シロサケ幽門垂に存在する 2 種の主要アニオニックトリプシンの性質*¹

内田 直行・塚山貴以子・西出 英一

(1983 年 6 月 3 日受理)

Properties of Two Main Anionic Trypsins from the Pyloric Caeca of Chum Salmon

Naoyuki UCHIDA, Kiiko TSUKAYAMA, and Eiichi NISHIDE*²

Two anionic trypsin designated as DI-1 and DII-2 which were two main components in trypsin purified from the pyloric caeca of chum salmon *Oncorhynchus keta* had a molecular weight of 24,000 and 23,800, $S_{0.20,w}$ of 3.27 and 3.00, respectively, and similar amino acid compositions to those of mammalian trypsin.

Their optimum pH of hydrolysis for *N*-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME) were found to be 7.5-8.0 and 8.0, and for casein were 10-11 and over 11, respectively. Both enzymes specifically hydrolyzed arginine and lysine methyl ester, and reacted with *N*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) and diisopropylfluorophosphate (DFP) according to a first order reaction mechanism at a rate constant of $2.1-5.8 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$, and with soybean trypsin inhibitor (STI) and chicken ovomucoid (COM) at a molar ratio of about 1:1.

The activities of both enzymes were not effected by any divalent cations, and were unstable at pH below 5 and stable at pH 7-9. This stability at pH 7-9 was increased in the presence of low concentration of Ca^{2+} (5 mM) and decreased in the presence of EDTA. DI-1 treated completely with EDTA lost about 50% of original activity and markedly decreased stability at pH 7-9. Lost activity was recovered to original activity in the presence of Ca^{2+} and other divalent cations, however, stability was not.

These results in the EDTA treatment suggest that DI-1 may hold Ca^{2+} so tightly that it is unremovable from enzyme by a dialysis and treatment with EDTA for a short time to maintain activity and stability of enzyme at pH 7-9.

膵臓性トリプシン (EC 3.4.21.4.) はその電気的性質からカチオニックおよびアニオニックトリプシンとに大別される。カチオニックトリプシンの存在が知られているのは現在のところ脊椎動物だけであるが、アニオニックトリプシンは無脊椎動物から高等哺乳動物まで広く分布している。

著者らはシロサケ *Oncorhynchus keta* の幽門垂中に 7 種のアニオニックトリプシンと 1 種のカチオニックトリプシンが存在することを明らかにした。そのうち主要成分である 2 種のアニオニックトリプシン (DI-1 および DII-1) と微量成分である 3 種のアニオニックトリプシン (DI-2, DI-3 および PI-1) および 1 種のカチオニックトリプシン (PII-1) を電気泳動的に単一もしくは高度に精製した。さらに、それら各酵素の基本的な機能はウシカチオニックトリプシンと類似していることを明らかにした。¹⁾

本研究ではさらにシロサケ幽門垂トリプシンの性質を明確にするため、主要成分である 2 種のアニオニックトリプシンに主眼をおきその性質をさらに検討した。

実験材料および方法

試料 2 種のシロサケアニオニックトリプシン、DI-1 および DII-1, は前報の方法¹⁾により精製したものをを用いた。

アミノ酸分析法 試料を真空中で封管し, 6N HCl 中, 110°C で 18, 24, 48 および 72 時間加水分解し, 自動アミノ酸分析機 (Hitachi KLA-5) によりノルロイシンを内標準として分析した。シスチンは MOORE の方法²⁾によりシスチン酸として定量した。トリプトファンは GOODWIN らの吸光度法³⁾により測定した。

超遠心沈降分析法 10 mM Tris-HCl-0.1 M KCl-1 mM ベンズアミジン, pH 8.0 に溶解および透析した後, ミ

*¹ シロサケ幽門垂トリプシンに関する研究—II (Studies on the trypsin in the pyloric caeca of chum salmon—II)

*² 日本大学農獣医学部水産学科 Department of Fisheries, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Shimouma, Setagaya, Tokyo 154, Japan).

本文中では次の略語を用いた。EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; SDS, sodium dodecylsulfate.

リポフィルターで濾過した酵素液について、optical accessory を装備した Beckman Model L2-65B 型超遠心分離機により $10 \pm 1^\circ\text{C}$, 59,900 rpm で沈降速度を測定した。沈降定数 ($S_{20,w}$) 算出に用いた偏比容は試料の amino 酸組成より McMEEKIN らの方法⁴⁾により算出した 0.72 を用いた。溶媒密度および粘度は常法⁵⁾に従って測定した。

その他 分子量の測定は WEBER らの方法⁶⁾に準じ、10% ゲルを用いる SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により求めた。酵素活性測定方法および試薬は前報¹⁾に準拠した。

実験結果および考察

酵素の性質 P-トシル-L-アルギニンメチルエステル (TAME) を基質とした場合の DI-1 および DII-1 の各

Fig. 1. Effects of pH on the TAME hydrolytic activities and the caseinolytic activities of the anionic trypsins from chum salmon.

The TAME hydrolytic activity (panel A) was assayed at 30°C in 50 mM Tris-actate (pH 6.5–7.0) and in 50 mM Tris-HCl (pH 7.0–9.0) according to the method of HUMMEL¹⁰⁾. The caseinolytic activity (panel B) was assayed at 30°C in 80 mM phosphate buffer (pH 6.5–7.1), 80 mM phosphate-borax buffer (pH 7.6–9.0) and 40 mM borax-sodium carbonate buffer (pH 9.5–11) by the method of ANSON-HAGIWARA¹¹⁾. DI-1 (○) and DII-1 (△) are purified by the method described in the previous report¹⁾.

pH における活性は Fig. 1A に示すごとくであり、至適 pH は 8 付近に存在していた。カゼインを基質としたときは両酵素ともに中性付近で活性が弱く、かなり高い pH 域で高い活性を示した。また DI-1 は pH 11 で活性が低下し、至適 pH は 10~11 に存在したが、DII-1 はこれと異なり pH 11 でもなお高い活性を保持し、至適 pH は 11 付近あるいはそれ以上にあるものと考えられた。この結果は中性から微アルカリ域にかけて広い至適 pH (pH 7.5~9.5) をもつウシトリプシン⁷⁾とは著しく異なるものであった。しかし、イワシ *Sardinops melanostica*⁸⁾ およびフナ *Carassius auratus*⁹⁾ のトリプシンもカゼインに対し高い至適 pH (pH 10) を示すことから、これは硬骨魚類トリプシンの特性と予測される。他のシロサケアニオンックトリプシンにおいても TAME に対する pH-活性曲線にほとんど差は認められなかったが、

Fig. 2. Kinetic analysis of the effects of DFP and TLCK on the activities of the anionic trypsins from chum salmon.

Remaining activities were determined after preincubation of enzyme (25–30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) with a final concentration of 1 mM DFP (panel A) and TLCK (panel B) at 30°C in 50 mM Tris-HCl containing 50 mM CaCl_2 , pH 8.0. ○—○: DI-1, △—△: DII-1.

カゼインに対しては各々で異なり、カゼインのような実際に生体内で消化される高分子基質に対しおのおのが異なる性質を示すことを示唆した。

精製されたすべてのシロサケトリプシンはトリプシンの特異的阻害剤である *N*-トシル-L-リジンクロロメチルケトン (TLCK), ジイソプロピルフロロリン酸 (DFP), 大豆トリプシンインヒビター (STI) およびニワトリオボ

Table 1. Reaction parameters of the anionic trypsin from chum salmon with specific inhibitors

Enzyme	Reaction rate constant* ¹ ($\times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$)		Ratio of inhibitor* ² (mg of inhibitor/ mg of enzyme)	
	DFP	TLCK	STI	COM
DI-1	4.8	5.8	0.8	1.0
DII-1	5.1	2.1	1.0	1.3

*¹ These values for rate constants were calculated from the slopes of Fig. 2.

*² These values were ratio of mg of inhibitor to mg of enzyme extrapolated to 0% of remaining activity in Fig. 3.

Fig. 3. Reactions of the anionic trypsin from chum salmon with STI and COM.

Remaining activities were determined after preincubation of enzymes with inhibitor at 30°C for 45 min in 50 mM Tris-HCl containing 50 mM CaCl_2 , pH 8.0. Panel A: STI, panel B: COM, ○—○: DI-1, △—△: DII-1.

ムコイド (COM) により完全に失活することはすでに明らかにした¹⁾が、各酵素の反応機構をより明らかにするため、各酵素と上記阻害剤との反応をさらに詳しく検討した。Fig. 2 に示すように DI-1 および DII-1 の DFP および TLCK との反応は一次反応に従った。また、Fig. 2 の勾配より求めた反応速度において両酵素間に顕著な差は認められなかった (Table 1)。各トリプシン活性が完全に阻害されるときの STI および COM との比は Table 1 に示すごとくである。各トリプシン、STI および COM の分子量を考慮すると両酵素の活性は STI および COM により 1 分子対 1 分子の量子論的に阻害されるといえる (Fig. 3)。

両酵素の基質特異性を検討するため種々のアミノ酸のエチルまたはメチルエステルに対するエステラーゼ活性を MORIYA らの方法¹²⁾により測定した (Table 2)。両酵素は TAME およびリジンメチルエステル (LysOME) のみを特異的に加水分解し、その他のアミノ酸エステルはほとんど無視できる程度にしか加水分解しなかった。その他のシロサケアニオニックトリプシンも同様であった。TAME と LysOME に対する活性比を比較するとおのおのに特徴があり、DI-1 では 0.93 と両者をほぼ同程度に、DII-1 は TAME を強く水解した。他のシロサケアニオニックトリプシンでは DI-2, DI-3 がそれぞれ 1.28 および 1.38 と TAME よりむしろ LysOME を良く分解する特異的な性質を示した。

以上のごとく両酵素ともに各阻害剤に対する反応様式、基質特異性が非常に類似しており、その活性中心の構造は高い相同性を示すものと思われる。

タンパク質化学的性質 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により DI-1 および DII-1 の分子量を求めた。

Table 2. Several amino acid ester hydrolytic activities of the anionic trypsin from chum salmon

Amino acid ester	Enzyme	
	DI-1	DII-1
Relative activity (%)		
TAME (A)	100	100
L-lysine methyl ester (L)	93	70
Glycine ethyl ester	0.2	0.2
L-methionine ethyl ester	0.1	0.1
L-leucine ethyl ester	0.1	0.1
L-isoleucine ethyl ester	0.1	0.1
L-valine ethyl ester	0.1	0.1
L-serine ethyl ester	0.1	0.2
L-phenylalanine ethyl ester	0.2	0.2
A/L	0.93	0.70

Activity was determined by the method of MORIYA *et al.*¹²⁾ using a tinal substrate concentration of 40 mM in 25 mM borate buffer containing 5 mM CaCl_2 , pH 8.0.

DI-1 および DII-1 の相対移動距離は近似しており、標準タンパク質の分子量と相対移動距離の関連曲線 (Fig. 4) より求めた分子量は DI-1 で 24,000, DII-1 で 23,800 であった。これはアミノ酸組成より求めたウントリプシ

Fig. 4. Estimation of the molecular weight of the anionic trypsins from chum salmon by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Enzymes and marker proteins (5 μ g of each) were subjected to electrophoresis in a 10% polyacrylamide gel in the presence of 0.1% SDS. Molecular weights of DI-1 and DII-1 were estimated to be 24,000 and 23,800, respectively. The location of DI-1 is noted by the arrow. Relative mobility is defined as ratio of mobility of protein to bromophenol blue. Marker proteins used are as follows, 1: cytochrome C (12,400), 2: myoglobin (17,200), 3: chymotrypsinogen (25,700), 4: aldolase (40,000) and 5: ovalbumin (46,000).

ンの分子量 23,200¹³⁾ と近似しており、他の硬骨魚類、イワシ: 27,000~27,600⁸⁾、カブリン *Mallotus villosus*: 28,000¹⁴⁾、ナマズ *Parasilus asotus*: 26,000¹⁵⁾ より小さい値であった。他のシロサケアニオントリプシンもほぼ同様な分子量を与えた。

DI-1 および DII-1 の超遠心分析図を Fig. 5 に示す。両酵素とも対称的な一つのピークを示し、両酵素は超遠心的にも単一であることが確認できた。各種タンパク質濃度における沈降定数 ($S_{0,20,w}$) は Fig. 6 のごとくであった。この直線より求められた $S_{0,20,w}$ は、DI-1 で 3.27, DII-1 で 3.00 で高等動物トリプシンあるいはトリプシノーゲンに比べ明らかに高い値であった。¹⁶⁾

DI-1 および DII-1 のアミノ酸組成は Table 3 のごとくである。比較のために他種トリプシンのアミノ酸組成も併記した。DI-1 および DII-1 のアミノ酸組成は互いに類似しており、他種トリプシン、特にアニオントリプシンと全体的に似かよっていた。アミノ酸組成より求めた分子量は DI-1 で 22,400, DII-1 で 23,800 であった。

DI-1 および DII-1 の分子量およびアミノ酸組成は高等動物トリプシンと類似しているが、 $S_{0,20,w}$ が明らかに異なることから、両酵素の基本的構造は高等動物トリプシンと類似しているものの分子形に相異があることを示唆している。

安定性 pH 3~11 に 25°C で 24 時間放置したときの残存活性を Fig. 7A に、4°C で 50 時間放置したときの残存活性を Fig. 7B に示す。DI-1 および DII-1 は両

Fig. 5. Sedimentation velocity patterns of the anionic trypsins from chum salmon.

The protein concentration was 5.2 mg/ml for DI-1 (panel A) and 4.5 mg/ml for DII-1 (panel B) in 10 mM Tris-HCl containing 0.1 M KCl and 1 mM benzamidine, pH 8.0. The picture was taken at 145 min for DI-1 and 150 min for DII-1 after reaching a speed of 59,900 rpm at $10 \pm 1^\circ\text{C}$. Sedimentation is from right to left.

Table 3. Amino acid compositions of the anionic trypsins from chum salmon and another trypsins

Amino acid	Residues per molecule*1							Cationic trypsin
	Anionic trypsin							
	DI-1	DII-1	Star fish	Carp	Sardine	Catfish	Bovine	
Lysine	8	8	9	10	17	11	8	14
Histidine	3	3	4	6	3	7	5	3
Arginine	2*2	2*2	4	7	6	5	4	2
Aspartic acid	22	25	31	27	31	25	26	22
Threonine	14*3	14*3	15	10	19	9	10	10
Serine	23*3	25*3	18	22	17	23	17	33
Glutamic acid	14	15	20	26	16	22	24	14
Proline	12	14	13	9	10	13	9	9
Glycine	25	27	28	28	27	24	25	25
Alanine	15	16	16	14	15	13	19	14
Valine	16*2	17*2	19	18	18	18	16	17
Half-cysteine	12*4	12*4	8	12	8	12	12	12
Methionine	6	6	2	5	1	6	2	2
Isoleucine	9*2	9*2	11	10	11	13	17	15
Leucine	13	15	13	12	10	13	21	14
Tyrosine	10	11	8	8	13	9	12	10
Phyenylalanine	4	3	5	4	4	6	3	3
Tryptophan	5*5	6*5	5	8	4	7	7-8	4
Total	213	228	229	236	230	236	237-238	223
Reference			17	18	8	15	19	13

*1 The results shown without mark are presented as integral number calculated from the average value obtained through hydrolysate for 18, 24, 48 and 72 h in DI-1 and 24, 48 and 72 h in DII-1 to give the best fit to the respective molecular weight estimated by SDS-polyacrylamidegel electrophoresis (DI-1; 24,000, DII-1; 23,800).

*2 Maximum value obtained.

*3 Value extrapolated to zero time.

*4 Determined as cysteic acid.

*5 Determined by spectrophotometric method.³⁾

Fig. 6. Protein concentration dependence of sedimentation constants of the anionic trypsins from chum salmon.

Experimental conditions are as described in the legend to Fig. 5. ○—○: DI-1, △—△: DII-1.

条件下ともに酸性で不安定であった。この性質は無脊椎動物から高等動物のアニオニックトリプシンに見られることから、アニオニックトリプシンの特徴と考えられ

る。逆に、中性から微アルカリ域、pH 7~9, で DI-1 および DII-1 は安定であった。無脊椎動物^{17,20-22)} および魚類^{8,9,14,15,23)} のアニオニックトリプシンのほとんどは中性から微アルカリ域で安定であり、高等動物のアニオニックトリプシン^{24,25)} は不安定であることから、この性質は下等脊椎動物以下のアニオニックトリプシンの特性と予測される。アルカリ域、pH 11, で低温に放置した場合、両酵素とも安定であり、25°C では不安定であった。これはこの pH 域において、これら酵素は活性に影響を与えるような構造変化を起こさないが、自己消化を受け易い構造になるためと考えられる。他のシロサケアニオニックトリプシンも DI-1 および DII-1 と同様な性質を示した。

安定 pH 域で各温度に 30 分間放置した後の残存活性は Fig. 8 のごとくである。DI-1 および DII-1 は低い温度で速かに失活した。50% 残存活性を示す温度は DI-1 で 45.5°C, DII-1 で 49°C であった。

金属イオンの影響 DI-1 および DII-1 を pH 8.0,

Fig. 7. Effects of pH on the stabilities of the anionic trypsins from chum salmon.

Remaining activities were determined after preincubation of enzymes in 50 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 3.0 and 5.0), 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) and 50 mM phosphate-NaOH buffer (pH 11) at 25°C for 24 h (panel A) and at 4°C for 50 h (panel B). ○—○: DI-1, △—△: DII-1.

35°C に放置すると、両酵素ともに一次反応に従って失活した (Fig. 9)。その失活速度は Table 4 に示すように DII-1 は DI-1 より低かった。両酵素の失活速度は塩化カルシウムの添加により低下し、両酵素とも塩化カルシウムにより安定化されることが認められた。安定化作用をもつ他の金属として DI-1 では Mn^{2+} 、DII-1 では Sr^{2+} が確認された (Table 5)。

DI-1 および DII-1 は EDTA の添加により著しく不

Fig. 8. Effects of temperature on the stabilities of the anionic trypsins from chum salmon.

Remaining activities were determined after preincubation of enzymes for 30 min at each temperature in 50 mM Tris-HCl, pH 8.8. ○—○: DI-1, △—△: DII-1.

安定になった。この性質はウナギアニオントリプシン*に見出されている。これは DI-1 および DII-1 に結合し、安定化している金属が EDTA により除かれ、両酵素が自己消化により失活し易くなったことを示唆するものであった。また、検討したいずれの金属によっても DI-1 および DII-1 の活性は影響されなかった (Table 6)。

EDTA 処理酵素の性質 DI-1 および DII-1 の EDTA による不安定化の原因として、透析のみで除去できない程度の強さで両酵素に結合している安定化作用のある金属イオンが EDTA により除去されたためと予測された。この点をさらに詳しく調べるために、DI-1 および DII-1 を 1 mM EDTA を含む 5 mM Tris-HCl, pH 8.8, に溶解し、さらに同緩衝液で透析処理を行い、その後、EDTA を含まない同緩衝液に十分透析して EDTA を除去した酵素液 (EDTA 処理酵素) および EDTA を含まない同緩衝液で同様に処理した酵素液 (未処理酵素) を調製し、その酵素の安定性および活性におよぼす金属の影響を検

Table 4. Effects of $CaCl_2$ and EDTA on the inactive rate constants of the anionic trypsins from chum salmon

Enzyme	Inactive rate constant (sec^{-1})*			
	$CaCl_2$			EDTA
	0 mM	5 mM	50 mM	1 mM
DI-1	1.5×10^{-5}	0	0	1.8×10^{-4}
DII-1	1.7×10^{-6}	0	0	8.1×10^{-5}

* These values for inactive rate constants were calculated from the slopes of Fig. 9.

Fig. 9. Effects of CaCl_2 and EDTA on the stabilities of the anionic trypsins from chum salmon.

Remaining activities were determined after preincubation of enzymes at 35°C for each time in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 (○), in the presence of 5 mM CaCl_2 (●), 50 mM CaCl_2 (□) and 1 mM EDTA (△). Panel A: DI-1, panel B: DII-1.

Table 5. Effect of divalent cations on the stabilities of anionic trypsins from chum salmon

Salt (5 mM)	Remaining activity (%) ^{*1}			
	DI-1		DII-1	
	none ^{*2}	EDTA ^{*3}	none ^{*2}	EDTA ^{*3}
no salt	21	11	79	3
CaCl_2	93	25	106	109
MgCl_2	36	26	81	97
MnCl_2	77	21	63	78
BaCl_2	23	16	80	23
SrCl_2	35	25	93	73

^{*1} Remaining activity was assayed after preincubation of enzyme (25–30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 35°C for 30 h in 40 mM Tris-HCl, pH 8.0.

^{*2} None treated with EDTA.

^{*3} Treated with EDTA.

討した。その結果を Fig. 10 および 11, Table 5 および 6 に示す。

DI-1 および DII-1 は EDTA 処理により明らかに不安定となり、 35°C , pH 8.0 に 24 時間放置した場合の残存活性は 0 および 2% であった (未処理の場合, 22% および 69%)。EDTA 処理 DII-1 は未処理酵素と同様に低濃度の塩化カルシウムにより安定化された。 Ca^{2+} 以外の安定化金属としては未処理酵素では Sr^{2+} だけであったが、EDTA 処理により Mg^{2+} , Mn^{2+} が安定化効果を示すようになった。DI-1 は EDTA 処理により

Table 6. Effect of divalent cations on the activities of the anionic trypsins from chum salmon

Salt (5 mM)	Relative activity (%) ^{*1}			
	DI-1		DII-1	
	None ^{*2}	EDTA ^{*3}	None ^{*2}	EDTA ^{*3}
no salt	100	100	100	100
CaCl_2	104	141	100	110
MgCl_2	105	113	98	112
MnCl_2	110	138	102	114
BaCl_2	110	121	105	110
SrCl_2	103	125	99	102

^{*1} Activity was assayed at 30°C in 40 mM Tris-HCl, pH 8.0.

^{*2} None treated with EDTA.

^{*3} Treated with EDTA.

Fig. 10. Effect of CaCl_2 on the stabilities of none treated and EDTA-treated anionic trypsins from chum salmon.

Purified enzymes (80–90 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were dissolved in 5 mM Tris-HCl containing 1 mM EDTA, pH 8.8, and dialyzed against the same buffer for 10 h at $3\text{--}5^\circ\text{C}$. EDTA was removed from treated enzymes by the thrice dialysis for 10 h at $3\text{--}5^\circ\text{C}$ against 5 mM Tris-HCl, pH 8.8. None treated enzymes were prepared by the same procedure without EDTA. Remaining activities were determined after preincubation at 35°C for 24 h in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. Panel A: DI-1, panel B: DII-1, ○—○: EDTA-treated enzyme, △—△: none treated enzyme.

Ca^{2+} およびその他の金属イオンによっても安定化されないほど著しく不安定になった。DII-1 は EDTA 処理あるいは未処理にかかわらず Ca^{2+} あるいは他の金属イオンにより活性化されないが、DI-1 は EDTA 処理により Ca^{2+} および他種金属イオンによって活性化されるようになった。DI-1 の活性は EDTA により著しい影響を受けないことを報告¹⁾したが、本実験のごとく徹底した EDTA 処理を行った酵素の活性は未処理酵素の約

Fig. 11. Effect of CaCl_2 on the activities of none treated and EDTA-treated anionic trypsins from chum salmon.

DI-1 lost about 50% of original activity in the EDTA-treatment described in the legend to Fig. 10. Panel A: DI-1, panel B: DII-1, ○—○: EDTA-treated enzyme, △—△: none treated enzyme.

1/2に減少した。このことより、 Ca^{2+} による約50%の活性化はEDTA処理により失活した活性が未処理酵素の活性まで回復したことを意味するものと考えられる。

以上のEDTA処理および未処理酵素に関する結果より、DI-1およびDII-1は二価金属イオン、特に Ca^{2+} を簡単な透析あるいは低濃度EDTAとの短時間の接触程度では除去できない程度に結合し、自己消化に対して安定な構造を維持できる能力をもっている可能性がある。特にDI-1にとって Ca^{2+} は活性発現においても必須なものであると考えられる。しかも、低濃度の Ca^{2+} によって安定化されることから高濃度に Ca^{2+} を濃縮し、結合させる能力をもつと予測される。従来、エビ *Penaeus seiferus*,²⁰⁾ ヒトデ *Evasterias trochelii*,¹⁷⁾ カブリ¹⁴⁾ およびフナ⁹⁾ などの無脊椎動物から下等脊椎動物のアニオニックトリプシンは自己消化に対し安定であり、 Ca^{2+} の安定化効果が認められていない。これらの酵素はDI-1と同様に透析あるいは低濃度キレート剤による短時間処理などの簡単な操作では除去できない程度に Ca^{2+} を結合している可能性がある。

要 約

シロサケ幽門垂より精製したトリプシンの主要成分である2種のアニオニックトリプシン(DI-1およびDII-1)の性質を検討し、次の結果を得た。

1. TAMEを基質としたときの至適pHはDI-1で7.5, DII-1で8.0付近に存在し、カゼインを基質とした

ときはDI-1で10~11, DII-1で11以上であった。

2. 両酵素とDFPおよびTLCKとの反応は一次反応に従い、その反応速度は $2.1 \sim 5.8 \times 10^{-8} \text{ sec}^{-1}$ であった。また、両酵素ともSTIおよびCOMと1分子対1分子の量子論的に反応した。

3. 各種アミノ酸エステルに対する加水分解活性を検討したところ、両酵素ともアルギニンおよびリジンエステルを特異的に分解した。

4. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により測定した分子量はDI-1で24,000, DII-1で23,800であり、両酵素のアミノ酸組成は他種トリプシンと類似していた。しかし、 $S_{0.20,w}$ はDI-1で3.27, DII-1で3.00であり、ウシトリプシンなどに比べ明らかに大きな値を示した。

5. 両酵素は酸性で不安定であり、中性から微アルカリ域において安定であった。しかし、EDTAにより中性から微アルカリ域での安定性は減少した。

6. EDTA処理したDI-1は活性および中性から微アルカリ域における安定性を著しく減少した。 Ca^{2+} およびその他二価金属イオンにより活性はほぼ完全に回復したが、安定性は回復しなかった。

以上の結果はDI-1およびDII-1は活性中心の構造などの基本的構造においてウシトリプシンなど高等動物膵臓性トリプシンと非常に類似しているが分子形などに若干の差異をもつこと、また、両酵素は Ca^{2+} などを強く結合し、自己消化を起し難い構造を保持しており、特にDI-1の活性発現にとって二価金属イオンは必須なものであることを示唆するものであった。

終りに臨み、本研究を進めるに当たり終始ご指導を賜りました北海道大学水産学部名誉教授斎藤恒行博士に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 内田直行・塚山貴以子・西出英一：日水誌，50, 129-138 (1984).
- 2) S. MOORE: *J. Biol. Chem.*, 238, 235-237 (1963).
- 3) T. W. GOODWIN and R. A. MORTON: *Biochem. J.*, 40, 628-632 (1946).
- 4) T. L. McMEEKIN, M. L. GROVES, and N. HIPP: *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 3298-3300 (1949).
- 5) 浅岡忠和・島崎長一郎：図説物理化学実験法，三共出版，東京，1971, pp. 49-60.
- 6) K. WEBER and M. OSBON: *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412 (1969).
- 7) J. H. NORTHROP and M. KUNITZ: *J. Gen. Physiol.*, 16, 295-311 (1932).
- 8) K. MURAKAMI and M. NODA: *Biochim. Biophys. Acta*, 658, 17-26 (1981).

- 9) K. D. JANY: *Comp. Biochem. Physiol.*, **53B**, 31-38 (1976).
- 10) B. C. W. HUMMEL: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 1393-1399 (1959).
- 11) 萩原文二: 標準生化学実験, 文化堂, 東京, 1953, pp. 207-211.
- 12) H. MORIYA, N. TODOKI, C. MORIWAKI, and Y. HOJIMA: *J. Biochem.*, **69**, 815-817 (1971).
- 13) K. A. WALSH and H. NEURATH: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **52**, 884-889 (1964).
- 14) K. HJELMELAND and J. PAA: *Comp. Biochem. Physiol.*, **71B**, 557-562 (1982).
- 15) R. YOSHINAKA, T. SUZUKI, M. SATO, and S. IKEDA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 207-212 (1983).
- 16) K. A. WALSH: in "Methods in Enzymology" (ed. by G. E. PERLMAN and L. LORAND), Vol. 19, Academic Press, New York, 1970, pp. 41-63.
- 17) W. P. WINTER and H. NEURATH: *Biochemistry*, **9**, 4673-4679 (1970).
- 18) T. COHEN, A. GERTLER, and Y. BIRK: *Comp. Biochem. Physiol.*, **69B**, 639-646 (1981).
- 19) M. L. LOUVAKD and A. PUIGSERVER: *Biochim. Biophys. Acta*, **371**, 177-185 (1974).
- 20) B. J. GATES and J. TRAVIS: *Biochemistry*, **8**, 4483-4489 (1969).
- 21) E. P. KOZLOVSKAYA and L. A. ELYAKOVA: *Biochim. Biophys. Acta*, **371**, 63-70 (1974).
- 22) E. B. GILLIAN and G. B. KITTO: *Comp. Biochem. Physiol.*, **54B**, 21-26 (1976).
- 23) G. R. REECK and H. NEURATH: *Biochemistry*, **11**, 503-510 (1972).
- 24) P. VOYTEK and E. C. GJESSING: *J. Biol. Chem.*, **246**, 508-516 (1971).
- 25) E. COLOMB, O. GUY, P. DEPREZ, R. MICHEL, and C. FIGARELLA: *Biochim. Biophys. Acta*, **525**, 186-193 (1978).