76. 福田幸平：蛋白酵素分解物の薬学的研究（第1報*） ペプシン或はトリプシン
による蛋白酵素分解物中の遊離アミノ酸の分析

Kouhei Fukuda: Pharmaceutical Studies on Enzymatic Hydrolysates of
Proteins. I. Analysis of Liberated Amino Acids in Peptic or
Tryptic Hydrolysates of Proteins.

(Pharmaceutical Faculty, University of Kanazawa**)

近時、蛋白質の酵素分解物は蛋白加水分解物製剤として広く用いられるに至っているが、著者は先ずペプシン又はトリプシンによる蛋白質の酵素分解に於いて遊離されるアミノ酸について、ペーパークロマトグラフィーによる検討を試みた。元来、ペプシン又はトリプシンによる蛋白質の酵素分解では主としてポリペプチドを生じ、遊離アミノ酸の生成は極めて少量であるので、その分析は従来の化学的方法では種々の困難と欠点を伴い、従来の報告¹⁻⁵⁾は主として限られた特定のアミノ酸についての単離又は比色法によるもので、又近時は微生物定量法による報告^{6,7)}も見られるが、これらの方法に於いては遊離アミノ酸とペプチド結合中のアミノ酸とを判然と区別出来ないことが多い。これに対してペーパークロマトグラフィーによると凡ての操作を室温で行うことが出来るのでペプチド結合の分解を起す恐れがなく、又ペプチドと遊離アミノ酸とを区別して検出出来る等の利点がある。ペーパークロマトグラフィーによる天然物中の遊離アミノ酸についての報告は Dent⁸⁾を始め多くあるが、本研究の対照である天然蛋白質のペプシン又はトリプシンによる加水分解物中の遊離アミノ酸に関しては殆ど無く、著者の知る範囲では類似の研究としてカゼイン酵素分解物製剤“Aminosol”の電気透析を行い、両極部分のペプチドの構成アミノ酸を検した Verdier⁹⁾の報告、タバコ・モザイク・バイラスのパンクレアチンによる加水分解物についての Stepka¹⁰⁾の報告等が見られるだけである。

本研究に於ては先ずカゼイン、卵アルブミン、エデスチン、 γ -グロブリン、ゼラチンの5種の蛋白についてペプシン或はトリプシンによる酵素分解を行ったのであるが、各酵素分解に於ける加水分解度 (α -amino-N/total-N%) の変化は Table I, II の如くであつた。次に7日間酵素分解後、此等各酵素分解液中の遊離アミノ酸について二次元ペーパークロマトグラフィーを行い、アミノ酸の呈色度より各酵素分解液中の遊離アミノ酸の種類及びその遊離の度合について比較検討を行ったのであるが、その結果は Table III の如くであつた。そして此等の結果よりペプシン或はトリプシンにより蛋白質より遊離されるアミノ酸は数種のアミノ酸に限定されるもので

Table I 加水分解度 (α -amino-N/total-N%)

Substrate	Total-N (mg./cc.)	1 hr.	1 day	4 days	7 days
Casein	3.22	11.7 (0.375)	17.3 (0.558)	19.6 (0.631)	21.0 (0.676)
Ovalbumin	2.45	14.4 (0.351)	20.5 (0.503)	22.2 (0.543)	24.0 (0.587)
Edestin	2.74	9.30 (0.254)	16.5 (0.452)	18.6 (0.508)	20.6 (0.564)
Gelatin	3.08	7.8 (0.240)	9.4 (0.289)	10.3 (0.318)	11.1 (0.342)
γ -Globulin	3.29	—	—	—	22.3 (0.733)

() α -amino-N (mg./cc.)

* 1951年11月、日本薬学会近畿特別例会に於いて発表。

** Tsuchitoriba-nagamachi, Kanazawa.

1) Damodaran, Krishnan: Biochem. J. **32**, 1919 (1938).

2) Clavery, Block, Schock: J. Biol. Chem. **113**, 21 (1936).

3) Fujita: Tohoku J. of Experimental Medicine **34**, 525 (1938).

4) Jones, Gersdorff: J. Biol. Chem. **101**, 657 (1933).

5) Damodaran, Krishnaswamy: Proc. Indian Acad. Sci. **15 B**, 285 (1942).

6) Hou, Riesen, Elvehjem: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **70**, 417 (1949).

7) Hanks, Riesen: J. Biol. Chem. **176**, 467 (1948).

8) Dent: Nature **160**, 682 (1947).

9) Verdier: Acta Chem. Scand. **2**, 783 (1948).

10) Stepka: Science **111**, 76 (1950).

Table II 加水分解度 (α -amino-N/total-N%)

Substrate	Total-N (mg./cc.)	1 hr.	1 days	4 days	7 days
Casein	3.36	11.5 (0.386)	19.6 (0.658)	21.4 (0.721)	21.8 (0.733)
Ovalbumin	2.44	8.6 (0.210)	10.8 (0.263)	11.6 (0.282)	12.1 (0.295)
Edestin	3.00	7.9 (0.237)	15.4 (0.463)	20.9 (0.626)	22.2 (0.666)
Gelatin	2.94	11.6 (0.341)	13.1 (0.386)	13.8 (0.406)	14.4 (0.425)
γ -Globulin	3.27	—	—	—	18.0 (0.617)

() α -amino-N (mg./cc.)

Table III

Substrate	Casein		Ovalbumin		Edestin		Gelatin		γ -Globulin		Control	
	Pep- sin	Tryp- sin	Pep- sin	Tryp- sin	Pep- sin	Tryp- sin	Pep- sin	Tryp- sin	Pep- sin	Tryp- sin	Pep- sin	Tryp- sin
Aspartic acid	++	+	+++	+	++	++	+++	±	+	±	+	—
Glutamic acid	++	+	+++	++	++	+	+++	±	++	±	+	—
Glycine	++	+	+	+	+	+	++	+++	++	±	+	—
Serine	+	—	±	+	++	+	++	±	+	+	+	—
Threonine	++	—	±	—	+	±	++	+	±	++	+	—
Alanine	++	+	+	+++	++	+	++	++	+	++	+	—
Valine	++	+	++	++	+	++	+	+	+	++	+	—
Methionine	++	++	+++	+++	+++	+++	+	+	++	++	+	—
Leucine (isoleucine)	++	++	+++	++	—	++	+++	++	+++	+++	+	—
Tryptophan	+	+	±	—	+	+	±	±	—	+	—	—
Phenylalanine	+	+	+	++	+	+	+	±	+	+	±	—
Tyrosine	++	++	—	++	++	+++	+	±	+	+++	±	—
Histidine	+	++	±	±	+	++	±	±	±	++	—	—
Lysine	+	++	+++	+++	+	+++	+	+	++	+	+	—
Arginine	+	++	+	+++	+	++	+	+	+	+	+	—
Proline	±	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cystine	±	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—

—: 呈色斑点の認められ無いもの。

++: 明かに確認出来るもの。

±: 呈色が微で確認困難なるもの。

++: 呈色度の相当強いもの。

+: 透視により確認出来るもの。

は無く、その遊離される度合に差はあつても非常に多種類に亘ることが明であり、又一つの基質についてペプシンによる加水分解物とトリプシンによる加水分解物とを比較して一般的に言えることは、前者は後者よりもアスパラギン酸、グルタミン酸を強く遊離することであるが、此等の事實は Bergman¹¹⁾ 等のいう酵素の特異性及び cosubstrate effect 等と関連して興味がある。

終りに本研究に終始御指導を賜つた京都大学高木誠司教授、鈴木友二教授並びに金沢大学平本実教授に厚く感謝する。又 γ -グロブリンを恵与された武田薬工研究所大村栄之助氏に感謝の意を表する。尙本研究の一部は文部省科学研究費に依つた。茲に謹謝する。

実 験 の 部

(1) 基質蛋白の精製 カゼイン: Hammarsten-Casein (メルク) を 0.1 N NaOH を用いて pH 6.3 に於て水に溶解せしめその汚液を 0.05 N HCl にて pH 4.6 として再沈澱させて精製。エデスチン: 10% 食塩水より再結晶。卵アルブミン及びゼラチン: fish skin を用いて流水中 24 時間透析。 γ -グロブリン: 馬血清より Na_2SO_4 法により分離した結晶。

11) Bergman: "Advances in Enzymology" II, 54.

(2) **ペプシンによる酵素分解** 基質蛋白 2 g を 0.2% HCl と混和し、別にペプシン（米国ウィルソン社製品）150 mg を少量の 0.2% HCl に溶した液と合して全容を 100 cc にすると共に pH 1.8 とする。別のフラスコに器壁につかぬ様に移し、トルオールを加え綿栓して 37°, 7 日間消化を行つた。その間一定時間毎に加水分解液の一部をとりマイクロケルダール法による総窒素の定量、マイクロバンスライク法による α -アミノ窒素の定量を行い加水分解度の変化を測定した。尚ペーパークロマトグラフィーに於ける無機塩類の障害を可及的に避ける為に opt. pH の調節に緩衝液の使用は行わなかつた。

(3) **トリプシンによる酵素分解** 基質蛋白 2 g を蒸留水と良く混和しトリプシン（米国メルク社製品）200 mg を添加すると共に 0.1 N NaOH にて pH 8.0 とし全容を 100 cc とする。トルオールを加え綿栓して 37°, 7 日間消化を行い、その間一定時間毎に α -アミノ窒素、総窒素の定量を行い加水分解度を測定した。

尙対照試験として酵素分解に於けると同一条件で基質のみの場合及び酵素のみの場合について同様に操作して遊離アミノ酸の検出を行つたが、ペプシンのみの溶液の場合は Table III に示した如きアミノ酸が検出されたが、他の場合は遊離アミノ酸の呈色斑点は認められなかつた。

(4) **ペーパークロマトグラフィー塗布試料の調製** ペプシンによる酵素分解液の場合は、7 日間酵素分解を行つた液 10 cc をとり、発泡を防ぎ且蒸発を容易にする為にアルコール少量を加えて、室温の水浴上で減圧濃縮を数回繰返して可及的に塩酸を除去し、残留液を少量の重炭酸ナトリウムで中和し、次に 70 v % アルコール 4 cc を加え一夜放置してペーパークロマトグラフィーの障害となる未分解の蛋白、ポリペプチッド、無機塩等を沈澱せしめこれを遠心分離して除き、上澄液を室温の水浴上で減圧乾固せしめ、これに蒸留水 0.2 cc を加えて塗布試料とする。又トリプシンによる酵素分解液の場合は、酵素分解液 10 cc をとり先づ中和後、室温の水浴上で減圧乾固し 70 v % アルコール 4 cc を加えて以下同様にする。

(5) **二次元ペーパークロマトグラフィー** 沄紙（東洋沄紙 No. 131, 40 cm $\times$ 40 cm）上の原点（Fig. 1 の O）に前述の塗布試料をマイクロピペットを用いて 0.01 cc 塗布し、又 a 点にはロイシン、グリシン、b 点にはメチオニン、スレオニン、グルタミン酸の各標準アミノ酸溶液を塗布し乾燥後、A, B 部をクリップで止めて

気密容器中、0.1% アンモニア水 10% を添加したフェノールを溶媒として上昇法により約 20 時間展開する。次いで沄紙を取り出し風乾後、約 100~120° で加熱乾燥してフェノールを除き A' D' の線を切り標準アミノ酸部分だけをとる。次に c, d, e, f の各点に標準アミノ酸を夫々フェニールアラニン + バリン + ヒスチジン、ロイシン + スレオニン + アルギニン、チロジン + グリシン + アスパラギン酸、メチオニン + グルタミン + リジンの如くに塗布し、B, C 部をクリップで止めるメチデン・アニリン混液（9:1, 水を飽和）を溶媒として二次元展開を行う。沄紙を取り出し乾燥後、0.2% ニンヒドリン・ブタノール溶液（水飽和）を噴霧し約 90° で数分間均等に加熱してアミノ酸存在部分を呈色せしめた。各呈色部分が如何なるアミノ酸に基くかは Rf 値及び標準アミノ酸との比較により判定した。尚特にまぎらわしい場合は塗布試料に目的のアミノ酸の純品を加え、再度ペーパークロマトグラフィーを行い、その呈色斑点が一致するか否かを確かめた。

金沢大学薬学部

Fig. 1

Summary

Casein, ovalbumine, edestin, γ -globulin, and gelatin were decomposed with pepsin or trypsin and the kinds of amino acids liberated during the process and the degree of liberation, were examined by two-dimensional paper chromatography. The results, as shown in Table III, confirmed the fact that the amino acids liberated by pepsin or trypsin were not limited to few kinds but were of large variety and that the liberation of acidic amino acids, i.e. aspartic and glutamic acids, was higher in the case of pepsin than with trypsin. These were found of interest in connection with the specificity and cosubstrate effect of enzymic activity in the hydrolysis of proteins.

(Received December 2, 1952)