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—VI

後唾腺蛋白消化酵素と消化管内液汁蛋白消化酵素との同一性の検討

森下達雄・上野隆二・高橋 喬

(1978 年 8 月 9 日受理)

Participation in Digestion by the Proteolytic Enzymes
of the Posterior Salivary Gland in Octopus—VI
Investigation on the Correspondence to Digestive Juice Enzymes
of Protein Digestive Enzymes from the Posterior Salivary Gland

Tatsuo MORISHITA*, Ryuji UENO*, and Takashi TAKAHASHI*

In the previous paper, it was estimated that the following three of the nine proteolytic enzymes (Enzymes I to IX) separated from the posterior salivary glands are protein digestive enzymes which play a significant role in dietary protein digestion. They are chymotrypsin A (Ch A)-like enzyme (Enzyme I), carboxypeptidase A (CPA)-like enzyme (Enzyme IX), and the CPA (Enzyme VIII); an enzyme identical to VIII has already been found to exist in the digestive juice.

In the present paper, some investigations were undertaken in order to confirm whether or not Enzymes I and IX of the above three enzymes would be identical with their respective correlated enzymes of the digestive juice.

The following results were obtained. Enzyme I was somewhat different in protein properties from the Ch A-like enzyme of the digestive juice but, when placed in the digestive juice, it was converted into the proteinase which was identical with the Ch A-like enzyme, as a result of an alteration of protein caused by the digestive juice. Therefore, it has become clear that the enzyme is a proteinase which has a digestive role in the digestive tract. On the other hand, Enzyme IX was identified as one of the three CPA of the digestive juice by the agreement of the properties between these two enzymes. Accordingly, Enzyme IX was also found to be a CPA which has a digestive role in the digestive tract. In addition, it seemed that which the CPA, while existing in the glands, is identical with Enzyme VIII.

前報¹⁾で、マダコ *Octopus vulgaris* CUVIER の後唾腺蛋白分解酵素 (I ~ IX) のうち、すでに餌料蛋白質の消化に関与する消化酵素と判明しているカルボキシペプチダーゼ A (CPA VIII) のほかに、キモトリプシン A 様酵素 (ChA 様酵素 I) と CPA 様酵素 (CPA 様酵素 IX) とが CPA VIII 同様消化酵素であろうと推定された。ChA 様酵素 I は後唾腺に存在する 6 つの ChA 様酵素中存在量が最大のもので、これに対応していると考えられる消化管内液汁酵素とは、酵素化学的性質ではよく一致するが、蛋白質としては幾分異なつた性質のものである。一方、CPA 様酵素 IX は、前報で摂餌後間もないマダコから得たもので、詳細な性質が未検討である。それゆえ、両酵素が消化管内液汁中にも存在して、消化管内での餌料蛋白質の消化に関与するものか否かは判然としていない。本報では、上記両後唾腺酵素と消化管内液汁

中の対応酵素と考えられるものが、同一あるいは同一起源のものか否かを検討した。以下その詳細を報告する。

実験方法

試料 前報同様処理した 1~1.5 kg のマダコを、摂餌後 30 分および 24 時間を経てそれぞれ取り揚げた摂餌マダコと絶食マダコとを各 6 個体供試した。

後唾腺抽出液と消化管内液汁の調製 後唾腺抽出液は既報²⁾ 同様調製した 1% 食塩水抽出液とし、摂餌、絶食の両マダコから調製した。一方、絶食マダコの食道から腔門までの全消化管内液汁を集め、1 万回転で 10 分間遠心分離して得た上澄液を消化管内液汁とした。

酵素の分離、精製 既報記載の方法^{2,3)} に従つて実施した。

* 三重大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Mie University, Tsu, Mie, Japan).

酵素活性の測定と表示 既報記載の方法⁴⁾に従った。

蛋白質量の測定 LOWRY 法の銅-FOLIN 法⁵⁾の変法⁶⁾に従って測定した。

等電点および分子量の測定 既報記載の方法⁷⁾に従って測定した。

結果と考察

後唾腺 ChA 様酵素 I のイオン交換的性質の変化 前報で、ChA 様酵素 I は後唾腺からの分泌過程あるいは消化管内で、蛋白質が変化して消化管内液汁中の対応酵素と考えられる ChA 様酵素 (ChA 様酵素 4) となるのであろうと推察された。しかし、そのように変化したと思われる酵素は摂餌、絶食マダコと別なく、これまで後唾腺抽出液からは一度も得られていない。そこで、その変化が消化管内で起ると考えて、ChA 様酵素 I を消化管内液汁中に置いてから分離したところ、予期したように、イオン交換クロマトグラフィーによつて ChA 様酵素 I は ChA 様酵素 4 とともに溶出して、そのイオン交換的性質が変化することが判明した。それゆえ、これと同様の変化が他の後唾腺酵素で起らないとは限らないのでそのことも合わせて検討するため、つぎのような実験を行った。まず、絶食マダコの後唾腺抽出液を Sephadex G-75 ゲル濾過に付して、従来同様 8 つの酵素 (I ~ VIII) を含む主酵素活性画分を得た。ついで、この画分の 3/4 量は下記対照実験用として別にし、残りの 1/4 量を濃縮して溶媒を 1% 食塩水に交換し、10 倍量の消化管内液汁を加えて 4°C に数時間置いた。その後、この混合液を Sephadex G-75 ゲル濾過に付して酵素を粗分画した (ゲル濾過条件、分画範囲とも上記後唾腺抽出液の場合と同じ)。こうして得た後唾腺酵素と消化管内液汁との混合液のゲル濾過画分 (C) の CM-Sephadex C-50 クロマトグラフィーを実施して酵素を分離した。なお、対照として、初めに残した 3/4 量の後唾腺酵素画分 (A) と、上記混合液酵素画分 (C) の調製において後唾腺酵素画分の代わりに 1% 食塩水を用い、あとは同様にして得た画分、消化管内液汁酵素画分 (B) とを CM-Sephadex C-50 カラムに付した。その結果、Fig. 1 の A, B, C 3 つのクロマトグラムを得たが、量的には A 図後唾腺の 1/3 量と B 図消化管内液汁の全量とを合わせたものが C 図の混合液という関係にある。A 図の画分 I が後唾腺 ChA 様酵素 I で、これは食塩濃度 0.05 M 付近で溶出するが、C 図の混合液ではその付近での酵素活性ピークが認められない。一方、消化管内液汁 ChA 様酵素 4 は B 図では 1 M 食塩で溶出する画分 IV であるが、混合液 (C) ではその画分の活性ピークが著しく増大している。これらの結果は、上記両酵素の本来の溶出位置での蛋白質量を A あるいは B 図と C 図とで

Fig. 1. CM-Sephadex C-50 chromatograms of the main active fractions* from Sephadex G-75 gel filtration.

* Enzyme pool obtained by the same procedures as in the previous paper¹⁾.

A: Posterior salivary gland, B: Digestive juice, C: A mixture of the digestive juice and the main active fraction from Sephadex G-75 gel filtration of the posterior salivary gland. Applied sample was equivalent to the amounts of all of B plus one-third of A.

Each chromatogram was obtained by the same procedures as described in the previous paper¹⁾.

比較して分かるように、ChA 様酵素 I の失活あるいは ChA 様酵素 4 の活性増大などによるのではない。混合による ChA 様酵素 4 溶出位置での酵素活性の増加分が、ChA 様酵素 I が本来の溶出位置で現わさなかつた活性にほぼ相当していることから、ChA 様酵素 I が ChA 様酵素 4 画分中に溶出したことは明らかである。

しかし、その他の後唾腺酵素は混合液 (C) でも加えたほぼ全量が本来の位置で溶出し、ChA 様酵素 I のようにイオン交換的性質が変化することはなかった。

イオン交換的性質の変化した後唾腺 ChA 様酵素 I と消化管内液汁 ChA 様酵素 4 との同一性 Fig. 1 における B 図の消化管内液汁 ChA 様酵素 4 画分と C 図の後唾腺 ChA 様酵素 I が変化した酵素を含む画分とを、同一条件で定量的に調製用ディスク電気泳動に付して酵素を精製するとともに、両酵素の電気泳動的同質性を検討した。Fig. 2 はその結果で、両者は一致した泳動位置で主酵素画分が単一なピークとなつて溶出し、ピークは下図の ChA 様酵素 I が変化した酵素を含むものの方が大きい。それゆえ、ChA 様酵素 I が変化した酵素は ChA 様酵素 4 と電気泳動的に同質の蛋白質となつていと判定される。こうして得た ChA 様酵素 I が変化した酵素画分を用いて諸性質を調べた。性質は Table 1 に一括表示した通りで、さきに明らかにした ChA 様酵素 4 の性質³⁾ とよく一致した。したがつて、ChA 様酵素 I が変化した酵素は ChA 様酵素 4 と同一酵素と判定される。以上の結果から、後唾腺 ChA 様酵素 I は消化管内液汁 ChA 様酵素 4 と同一起源のものであつて、消化管内での餌料蛋白質の消化に関する蛋白消化酵素であることが明白となつた。

なお、後唾腺 ChA 様酵素 I の消化管内液汁中におけ

Fig. 2. Preparative disc electrophoretic patterns of each 1.0M NaCl fraction in B and C of Fig. 1.

Upper pattern was obtained from the fraction in B, and lower pattern from that in C. Procedures of electrophoresis were the same as described in the earlier paper³⁾.

Table 1. Some properties of preparation of main active fraction in the lower graph of Fig. 2

Purity	Electrophoretically homogeneous
Molecular weight	16,000
Isoelectric point	10
Specific activity ^{*1}	160
Substrate specificity	BTEE, ATEE
Optimum pH on casein	7.0
on BTEE	7.5
on ATEE	7.5
Optimum temperature	
on casein ^{*2}	35°C
Km value for BTEE ^{*3}	3.57×10^{-3} M
for ATEE ^{*3}	8.33×10^{-4} M
pH stability	Most stable at pH 4-7
Thermal stability ^{*4}	Stable up to near 45°C
Effect of chemicals ^{*5}	
Inhibition	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ DFP, TPCK
Acceleration	Ca ²⁺
None	Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Mg ²⁺ , EDTA o-Phen, NaCN, Cys, TGA, IAA, IAM, PCMB TLCK, STI

^{*1} Enzyme units of caseinolytic activity per mg of protein.

^{*2} at optimum pH for 20 minutes.

^{*3} at pH 7.5, 25°C.

^{*4} when heated for 30 min at stable pH (5.0).

^{*5} Final concentration 10^{-3} M, or g-ion/l. Preincubation at 30°C for 1 h and Casein substrate.

o-Phen: o-Phenanthroline, Cys: Cysteine, TGA: Thioglycollic acid, IAA: Iodoacetic acid, IAM: Iodoacetamide, STI: Soybean trypsin inhibitor.

Table 2. pH in the digestive system of octopus. pH was determined by pH-test paper (Toyo Roshi Ltd.). A piece of the test paper was contacted directly with the mucous membrane or a section of the tissue.

Organ	pH ^{*1}	Organ	pH ^{*2}
Liver	5.4-5.6	Pharynx	6.8-7.0
Pancreas	5.4-5.6	Oesophagus	6.6-6.8
Anterior	6.0-6.2	Crop	5.6-5.8
saliv. gl. ^{*3}		Stomach	5.6-5.8
Posterior	6.0-6.2	Caecum	5.4-5.6
saliv. gl. ^{*3}		Intestine	5.4-5.6
pH of the digestive juice		5.5-5.8	

^{*1} in a section of the tissue.

^{*2} in the mucous membrane.

^{*3} salivary gland.

る変化の機序は不明であるが、この変化の生理的意義について考察を加えてみた。消化管の各器官粘膜表面や管内液汁の pH は Table 2 に示したように 5.4-6.8 の

Fig. 3. Comparison of stability of Enzyme I from posterior salivary gland with that of Enzyme 4 from digestive juice.

○—○: Enzyme I from the posterior salivary gland (chromatographed preparation, ChA-like enzyme, of Eluate I in A of Fig. 1.)

●—●: Enzyme 4 from the digestive juice (electrophoresed preparation, ChA-like enzyme, of the main active fraction in the upper graph of Fig. 2.)

After being incubated for various times at 30°C, enzyme solutions were immediately adjusted to pH 7.0 of the enzymic reactions and diluted with 1% NaCl solution to appropriate volume. The enzymic reactions were carried out at pH 7.0 for 20 min at 30°C with casein.

範囲内にある。この pH 域付近では ChA 様酵素 I は ChA 様酵素 4 にくらべて自己消化が速く安定性が低い (Fig. 3)。また前報の結果から考えて、消化管内で働く後唾腺蛋白消化酵素は蓄積されていた大部分が摂餌時に分泌されたもので、摂餌により新たに産生、分泌されてくることはほとんどなさそうである。それゆえ、ChA 様酵素 I は消化管内でその活性を維持して消化機能を十分に発揮するため、蛋白質が部分的に変化してより安定な ChA 様酵素 4 となるのであろうと推察される。

後唾腺 CPA 様酵素 IX と消化管内液汁 CPA 2 との同一性 摂餌マダコの後唾腺から前報と同様にして CM-Sephadex C-50 クロマトグラフィーによつて得た CPA 様酵素IX画分を再クロマトグラフィーに付してさらに精製した。Fig. 4 はそのクロマトグラムで、ほぼ単一なピークを示す酵素画分が得られた。この酵素画分と消化管内液汁中の対応酵素と考えられる CPA (CPA 2) とを同一条件下のディスク電気泳動に付した。Fig. 5 は両酵素の泳動像とそのデンストメーターによる走査図である。両酵素とも、均質でないで酵素活性の検出により主バンドが酵素蛋白質であると確認したが、両バンドの泳動位置はトレースされた主ピークからはつきり

Fig. 4. CM-Sephadex C-50 rechromatography of Enzyme IX (CPA-like enzyme) from posterior salivary gland.

The Enzyme IX was obtained by CM-Sephadex C-50 chromatography as in the previous paper¹⁾ from the gland of an octopus sampled 30 min after feeding. Rechromatography was performed by the same procedures as in Fig. 1 except that NaCl gradient was reduced to one-half the gradient in Fig. 1.

Fig. 5. Disc electrophoretic patterns of digestive juice Enzyme 2 and posterior salivary gland Enzyme IX.

DJ Enzyme 2: Enzyme 2 from the juice (chromatographed preparation, CPA, of Eluate II in B of Fig. 1), PSG Enzyme IX: Enzyme IX from the gland (rechromatographed preparation, CPA-like enzyme, of the main active fraction in Fig. 4).

Upper figure shows the schematic representation of electrophoretic patterns; lower figure densitometric tracings of the stained gel bands. Electrophoresis and staining of proteins were performed by the same procedures as described in the earlier paper²⁾. Enzymic activity was detected only in main band on both gels.

と一致することが分かった。それゆえ、両酵素は電気泳動的に同質の蛋白質であると判定される。上記精製 CPA 様酵素IXを用いて調べた諸性質は Table 3 に一括表示した通りで、さきに明らかにした CPA 2 の性質⁸⁾とよく一致した。これらの結果から、CPA 様酵素IXは CPA 2 と同一の CPA (CPA IX) と判定され、消化管内で働く蛋白消化酵素であることが明白となった。なお、前報でこの CPA IXと CPA VIIとが同一起源のものであると推察したが、後唾腺中では CPA VIIが多量に存在するのに、消化管内液汁中にはそれよりも CPA IXつまり CPA 2 が著しく多く存在している。これは、CPA IXが CPA VIIよりも消化管内液汁中の pH 域 (5.5~5.8) で著しく安定である (Table 3) ことか

Table 3. Some properties of Enzyme IX (CPA-like enzyme) from posterior salivary gland

Purity	Partially purified
Molecular weight	21,000
Isoelectric point	9.5
Specific activity* ¹	21.3
Substrate specificity	CPA type
Optimum pH on CGP	8.0
on CGL	8.0
on casein	8.0
Optimum temperature	
on CGP* ²	37°C
on casein* ³	35-40°C
Km value for CGP* ⁴	3.89×10^{-3} M
pH stability	Most stable at pH 5.5-7
Thermal stability* ⁵	Stable up to near 45°C
Effect of chemicals* ⁶	
Inhibition	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ Mn ²⁺ , EDTA, o-Phen Cys, NaCN, TGA, IAA IAM, Na-PP
Acceleration	Co ²⁺ , Mg ²⁺
None	Ca ²⁺ , DFP

*¹ Enzyme units of CGP hydrolyzing activity per mg of protein.

*² at pH 8.0 for 10 minutes.

*³ at pH 8.0 for 20 minutes.

*⁴ at pH 8.0, 37°C.

*⁵ when heated for 30 min at stable pH (6.0).

*⁶ Final concentration 10^{-3} M or g-ion/l, Preincubation at 30°C for 1 h and CGP substrate.

o-Phen: o-Phenanthroline, Cys: Cysteine, TGA: Thioglycollic acid, IAA: Iodoacetic acid, IAM: Iodoacetamide, Na-PP: Sodium pyrophosphate.

ら、前述の ChA 様酵素 I について考察したと同じ理由によるのではあるまいか。

要 約

前報でマダコ後唾腺の蛋白消化酵素と推定された ChA 様酵素 I と CPA 様酵素IXが、それぞれに対応していると考えられる消化管内液汁の ChA 様酵素 4 および CPA 2 と同一あるいは同一起源のものか否かを検討した。その結果は以下のようである。

1. ChA 様酵素 I は消化管内液汁中で (*in vitro*) 蛋白質に変化を生じて ChA 様酵素 4 と同一酵素になることが判明し、両酵素は同一起源のものであると判定された。

2. CPA 様酵素IXは、精製して諸性質を調べた結果、CPA 2 と同性質の CPA (CPA IX) と判明し、両 CPA は同一酵素と判定された。

3. 1 と 2 から、ChA 様酵素 I と CPA IXは、さきに消化酵素と判明していた CPA VIIと同様に、消化管内での餌料蛋白質の消化に関与する蛋白消化酵素であるこ

とが明確となつた。

終りに、本研究に対し種々有益なる御助言を賜つた九州大学農学部北御門学助教授に謹んで謝意を表する。また志摩マリランド前館長故椎野季雄博士には研究室ならびに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初め大久保修三、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・上野隆二・高橋 喬： 日水誌, 45, 177-178 (1979).
- 2) 森下達雄： 日水誌, 40, 601-607 (1974).
- 3) 森下達雄： 日水誌, 40, 927-936 (1974).
- 4) 森下達雄・上野隆二・高橋 喬： 日水誌, 40, 595-600 (1974).
- 5) O. H. LOWRY, N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 6) 萩原文二： 酵素研究法 (赤堀四郎編), 1, 朝倉書店, 東京, 1955, p. 166.
- 7) 森下達雄： 日水誌, 40, 917-925 (1974).