetric method with the phenol reagent of Folin.

要 約

スルメイカ肝臓抽出液について proteolytic action の諸条件を検討し、その結果に関連してスルメイカ内臓の自己消化による液化条件についても考察した。

1) casein, hemoglobin を基質として肝臓抽出液の proteolytic activity と pH との関係を調べたが、この関係は作用時間の相違により異つて来る。すなわち、作用時間の相違により至適 pH が異つて来るのみならず、作用時間の延長にしたがい activity の低下する pH 域と逆に高くなる pH 域とがあることが分つた。

2) casein を基質として、作用時間の延長にしたがい activity が高くなる状況を観察したが、反応開始後 40 分から 60 分までの 20 分間において急激に activity が高くなり、その後は変化しないことが観察された。

3) 内臓を自己消化により液化させる場合は pH 5.0 附近で温度を 50°C に保つことが妥当であると考えられる。

最後に本実験を行うに当たり、終始御懇切なる御指導を賜つた本学立野新光教授に深謝する次第である。

文 献

- 1) 高橋 喬: 本誌 **26**, 500 (1960).
- 2) 赤堀四郎編: 酵素研究法 2, 朝倉, 東京 (1956), pp. 239.
- 3) 高橋 喬: 本誌, **20**, 888 (1955).
- 4) 高橋 喬: 未発表.