マダコ後唾腺蛋白分解酵素の消化への
関与に関する研究—IV
消化管内液汁蛋白消化酵素の精製と性質^{*1}

森 下 達 雄

(1974年6月3日受理)

Participation in Digestion by the Proteolytic Enzymes
of the Posterior Salivary Gland in Octopus—IV.

Purification and Some Properties
of Proteolytic Enzymes from the Digestive Juice

Tatsuo MORISHITA^{*2}

Four proteolytic enzymes (Enzymes I to IV) were separated by Sephadex gel filtration and CM-Sephadex chromatography from the digestive juice. Enzymes III and IV, when further purified respectively by rechromatography and by preparative disc electrophoresis, were found to be electrophoretically homogeneous.

The three enzymes I, II and III, although differing somewhat in pH-stability and isoelectric point, were basic proteins with molecular weight of approximately 21,000 and had many similarities to carboxypeptidase A in enzymic properties. From these results it was clear that all these enzymes were cationic carboxypeptidase A. In addition, it was found that Enzyme III agreed closely in some properties with the posterior salivary gland carboxypeptidase A dealt with in the previous paper.

On the other hand, Enzyme IV, like chymotrypsin and the like, hydrolyzed benzoyl- and acetyl-L-tyrosine ethyl esters but, unlike them, did not act on amides such as glycyl-L-phenylalanine amide at all. The enzyme, however, had some similarities to chymotrypsin A in enzymic properties. Thus the enzyme appeared to be a closely related proteinase such as chymotrypsin A. In addition, it was found that the enzyme agreed closely in enzymic properties with Enzymes I, II and III of the posterior salivary gland, but differed from them in physicochemical properties such as isoelectric point and molecular weight.

マダコ, *Octopus vulgaris* CUVIER, 後唾腺に存在する蛋白分解酵素のうち消化管内で餌料蛋白の消化に関与する酵素を探索するため, 著者は前報¹⁾で, 後唾腺から分離, 製精した8種の蛋白分解酵素の性質を調べ, それらの種類について検討した。続いて本報では, 消化管内液汁中の蛋白消化酵素を分離, 精製してその性質を調べ, さきに報告した後唾腺酵素との比較検討を加えたので報告する。

実験方法

試料および粗酵素液 既報²⁾と同様に処置した1-1.5 kgのマダコから, 既報³⁾と同様にして調製した遠心分離上澄液を粗酵素液とした。なお, 試料マダコは1回の実験に3-5個体を用いた。

^{*1} 本報告の一部は昭和47年度日本水産学会秋季大会において講演した。

^{*2} 三重大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Mie University, Tsu, Japan)

酵素活性の測定および活性度の表示 前報記載の方法¹⁾に従った。

蛋白量の測定 既報²⁾と同じ方法によった。

等電点および分子量の測定 前報記載の方法¹⁾と同様にして測定した。

結果と考察

Sephadex G-75 ゲル濾過 後唾腺酵素の場合²⁾と同一条件で粗酵素液の Sephadex G-75 ゲル濾過を行い酵素を粗分画した。なお、粗酵素液は多少粘性をおびていたので1%食塩水で3倍希釈して用いた。結果は Fig. 1 に示すようで、酵素活性の測定条件とその活性度および蛋白量の表示などはすべて後唾腺の場合とまったく同様である(以後の精製過程においてもすべて同じ)が、後唾腺酵素²⁾とよく似た溶出パターンを示し、カゼインおよびカルボベンゾキシ-グリシル-L-フェニルアラニン (CGP) 水解酵素の大部分が分画 No. (No. と略す) 27-35 に溶出した。No. 23 付近にも小さな活性ピークを示しているが量的に重要でないと考え、主活性ピークの No. 27-35 を集めて主活性粗画分とし、つぎのクロマトグラフィーに付した。

Fig. 1. Gel filtration of digestive juice on Sephadex G-75.

Twenty milliliters of the sample containing 586 mg of protein, 8,020 units (at pH 7.5) of caseinolytic activity and 217 units (at pH 8.0) of CGP hydrolyzing activity were applied to a 2.5×90 cm column.

The other conditions were the same as described earlier.²⁾

Contents in tube No. 27-35 were collected for applying CM-Sephadex C-50 chromatography.

CM-Sephadex C-50 クロマトグラフィー 上記ゲル濾過によつて得た主活性粗画分を後唾腺酵素の場合²⁾と同様に処理したのち、それと同一条件(試料量はカラム当り添加蛋白量を100mg程度とするため、上記ゲル濾過カラム当り主活性画分の2/3量添加)でCM-Sephadex C-50による食塩濃度0.4Mまでの濃度勾配クロマトグラフィーを行つた。その結果、Fig. 2に示すように濃度勾配溶出区では、食塩濃度0.24M、0.27Mおよび0.32Mの各付近で溶出する三つのカルボキシペプチダーゼA(CPA)様酵素画分(溶出順にI, II, III)が得られたが、プロティナーゼは溶出しなかつた。そこで、濃度勾配溶出後なお吸着されているものすべてを溶出させるため、食塩濃度を1Mに上げてstepwise溶出した結果、プロティナーゼ画分(IV)が得られた。これらの酵素画分のうち、第III画分のCPA様酵素は後唾腺CPA²⁾と溶出位置が一致した。しかし、量的には第I, II画分の二つのCPA様酵素にくらべてかなり少ない。この第IIIと第Iの画分についてはさらに、食塩濃度勾配を0.1mmol/l(従来の半分)に下げてCM-Sephadex C-50再クロマトグラ

Fig. 2. Chromatography of Sephadex G-75 fraction on CM-Sephadex C-50.

Ten milliliters of the sample containing 96.2 mg of protein, 4,440 units (at pH 7.5) of caseinolytic activity and 133 units (at pH 8.0) of CGP hydrolyzing activity were loaded to a 2.5×30 cm column.

The other conditions were the same as described earlier²⁾ except that M/60 phosphate buffer (pH 7.0) containing 1.0 M NaCl was stepwisely run after the linear gradient elution of salt concentration from 0 to 0.4 M NaCl in the buffer solution.

フィーを行い、結果は割愛するが、それぞれほぼ単一なピークを得た。これらの画分をそれぞれ精製酵素 III および I とし、また第 II 画分はほぼ単一なピークを示したのでそのまま精製酵素 II とした。一方、第 IV 画分のプロティナーゼにないでは、つぎの調製用ディスク電気泳動に付してさらに精製した。

調製用ディスク電気泳動によるプロティナーゼの精製 東洋科学産業 K.K. 製調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動装置 CD-50 を用い、SHOSTER の方法⁴⁾ に準じて行つた。すなわち、REISFELD ら⁵⁾ の泳動条件による pH 4.3 用アクリルアミドゲル (7.5% 分離用ゲル溶液 60 ml, 2.5% 濃縮用ゲル溶液 40 ml) を調製し、 β -アラニン酢酸緩衝液 (pH 4.5) を電解液として、まずゲル重合促進剤や触媒を除去するため 50 mA で数時間通電した。ついで試料溶液 (緩衝液を濃縮用ゲル溶液に用いた KOH-酢酸緩衝液, pH 6.7, 4% しょう糖含有、に交換し、蛋白量 3 mg/ml 程度とした) の 10 ml 添加後、30 mA を通電して陰極側も (下方) へ泳動させ、緩衝液を 30 ml/hr で流して 10 ml ずつ分取した。なお、泳動は 4°C の低温室で行い、泳動塔を同温の循環水で冷却した。結果を Fig. 3 に示したが、単一なピークを示す主活性画分が得られ、これを精製酵素 IV とした。なお、このほかにも小さな活性ピークがみられるが、これらは量的にも少なく重要でないと考え、以後の検討は行わなかつた。

以上のようにして得られた各精製酵素液は限外戸過して濃縮し、緩衝液を除いて 1% 食塩水に交換し以後の実験に供した。

精製酵素の均質性 ディスク電気泳動によつて検討した。泳動条件は泳動時間を 2 時間としたこと以外は既報²⁾ と同じである。各精製酵素の泳動像は Fig. 4 に示すようで、酵素 III と

Fig. 3. Purification of the fraction IV in Fig. 2 by preparative disc electrophoresis.

Ten milliliters of the sample containing 29.5 mg of protein, 3,270 units (at pH 7.5) of caseinolytic activity and 4% sucrose were layered on the surface of the gel.

Fig. 4. Disc electrophoretic patterns of preparations of proteolytic enzyme purified from the digestive juice of octopus.

Disc electrophoresis was performed by 7.5% acrylamide gel at pH 4.3. A current of 3 mA per tube was applied for 2 hr. Protein bands in the gel were stained with a Amido Black 10B (1% in 7% acetic acid).

I: Rechromatographed preparation of the fraction I in Fig. 2.

II: Enzyme preparation of the fraction II in Fig. 2.

III: Rechromatographed preparation of the fraction III in Fig. 2.

IV: Enzyme preparation obtained from the fraction IV in Fig. 2 by preparative disc electrophoresis.

Table 1. Purification of proteolytic enzymes from digestive juice of octopus

Enzyme	Fraction	Activity (Units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity	Purifi- cation	Total activity	Yield (%)
I (pH 8.5)	Original digestive juice	31.0	88.0	0.352	1	206	100
	Eluate from Sephadex G-75	12.6	9.62	1.31	3.7	189	91.7
	Eluate from CM-Sephadex C-50	3.17	0.654	4.85	14	47.6	23.1
	Eluate from CM-Sephadex C-50 rechromatography	0.573	0.031	18.5	53	21.5	10.4
II (pH 8)	Original digestive juice	32.6	88.0	0.359	1	217	100
	Eluate from Sephadex G-75	13.3	9.62	1.38	3.8	199	91.7
	Eluate from CM-Sephadex C-50	2.14	0.099	21.6	60	80.3	37.0
III (pH 8)	Original digestive juice	32.6	88.0	0.359	1	217	100
	Eluate from Sephadex G-75	13.3	9.62	1.38	3.8	199	91.7
	Eluate from CM-Sephadex C-50	2.01	0.192	10.5	29	30.2	13.9
	Eluate from CM-Sephadex C-50 rechromatography	0.426	0.019	22.4	62	16.0	7.4
IV	Original digestive juice	1,180	88.0	13.4	1	7,860	100
	Eluate from Sephadex G-75	442	9.62	46.0	3.4	6,630	84.3
	Eluate from CM-Sephadex C-50	327	2.95	111	8.3	4,900	62.3
	Eluate from preparative disc electrophoresis	80.2	0.498	161	12.0	3,010	39.4

Specific activity: Enzyme units per protein mg.

Enzyme activities were shown as those at each optimal condition for CGP hydrolysis by Enzyme I to III, and for casein hydrolysis by Enzyme IV.

IV は明らかに一つのバンドを示し、それぞれ電気泳動的に均質なものであつた。酵素 I と II には少なくとも二つ以上のバンドが認められ均質でないが、酵素活性はどちらも厚いバンドに検出された。それゆゑ、混在する異種蛋白量はわずかであると考えられる。

精製酵素の比活性と精製比 精製酵素の各精製段階における比活性と精製比を Table 1 に示したが、酵素 I-III は CGP 基質に対する 10 分間反応における、また酵素 IV はカゼイン基質に対する 20 分間反応における、それぞれの至適作用条件下での活性に基づき表わしたものである。比活性は蛋白 mg 当りの酵素活性で表わしたが、酵素 I-III の CPA 様酵素のそれらは粗酵素液の約 50-60 倍に増大した。また、酵素 II と III とはほぼ等しい比活性を示し、その値は後唾腺 CPA のそれ²⁾ともほぼ一致している。一方、酵素 IV のプロティナーゼは 12 倍に精製され、その比活性は後唾腺酵素 I-III のプロティナーゼ²⁾と近似の値を示した。

精製酵素の性質 各精製酵素について、合成基質に対する作用、酵素反応の至適 pH、酵素作用におよぼす試薬の影響、酵素の pH 安定性、熱安定性、等電点および分子量などを前報の後唾腺酵素の場合と同様にして調べ、各酵素の結果を各項目ごと一括してそれぞれ順に Table 2, 3, 4, Fig. 5, 6, 7 および 8 に示した。これらの結果に基づいて各酵素の性質を検討するとともに、後唾腺酵素との比較検討をも行つた。以下酵素 I から順に述べる。

Table 2. Action of the purified enzymes on the synthetic substrates. Enzymes were assayed as described in the previous paper.¹⁾

Substrate (mm)	pH	Substance liberation (μ M/min/mg enzyme)			
		I	II	III	IV
Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester	(0.5) 8.0	0	0	0	2.18
Acetyl-L-tyrosine ethyl ester	(1.0) 8.0	0	0	0	6.47
Tosyl-L-arginine methyl ester	(1.0) 8.0	0	0	0	0
Benzoyl-L-arginine ethyl ester	(1.0) 8.0	0	0	0	0
Carbobenzoxy-L-glutamyl-L-tyrosine	(50) 5.0	0	0	0	0
Benzoyl-L-arginine amide	(50) 8.0	0	0	0	0
	5.0	0	0	0	0
Glycyl-L-phenylalanine amide	(50) 8.0	0	0	0	0
	5.0	0	0	0	0
Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine	(20) 8.0	18.5	21.6	22.4	0
Carbobenzoxy-glycyl-L-leucine	(20) 8.0	13.2	15.1	15.5	0
Benzoyl-glycyl-L-lysine	(0.1) 8.0	0	0	0	0
Glycyl-glycyl-glycine	(50) 8.0	0	0	0	0
Glycyl-glycine* ¹	(50) 8.0	0	0	0	0
Glycyl-L-leucine* ²	(50) 8.0	0	0	0	0
L-leucine amide* ²	(50) 8.0	0	0	0	0

*¹ Enzymes were preincubated with 0.005 M Co²⁺ at pH 8.0 for 1 hr at 37°C.

*² Enzymes were preincubated with 0.005 M Mn²⁺ at pH 8.0 for 1 hr at 37°C.

Table 3. Optimum pH for hydrolysis of various substrates by the purified enzymes. Enzyme assays were carried out by the same procedures as described in the previous paper.¹⁾

Enzyme	Optimum pH				
	Casein	BTEE	ATEE	CGP	CGL
I	8.5			8.5	8.5
II	8.0			8.0	8.0
III	8.0			8.0	8.0
IV	7.0	7.5	7.5		

Table 4. Effects of bivalent metal ions and chemical reagents on the activity of the purified enzymes.

After being preincubated with various reagents for 1 hr at 30°C, the enzymes were assayed at each optimal condition for CGP or casein hydrolysis. Conditions of the enzyme assay were as follows: on Enzyme I to III, at each optimal pH for 10 min at 30°C upon CGP and on Enzyme IV, at pH 7.0 for 20 min at 30°C upon casein.

Reagent (10 ⁻⁸ M)	Relative activity (%)			
	I	II	III	IV
no addition	100	100	100	100
Hg ²⁺	13	15	9	4
Cu ²⁺	0	0	0	6
Cd ²⁺	12	15	3	59
Zn ²⁺	47	51	33	69
Mn ²⁺	79	84	57	79
Co ²⁺	139	148	165	76
Ca ²⁺	96	92	98	144
Mg ²⁺	95	118	124	102
EDTA	0	0	0	93
<i>o</i> -Phenanthroline	0	0	0	90
NaCN	0	0	0	99
Cysteine	0	0	0	96
Thioglycolic acid	0	0	0	94
Iodoacetic acid	47	53	59	99
Iodoacetamide	48	58	63	102
PCMB				90
DFP (10 ⁻⁴ M)	94	97	98	21
TPCK (5 × 10 ⁻⁴ M)				50
TLCK (5 × 10 ⁻⁴ M)				95
STI* (5 × 10 ⁻⁴ M)				103
Na-Pyrophosphate	53	35	30	97

* soybean trypsin inhibitor.

Fig. 5. pH stability of the purified enzymes. Enzyme solutions were incubated at various pH (M/7 veronal buffer) for 24 hr at 30°C. Enzymic reactions were carried out at optimal pH for 1 hr at 30°C on casein.

Fig. 6. Thermal stability of the purified enzymes. Enzyme solutions were incubated at various temperatures for 30 min at the most stable pH. Enzymic reactions were carried out at the same conditions as those in Fig. 5.

Fig. 7. Determination of isoelectric point of the purified enzymes by gel electrofocusing.

The figure at right shows the schematic representation of the electrofocusing; that at left, plots of focused positions of the enzyme proteins against the course of pH gradient. The experiment was performed according to the procedure described in the previous paper.¹⁾

Fig. 8. Determination of molecular weight of the purified enzymes by thin-layer gel filtration on Sephadex G-75 Superfine.

The figure at right shows the schematic representation of the gel filtration; that at left, the relationship between molecular weight and moved distance (the moved distance for myoglobin was 70 mm).

The experiment was performed according to the procedure described in the previous paper.¹⁾

1. 酵素 I 本酵素は Table 2 に示したように用いた合成基質のうち, CPA の典型的基質である CGP と, カルボベンゾキシングリシル-L-ロイシン (CGL) とをよく水解し, この両合成基質とカゼイン水解の至適 pH をいずれも 8.5 付近に示した (Table 3). また Table 4 に示したように本酵素の CGP 水解は, DFP にはほとんど影響されないが, EDTA, *o*-フェナントロリン, NaCN など金属キレート剤やシステイン, チオグリコール酸など SH 化合物で完全に抑制され, Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} などで強く抑制された。ヨード酢酸, ヨードアセトアミドなどアルキル化剤, ピロリン酸塩, Zn^{2+} , Mn^{2+} なども抑制効果を示すが, Co^{2+} による促進効果が認められた。これらの酵素的性質が牛膵臓 CPA のそれら⁶⁾とほぼ一致していることから, 本酵素が CPA であることがわかった。しかし, 本酵素は, 後唾腺 CPA¹⁾と同様に牛膵臓 CPA とは, 蛋白質としての性質 (均質ではなかったが, 概略の検討を行った。つぎに述べる酵素 II についても同様である) が異

なり、等電点 9.3 付近 (Fig. 7) のカチオニックな CPA で、分子量約 21,000 と推定された (Fig. 8)。また本酵素は pH 5.5-8 で最も安定で、pH 4 以下ではきわめて不安定である (Fig. 5)。熱に対しては、最安定 pH 7.0、30 分間の加温で 45°C までは安定であるが、50°C では約 85% が失活し、酵素蛋白の熱変性が著しい (Fig. 6)。

2. 酵素 II 本酵素も上記酵素 I と同様に CGP と CGL とを特異的に水解するほか (Table 2)、各種試薬の影響 (Table 4)、pH および熱安定性 (Fig. 5, 6)、さらに推定される分子量 (Fig. 8) なども酵素 I とほぼ同様の結果を示した。しかし、本酵素は上記両合成基質とカゼイン水解の至適 pH をいずれも酵素 I よりわずかに酸性の pH 8.0 付近に示し (Table 3)、CGP 水解に Mg^{2+} が弱い促進効果を示した。また等電点が 9.5 付近で酵素 I よりやや塩基性の蛋白であつた (Fig. 7)。これらの点で、本酵素は酵素 I とは性質を幾分異にしたカチオニックな CPA で、その酵素的性質は後唾腺 CPA¹⁾ とよく一致した。

3. 酵素 III 本酵素も上記両酵素と同様 CGP と CGL とを特異的に水解するほか (Table 2)、至適 pH と各種試薬の影響 (Table 3, 4) は酵素 II とまったく同様の結果を示し、本酵素もこれらの酵素的性質が後唾腺 CPA とよく一致した。一方、蛋白質としての性質についてみると、pH および熱安定性 (Fig. 5, 6) は酵素 I や II のそれらと傾向はよく似ている。しかし、両酵素にくらべて pH 安定域が酸性側でやや狭くて pH 5 以下ではきわめて不安定で、pH 6.5-8 で最も安定である。また熱に対しては逆に両酵素より安定性がやや高く、最安定 pH 7.0、30 分間の加温で、45°C までまったく安定に保たれ、50°C でも約 15% しか失活しない。等電点は酵素 II よりさらに塩基性の 9.7 付近にあるが (Fig. 7)、分子量は Fig. 8 の結果から上記両酵素と同じ約 21,000 と推定された。本酵素はこれら蛋白質としての性質においても後唾腺 CPA のそれら¹⁾ とよく一致したカチオニックな CPA であつた。これらの結果に前述の CGP 水解の比活性やイオン交換クロマトグラフィー溶出位置の一致などを考え合わせると、本酵素は後唾腺 CPA と同種のもので、後唾腺に由来したものと思われる。

4. 酵素 IV 本酵素は上記 3 酵素とは異なり、キモトリプシンの典型的基質であるベンゾイル-L-チロシン・エチル・エステル (BTEE)、アセチル-L-チロシン・エチル・エステル (ATEE) を特異的に水解した (Table 2)。しかし、キモトリプシンの典型的アミド基質であるグリシル-L-フェニルアラニン・アミド (GPA) やその他の用いた合成基質には作用しなかつた。至適 pH は BTEE と ATEE の両合成基質水解では pH 7.5 付近に、カゼイン水解では pH 7.0 付近にそれぞれ示した (Table 3)。本酵素のカゼイン水解は、 Ca^{2+} の添加で促進されるが、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、DFP などで著しく抑制され、また TPCK、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} などにも抑制された。しかし、TLCK やダイズトリプシンインヒビター (STI と略す) ほか SH 化合物、SH 試薬、金属キレート剤、その他の用いた試薬による著しい促進、抑制の効果は認められなかつた (Table 4)。これらの結果は前報¹⁾ でキモトリプシン A 類縁のプロティナーゼと考えた後唾腺酵素 I-III が示した結果とほとんど一致している。本酵素は pH 4-7 付近にかけて最も安定で、pH 8 以上の塩基性域ではきわめて不安定であつた (Fig. 5)。熱に対しては、最安定 pH 5.0、30 分間加温で、45°C 以下ではほぼ安定で、60°C でも約 20% しか失活しなかつた (Fig. 6)。このような pH および熱安定性の傾向は後唾腺酵素 I¹⁾ とよく似ているが、本酵素の方がより高い安定性を示した。本酵素は等電点が 10 付近で (Fig. 7)、どの後唾腺プロティナーゼよりも塩基性の強い蛋白であつた。Fig. 8 の結果から推定される分子量は約 16,000 であつた。

以上本酵素は蛋白質としてはどの後唾腺酵素とも異なつた性質を示したが、その酵素的性質が後唾腺酵素 I-III とほぼ一致したことから、本酵素もこれらの後唾腺酵素と同様にキモトリプシン A 類縁のプロティナーゼであると考えられる。

ところで、さきに手術によつて後唾腺からの唾液の流出を止めたマダコを用いて、消化管内液汁中のプロティナーゼと CPA 様酵素の大部分が後唾腺に由来していることを確かめた³⁾が、後唾腺から分離、精製した 8 種の蛋白分解酵素 (後唾腺酵素 I-VII: プロティナーゼ、後唾腺酵素 VIII: CPA) のうち、消化に関与しているものと判断し得たのは CPA だけで、プロティナーゼについては判然としなかつた¹⁾。そこで今回の実験によつて、消化管内液汁から後唾腺プロティナーゼや CPA と性質の一致する酵素が得られ、消化に関

与する後唾腺酵素が判明するものと思われた。しかしながら、前述のように消化管内液汁酵素のうち後唾腺酵素と性質が一致したのは後唾腺 CPA に対する酵素 III の CPA だけで、しかもこの CPA は他の二つの CPA (酵素 I と II) にくらべて量的に少なく、消化管内液汁中の全 CPA の大半を占めるにははるかにおよばないものであつた。一方、プロティナーゼは性質検討の前すでに、イオン交換クロマトグラフィーにおける挙動が後唾腺のすべてのプロティナーゼとかなり異なっていたことから、後唾腺プロティナーゼとの蛋白質としての性質の相違が察知されたが、等電点のほか分子量や安定性などほとんど一致しなかつた。このように本実験結果がさきに予想したのとは異なつたのは意外であつた。動物の生体内では器官中に存在する活性蛋白が消化管内に分泌されるとその活性機能は変化しないで、その構造に部分的変化を受けて若干異なつたものになることも報告されている⁷⁾。それゆゑ、動物実験による *in vivo* での結果に *in vitro* での結果が合致しないのかも知れない。そこで、消化管内液汁のプロティナーゼと酵素 II の CPA は後唾腺の酵素 I-III のプロティナーゼと CPA にそれぞれ対応して、酵素の合成基質に対する作用、酵素反応の至適 pH、カゼインあるいは CGP 水解の比活性や各種試薬の影響など酵素的性質がほとんど一致していること。また消化管内液汁の上述の両酵素がそれぞれ対応させた後唾腺酵素にくらべて、消化管内液汁の pH (5.5-6 付近) での安定性が高いこと。これらのことから強いてつぎのように推論される。後唾腺から後唾腺酵素 I-III のプロティナーゼのうちの 1 種あるいは複数のものと後唾腺 CPA とが分泌されて消化管内に入る。しかし、これらの酵素は消化管内の pH では不安定であるので、それらが分泌される過程あるいは消化管に入ってから、活性中心やその近傍以外の酵素活性に影響しないところで部分的な構造の変化を受けて安定化される。従つて、等電点あるいは分子量などを異にした消化管内液汁のプロティナーゼや酵素 II の CPA となつてゐるのではないかと想像される。この辺のことについては、さきの動物実験による事実を証明するためにもさらに検討を加えたい。

要 約

マダコ消化管内液汁中の蛋白分解酵素を分離、精製して、精製酵素の性質を調べ、さきに報告した後唾腺酵素との比較検討を加えた。

1. 消化管内液汁から Sephadex G-75 ゲル汙過、CM-Sephadex C-50 クロマトグラフィーなどによつて 4 酵素画分 (溶出順に I-IV) を得、画分 I と III を CM-Sephadex C-50 再クロマトグラフィーに、画分 IV を調製用ディスク電気泳動にそれぞれ付してさらに精製し、計 4 種の精製酵素 (酵素 I-IV) を得た。これらの酵素のうち、酵素 III と IV はそれぞれ電気泳動的に均質であつた。

2. 酵素 I-III は CGP と CGL とを水解して至適 pH を酵素 I では pH 8.5 付近に、酵素 II と III では pH 8.0 付近に示した。これらの酵素の CGP 水解は、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} で促進され、金属キレート剤、SH 化合物、アルキル化剤や Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} などの金属イオンによつて抑制されるが、DFP には影響されなかつた。酵素の安定性は酵素 I、II と酵素 III との間に多少の相違がみられたが、概して、pH 5 以下では著しく不安定であり、pH 6-7 で最も安定で、最安定 pH で 30 分間加温の場合 45°C 以下で安定であつた。等電点は酵素 I から順にそれぞれ 9.3, 9.5, 9.7 付近、分子量はいずれも約 21,000 と推定された。

3. 酵素 IV は BTEE, ATEE を水解して至適 pH を 7.5 付近に示したが、GPA には作用しなかつた。本酵素のカゼイン水解は、 Ca^{2+} の添加で促進され、DFP, TPCK, 重金属イオンで抑制されるが、SH 化合物、SH 試薬、金属キレート剤や STI などには影響されなかつた。本酵素は pH 5-6 で最も安定で、pH 5.0, 30 分間の加温で 45°C まで安定であつた。等電点は 10 付近、分子量は約 16,000 と推定された。

4. 2, 3 の結果から、酵素 I-III はすべてカチオニックな CPA で、酵素 III は後唾腺 CPA と性質のよく一致したものであることが判明した。一方、酵素 IV は後唾腺酵素 I-III とほぼ一致した酵素的性質をもつキモトリプシン A 類縁酵素と考えられるが、それらの後唾腺酵素とは蛋白質的に幾分異なつたものであることがわかつた。

おわりに、本研究に対し御指導いただいた本学部高橋喬教授ならびに九州大学農学部北御門学助教授に謹

んで謝意を表する。また志摩マリンランド館長椎野季雄博士には水槽施設の使用に御便宜をいただき、さらに同館研究室長梶川浩彦氏はじめ大久保修三、川辺良一両研究員の方々には試料マダコの入手と飼育に多大の御尽力をいただき、ここに深謝する。

文 献

- 1) 森下達雄: 本誌 **40**, 917-925 (1974)
- 2) 森下達雄: 同誌 **40**, 601-607 (1974).
- 3) 森下達雄・上野隆二・高橋 喬: 同誌 **40**, 595-600 (1974).
- 4) L. SHOSTER: in "Methods in Enzymology" (ed. by W. B. JAKOBY) Vol. 22, Academic Press, New York, 1971, p. 412.
- 5) R. A. REISFELD, U. J. LEWIS, and D. E. WILLIAMS: *Nature*, **195**, 281-283 (1962).
- 6) P. H. PÉTRA: in "Methods in Enzymology" (ed. by G. E. PERLMANN and L. LORAND) Vol. 19, Academic Press, New York, 1970, p. 486.
- 7) 河合清三: 酵素化学シンポジウム, 第**15**集, 238-443 (1961).