

魚類プロテアーゼに関する研究—VIII

ビンナガ鮪幽門垂プロテアーゼの酵素化学的性質—III

アセトン添加に依り該酵素溶液より生ずる沈澱量と

其の蛋白分解酵素的作用*

藤 井 実

Studies on the Protease of Fishes—VIII

On the Proteolytic and Chemical Properties of the Enzymes in Pyloric

Appendage of Long Fin Tuna *Thunnus alalunga*—III

Precipitation of Protease-compound in Enzyme Solution Extracted

from Powder of Pyloric Appendage of Long Fin Tuna by

Adding Acetone of Various Concentration and

Proteolytic Activity of that Precipitate

By

Minoru FUJII

By adding acetone of various concentration to the solution with proteolytic activity extracted from the powder of pyloric appendage of long fin tuna, nitrogen compounds in solution were graduated according to the range of acetone-concentration of each fraction;—40~50, 50~60 and 60~70%—; and the proteolytic activity and nitrogen content of each fraction were determined and results obtained are as follows:

Precipitates caused by acetone increase in proportion to the concentration of acetone, but the fraction of range of 50~60%—acetone is stronger in proteolytic activity per 1cc of enzyme solution and 1mg of nitrogen in precipitate than any other fraction.

前報告で明かな様に該鮪幽門垂より作られた蛋白分解酵素粗標品よりの水抽出液は強力なトリプシン様酵素力を示すが同液中には非酵素態蛋白及び非蛋白態窒素化合物を多量に含有している。従つて高単位の酵素力を有する純粹な酵素剤を得るためにはこれらを除去しなければならないのでその基礎実験として先づ酵素溶液に種々の条件下にアセトンを添加して沈澱を生成させた処、アセトンの濃度により其の沈澱生成量は異なり、且或るアセトン濃度分画区に於て蛋白態窒素 1mg 当りの蛋白分解酵素活力は最大になつた。

*水産講習所研究業績 第226号, 1957年7月25日 受理

実 験 の 部

1) アセトン添加による沈澱生成量及びその蛋白分解酵素的作用力。

酵素粗標品 0.5g に 20cc の磷酸緩衝液 (CHLARK a LUBS) を加えて 1 時間抽出を行つた酵素溶液 3cc に一定量の蒸留水及びアセトンを加えてアセトン濃度を夫々 30, 50, 60 及び 80% とすると沈澱を生ずる。同一濃度のアセトン液で数回洗滌した後沈澱を少量の pH 7 の液にとかして基質カゼイン溶液に添加し全反応液を pH 8.5 に調製した後所定の如く反応させてその作用力を測定した。又同時に別に同一条件で作つた夫々の沈澱を硫酸分解して窒素量を測定し第 1 表の様な結果を得た。尙酵素の抽出は常温で行うがその後はすべての使用溶液を氷水につけて 0°C の条件で操作した。

Table 1. Nitrogen-content in enzyme solution precipitated with acetone of various concentration and its proteolytic activity.

Acetone concentration (%)	30	50	60	80
Nitrogen content in precipitate (mg × 10 ⁻⁸)	106.5	226.3	244.4	618.9
Proteolytic activity (Nitrogen-mg × 10 ⁻⁸) / 1cc of enzyme solution	2968.8	7673.3	9968.3	10288.3
Proteolytic activity (Nitrogen-mg) / 1mg of nitrogen	28.0	33.9	40.1	16.6

第 1 表の結果から次のことが判つた。アセトンの濃度が増大するにつれて酵素溶液よりの沈澱生成量 (窒素量) も次第に増大し此の実験条件の範囲では約 80% の場合最大を示した。そして沈澱物のカゼインに対する分解力も酵素液 1cc 当りの作用力は 80% に於て最大であつた。しかるに窒素 1mg に対する作用力は逆に 60% 附近が最もよく 50% 及び 30% 濃度の場合がこれにつづき 80% の場合最低値を示した。以上のことから 80% では酵素態及び非酵素態化合物が共に最も多く沈澱することを示すが、60% 附近では非酵素態化合物の沈澱量は 80% の場合に比べて少く且酵素態化合物の沈澱量に対する割合もより減少している。従つて窒素 1mg 当りの作用力は逆に最強を示すことになつたのであろう。

2) アセトンによる酵素態窒素化合物の分画

一定量の酵素溶液にアセトンを添加して 30% とし此の時生じた沈澱の作用力及び窒素量を測定し次に此の沈澱を除去した濾液に更にアセトンを添加して全アセトン濃度を 60% とし、生じる沈澱を前同様に処理し再びその濾液にアセトンを添加して 80% とし生じた沈澱も前二者同様に処理して得た諸結果を示すと第 2 表の通りである。

第 2 表の結果から酵素液 1cc の酵素活力は 30~60% 分画が最も強く 60~80% 分画は之に次いで前者の約 80% の活性を示した。又窒素 1mg 当りの活性は 30~60% 分画が漸然他区を引き離して高値を示した。而して沈澱物中の窒素量は 60~80% 分画最も多く 30~60% 分画は 0~30% 分画と殆ど同じで 60~80% 分画の約 1/4~1/3 に過ぎない。以上の結果から酵素態化合物は 30~60% 分画に最も多く集つていることは明らかで 60~80% 分画には非酵素態化合物が著し

Table 2. Nitrogen-content in enzyme solution precipitated with acetone of various concentration and its proteolytic activity.

Range of acetone concentration of each fraction (%)	0~30	30~60	60~80
Nitrogen content in precipitate (mg $\times 10^{-8}$)	105.7	114.7	509.5
Proteolytic activity (Nitrogen-mg $\times 10^{-8}$) / 1cc of enzyme solution	3398.8	11171.9	8638.6
Proteolytic activity (Nitrogen-mg) / 1mg of nitrogen	32.2	97.4	16.9

いことがわかる。従つて此の結果に基いて更に60%アセトン濃度を中心により詳細な分画実験を行つた。即ち更に細かく10%宛の差異を有する分画を行い夫々の作用力を検した。酵素試料(1.5gの粗標品にpH8.5の緩衝液60ccを添加し抽出を行つたもの)10ccを用い先づアセトン濃度を40%としその時生ずる沈澱を除去しその濾液にアセトンを添加して50%とし生ずる沈澱をカゼイン基質に添加すること上述の方法と全く同様にして夫々アセトン濃度40~50, 50~60及び60~70%の分画を行い各区分に於ける沈澱の蛋白分解作用力を測定して第3表の様な結果を得た。

Table 3. Nitrogen-content in enzyme solution precipitated with acetone of various concentration and its proteolytic activity.

Range of acetone concentration of each fraction (%)	40~50	50~60	60~70
Nitrogen content in precipitate (mg $\times 10^{-8}$)	22.9	53.1	83.2
Proteolytic activity (Nitrogen-mg $\times 10^{-8}$) / 1cc of enzyme solution	1868.3	5352.3	5320.4
Proteolytic activity (Nitrogen-mg) / 1mg of nitrogen	84.6	100.8	63.9

即ち第3表の結果に依れば50~60%分画に於ける1ccの作用力及び窒素1mg当りの作用力は共に他の分画の夫より大で特に窒素1mg当りの作用力は100に達した。又1cc当りの作用力は50~60%分画及び60~70%分画共に殆んど差異がなかつたが、沈澱性窒素量では60~70%分画が約60%以上も多いため1mg当りの作用力は逆に50~60%分画に比べて60%以下に低下した。即ち50~60%分画に於ける窒素化合物は他区よりも酵素態化合物を豊富に含有していることは明かである。又40~50%分画に於ける沈澱性窒素量は他分画の夫に比べて最も少いにも拘らず、酵素態窒素化合物を比較的豊富に含有している。

総 括

ビンナガ鮪幽門垂粉末粗標品の水抽出液にアセトンを添加して種々のアセトン濃度溶液を作りプロテアーゼの分画試験を行い次の結果を得た。

1) アセトン添加による酵素抽出液よりの沈澱窒素生成物はアセトン濃度の増加に伴い増加し実験の範囲では80%で最高に達した。併し沈澱性窒素 1 mg 当りの作用力は 60%の場合最高値を示した。

2) 更に各分画における沈澱性窒素生成物とプロテアーゼ作用力の関係を求めた所、50~60%分画に於いては酵素液 1cc 及び沈澱性窒素 1mg 当りの作用力は他の分画のいづれよりも大で窒素 1mg 当りの作用力は 100 に達した。又酵素液 1cc 当りの作用力は 50~60%及び 60~70%両分画共に殆んど差異がなかつたが、60~70%分画では非酵素態窒素がはるかに多いために窒素 1 mg 当りの作用力は逆に 50~60%分画の 60%以下に低下した。又40~50%分画に於いては酵素液 1cc 当りの作用力は他分画に比べて非常に低い値を示したが沈澱性窒素 1 mg 当りの作用力は50~60%分画のそれに次いでその80%以上に及ぶ値を示した。此の稿を終るに当り実験の一部を担当された立川成章君に深謝する。本研究は農林省水産講習所後援会研究費によつたことを附記し感謝の意を表します。(尙此の論文の大要は昭和31年9月の日本水産学会秋季大会(広島市)に於いて発表した。