

数種のイカ肝臓粗酵素液中のプロテアーゼ活性*¹幡手英雄*²・雨乞裕樹*²・高橋 淳*²Proteolytic Activity in Crude Enzyme Extracts from Livers of Squids and Cuttlefish*¹Hideo Hatate*², Hiroki Amagoi*², and Jyun Takahashi*²

The crude enzyme extract was found to be successfully recovered from the liver homogenate of Japanese common squid *Todarodes pacificus* using cooled acetone (-20°C) for the removal of liver lipid, and 0.05 M sodium acetate buffer (pH 4.0) for the protease extraction from its acetone powder. Among the Japanese common squid, flying squid *Ommastrephes bartrami*, arrow squid *Loligo bleekeri*, cuttlefish *Sepia esculenta*, and diamondback squid *Thysanoteuthis rhombus*, the crude enzyme extract from the diamondback squid showed the highest proteolytic activity at both pH 4.0 and 7.0. Especially, its activity at pH 7.0 was 2.4-7.6 times higher than those of the other species, although all of the enzyme extracts showed higher activity at pH 4.0. It is also suggested that the crude enzyme extract from diamondback squid contains at least three kinds of proteases based on SP-Sephadex C-25 ion-exchange chromatography.

1 緒言

イカ肝臓や筋肉中の種々の酵素に関する研究は古くから行われており、一部のプロテアーゼ¹⁻⁸⁾については基質特異性、化学構造あるいは精製方法などが報告されている。しかし、精製操作の前段階で、酵素の回収量に重要な影響を及ぼす肝臓からの粗酵素の調製方法についてはあまり検討されていない。一方、食品を初めとしてバイオ技術の各分野において酵素の利用が盛んであり、その酵素は微生物由来のものが多い。しかし、イカ肝臓の酵素は微生物源酵素と比べ、活性の

強さ、基質特異性や原料の価格などの面で対抗できるものと考えられる^{9, 10)}。しかも食品衛生上の高い安全性が保証されており、外套筋と肝臓のホモジェネートを自己消化させることで、高血圧予防効果のあるペプチドが生成されることも最近報告されている¹¹⁾。このような機能性食品としての有効性をもつイカ肝臓由来の酵素は、少なくとも食品加工に使用される場合、微生物源酵素よりも好ましい印象を与える。このような状況において、本研究ではイカ肝臓を重要な酵素源と考え、イカ肝臓からの酵素の抽出方法やイカの種類

水産大学校研究業績 第1604号, 1998年10月9日受付。

Contribution from National Fisheries University, No.1604. Received Oct. 9, 1998.

*1 平成6年8月日本水産学会中国・四国支部例会(下関)にて発表。

*2 水産大学校食品化学科(Department of Food Science and Technology, National Fisheries University)。

による酵素活性の違いなどを、前述したようにイカ肝臓酵素のなかでもよく研究されているプロテアーゼを対象酵素として検討した。

2 実験材料と方法

2.1 実験材料

下関近郊で漁獲された新鮮なスルメイカ *Todarodes pacificus* (5個体, 平均体重 540 g, 平均肝臓重量 67 g), アカイカ *Ommastrephes bartrami* (3個体, 平均体重 335 g, 平均肝臓重量 9 g), ヤリイカ *Loligo bleekeri* (3個体, 平均体重 127 g, 平均肝臓重量 4 g), コウイカ *Sepia esculenta* (3個体, 平均体重 510 g, 平均肝臓重量 30 g) およびソデイカ *Thysanoteuthis rhombus* (1個体, 体重 4.0kg, 肝臓重量 650 g) を使用した。これらのイカから肝臓を摘出して -20°C で凍結保存し, 必要に応じて解凍し, ホモジェネートにして実験に用いた。

2.2 イカ肝臓ホモジェネートからの粗酵素液の調製

2.2.1 粗酵素液 A

イカ肝臓ホモジェネートに15倍容の冷却アセトン (-20°C) を加え, ユニバーサルホモジェナイザー (シルバーマシン社製) で3分間ホモジェナイズした。このホモジェネートを吸引ろ過しながら冷却アセトンで数回, さらに冷却エーテルで洗浄した。残存した固形分を減圧下で乾固してイカ肝臓ホモジェネートのアセトン粉末を調製した。各種イカ肝臓からのアセトン粉末の回収率は10~25% (w/w) であった。これに0.05M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) または0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0または9.0) を少量加え, 十分に攪拌した後, 遠心分離 (10,000×g, 4°C , 20min) した。上澄液を回収した後, 残存した沈殿にも同様の操

作を行い, 再び上澄液を回収し, 先の上澄液と合わせた溶液を粗酵素液 A とした。

2.2.2 粗酵素液 B

スルメイカ肝臓ホモジェネートをその3倍容の0.9% NaClを含む0.1M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) あるいは0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0または9.0) で3分間ホモジェナイズした後, ガーゼでろ過した。ろ液を遠心分離 (10,000×g, 4°C , 60min) し, 上濁液をセライト535 (和光純薬工業製) で吸引ろ過し, ろ液を粗酵素液 B とした⁴⁾。

2.3 イカ肝臓粗酵素液のプロテアーゼ活性の測定

ヘモグロビン (ウシ血液) およびカゼインの2%溶液を基質としてプロテアーゼ活性を測定した¹²⁾。すなわち, 基質溶液 2 ml に粗酵素液 0.2 ml を加えて 37°C で30分間酵素反応させ, 5%トリクロル酢酸溶液 5 ml を加えて反応を止めた。60分間放置後, 未消化タンパク質をろ紙で除き, ろ液中に含まれるタンパク質の分解生成物をLowryらの方法¹³⁾により測定した。この反応条件を基本としたが, 酵素活性の強さに応じて粗酵素液量や酵素反応時間を変えた。1分間にチロシン 1 μmol 相当の基質を分解する酵素量を 1 unit と定義した¹⁴⁾。

2.4 ソデイカ肝臓プロテアーゼのSP-Sephadex C-25イオン交換クロマト法による分離

ソデイカ肝臓ホモジェネートから調製した粗酵素液 A に50%飽和になるように固形の硫酸アンモニウムを加え, 4°C で12時間放置して塩析処理した。生成した沈殿を遠心分離 (10,000×g, 4°C , 20min) で回収し, 0.01M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.4) で溶解した。この溶液を0.01M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.4) で平衡化しておいたSP-Sephadex C-25カラム (内径 2 cm×長さ40cm) で0~0.8M NaCl までの直線密度勾

配法を用いて分離した（流速 1.1ml/min）。溶出液については280nmの吸光度およびpH4.0と7.0におけるプロテアーゼ活性を測定した。

なお、各種試料のタンパク質量は、必要に応じてLowryらの方法¹³⁾によりウシ血清アルブミンを標準タンパク質として定量した。

3 結果と考察

3.1 スルメイカ肝臓由来の粗酵素液のプロテアーゼ活性

イカ肝臓からの粗酵素液の効率的な調製方法をスルメイカ肝臓を用いて検討した。イカ肝臓には多量の脂質成分⁹⁾が含まれているので、粗酵素液の調製さらに酵素の分離精製を進めるには脱脂操作が必要である。また、酵素の回収量に重大な影響を及ぼす抽出溶液のpHについても併せて検討した。粗酵素液のプロテアーゼ活性は既往の論文¹⁻⁶⁾を参考にしてpH4.0と7.0で測定し、イカ肝臓1g当たりの酵素量（unit）でプロテアーゼの回収量を評価した。

スルメイカ肝臓ホモジネートのアセトン粉末からpH4.0、7.0および9.0の緩衝液で抽出された粗酵素液Aとアセトン処理せずに同じpHの緩衝液で抽出した後、セライト535で脱脂された粗酵素液Bのプロテアーゼ活性を比較した（Fig. 1）。

粗酵素液A、Bのプロテアーゼ活性はpH4.0の酸性域の基質溶液で高かった。さらに、pH4.0の緩衝液で抽出された粗酵素液A、Bの酵素活性は、pH7.0あるいは9.0で抽出されたものより有意に高く、pH4.0の緩衝液がプロテアーゼの抽出に適していることがわかった。また、粗酵素液Aのプロテアーゼ活性は粗酵素液Bに比べて相対的に高く、イカ肝臓の脱脂に冷却アセトンを使用すれば効率よくプロテアーゼが回収されるものと思われる。しかしながら、脂質除去にセライトを用いて調製された粗酵素液Bにもプロテアーゼはある程度回収されており、プロテアーゼ以外の粗酵素の回収にはセライトが優れた効果を示す可能性もある。少なくともプロテアーゼ粗酵素液をイカ肝臓ホモジ

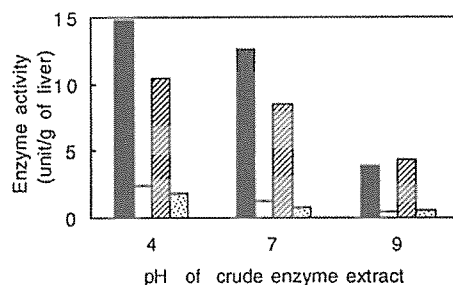


Fig. 1. Proteolytic activity in the crude enzyme extracts A* and B** prepared from the liver homogenate of Japanese common squid *Todarodes pacificus*.

Proteolytic activity of the crude enzyme extracts A and B was measured at pH 4.0 and 7.0, respectively. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that liberated to 1 μ mol of tyrosine per min.

* Extract A: Squid liver homogenate was defatted with a cooled acetone (-20°C) and dried completely under reduced pressure. Then the crude enzyme was extracted from the acetone powder of the homogenate, by each of the buffer solutions such as 0.05 M sodium acetate buffer (pH 4.0) and 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0 and 9.0).

** Extract B: The crude enzyme was extracted from squid liver homogenate by each of the buffer solutions such as 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.0) and 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0 and 9.0). Then the extract was defatted by using a Celite 535.

Extract A: ■ Activity at pH 4.0,
□ Activity at pH 7.0;

Extract B: ▨ Activity at pH 4.0,
▩ Activity at pH 7.0.

ネートから調製する場合は、アセトンで脱脂後、pH4.0の緩衝液を用いて粗酵素液を抽出するほうが、より効率的にイカ肝臓のプロテアーゼを回収できるものと判断し、以降の実験では粗酵素液A（pH4.0抽出）を用いた。なお、イカ肝臓をアセトン処理すると肝油成分を効率よく回収でき、副次的にEPAやDHAなどの有効な脂質成分の原料^{9, 10)}としてアセトン抽出物を再利用することも可能である。

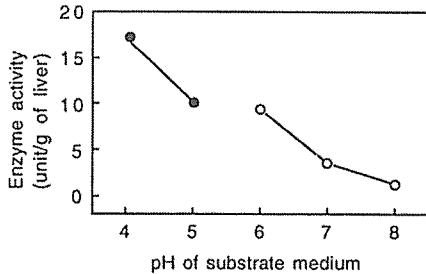


Fig. 2. Proteolytic activity in the crude enzyme extract A* at various pHs of substrate media.
*Extract A: The crude enzyme of the liver homogenate of Japanese common squid was extracted from its acetone powder by using 0.05 M sodium acetate buffer (pH 4.0).
pH 4.0, 5.0: 2% hemoglobin in 0.1 M sodium acetate buffer; pH 6.0, 7.0, 8.0: 2% casein in 0.1 M phosphate buffer.

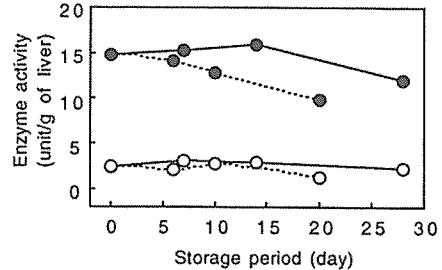


Fig. 3. Stability of proteolytic activity in the crude enzyme extract A* during storage at 4 and -20°C.
*Extract A: Refer to Fig. 2.
4°C: ●—●— Activity at pH 4.0,
○—○— Activity at pH 7.0;
-20°C: ●—●— Activity at pH 4.0,
○—○— Activity at pH 7.0.

Fig. 2に粗酵素液Aのプロテアーゼ活性のpH依存性を示している。スルメイカ肝臓には酸性域に強い活性を示す酸性プロテアーゼの存在が知られており¹⁻⁵⁾、本実験で調製した粗酵素液Aの活性も、調べた中でpH4.0で活性が最も強かった。

対象とする酵素の安定性はそれを実際に利用するうえで最も重要な要因の一つである。そこで、粗酵素液Aに存在するプロテアーゼの安定性を調べるために、4および-20°Cに貯蔵した粗酵素液Aの酵素活性を経日的に測定した。Fig. 3に示しているように、-20°Cで凍結したほうがプロテアーゼ活性を長期間維持できるが、4°Cでも1週間以上は高い活性を維持できることがわかった。なお、データは示していないが、アセトン粉末の状態では-20°Cに貯蔵すれば、3か月以上プロテアーゼ活性の有意な変化はなかった。

スルメイカの肝臓と緩衝液(pH3.0~6.0)とのホモジェネートを50°C前後で自己消化させると、一部のプロテアーゼ活性が増強されることが報告されている^{1,2)}。特定の酵素を回収するにはこのような操作も有効である。しかし、イカ肝臓が酵素源として広く利

用されるためには、酵素活性が高いだけでなく、漁獲後の輸送や貯蔵中においても一定水準の酵素活性を保った安定な原料であることが必要である。そこで、イカ肝臓の鮮度と酵素回収量との関係を検討した。すなわち、イカ肝臓の鮮度を低下させるために、新鮮なスルメイカ肝臓ホモジェネートを4°Cの冷蔵庫に放置し、その一部から経日的に粗酵素液Aを調製し、それらのプロテアーゼ活性変化を調べた(Fig. 4)。

4°Cで7日間放置してもプロテアーゼ活性に大きな変化はなく、低温で保存すれば鮮度低下がある程度進行しても、イカ肝臓をプロテアーゼの原料として使用できることが示唆された。また、データは示していないが、-25°Cでまるのまま凍結貯蔵したスルメイカの肝臓は1年間以上もプロテアーゼ活性の有意な変化を受けなかった。このことからイカ肝臓は酵素の安定な供給源と判断される。

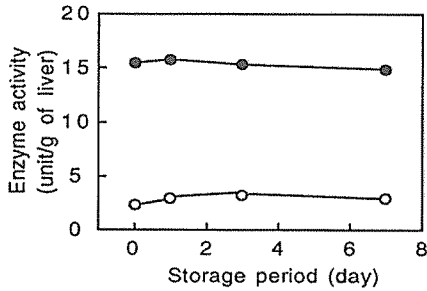


Fig. 4. Proteolytic activity in the crude enzyme extract A* from the liver homogenates stored at 4°C for various elapse periods.

*Extract A: Refer to Fig. 2.

●— Activity at pH 4.0, ○— Activity at pH 7.0.

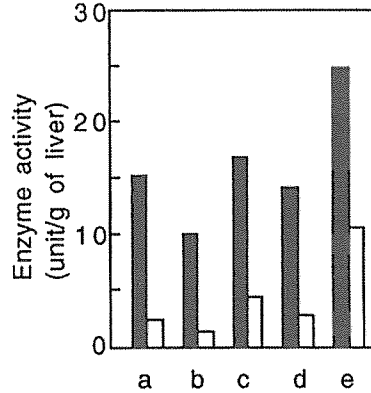


Fig. 5. Proteolytic activity in the crude enzyme extract A* from each of the liver homogenates of Japanese common squid (a), flying squid *Ommastrephes bartrami* (b), arrow squid *Loligo bleekeri* (c), cuttlefish *Sepia esculenta* (d), and diamondback squid *Thysanoteuthis rhombus* (e).

*Extract A: Refer to Fig. 2.

■ Activity at pH 4.0, □ Activity at pH 7.0.

3. 2 各種イカ肝臓由来の粗酵素液のプロテアーゼ活性

アカイカ、ヤリイカ、コウイカおよびソデイカの肝臓ホモジェネートからも前記のスルメイカで行った方法で粗酵素液Aを調製し、pH4.0の酸性域および中性でのプロテアーゼ活性を測定した (Fig. 5)。イカ肝臓のプロテアーゼ活性の強さは種によって異なっていたが、いずれのイカにおいても酸性域で活性が高く、肝臓1g当たりpH4.0では15~25units、pH7.0では1.7~10unitsを示した。ソデイカ肝臓は分析した種の中で最高のプロテアーゼ活性を示し、特にpH7.0でのプロテアーゼ活性は他のイカに比べ2.4~7.6倍も高かった。しかしながら、本実験で供試したイカは下関沿岸の限定された海域で漁獲されたものである。イカの成長程度、漁場や漁期などによって肝臓重量は変化することが知られており⁹⁾、それにとまって各種のイカ肝臓プロテアーゼ活性が今回得られた結果とは異なる場合も考えられる。

3. 3 ソデイカ肝臓のプロテアーゼの分離

pH4.0の酸性域および中性でともに強いプロテアーゼ活性を示したソデイカのプロテアーゼ成分の分離を試みた。ソデイカ肝臓ホモジェネート4.5gから調製した粗酵素液Aを、塩析処理することによって520mg相当のタンパク質成分が回収された。この成分のSP-Sephadex C-25クロマトグラムをFig. 6に示している。溶出位置やプロテアーゼ活性のpH依存性の異なるI、IIおよびIIIの3画分が確認された。SP-Sephadex C-25に吸着されずに溶出されたI画分にはpH4.0の酸性域と中性で活性をもつ2種のプロテアーゼが混在している可能性もあるが、少なくとも3種類のプロテアーゼの存在が示唆された。II画分は酸性域で高い活性を、III画分は酸性域では活性が低く、中性で高い活性を発現した。このようにソデイカ肝臓にはpH4.0の酸性域だけでなく、中性においても有意の活性をもつプロテアーゼの存在が確認された。イカ肝臓には各種カテプシンが存在していることが報告されて

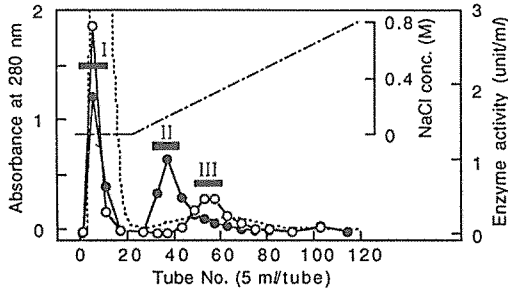


Fig. 6. SP-Sephadex C-25 ion-exchange chromatogram of the crude enzyme extract A* from the liver homogenate of diamondback squid after salting by ammonium sulfate.
* Extract A: Refer to Figs. 2 and 5.
..... Absorbance at 280 nm, ●—Activity at pH 4.0, ○—Activity at pH 7.0.

おり^{4, 5, 15)}, 今後, ソデイカ肝臓のプロテアーゼの単離を進め, 酵素化学的な観点からも検討する予定である。

4 要約

本研究ではイカ肝臓を重要な酵素源と考え, イカ肝臓からの酵素の抽出方法やイカの種類による酵素活性の違いなどを, プロテアーゼを対象酵素として検討した。結果は以下の通りである。

1. スルメイカ肝臓ホモジェネートを冷却アセトンで脱脂した後にpH4.0の緩衝液を用いて粗酵素液を抽出すれば効率的にプロテアーゼが回収された。
2. スルメイカ肝臓の粗酵素液は中性よりも酸性域(pH4.0)で強いプロテアーゼ活性を発現し, 粗酵素液を4および-20℃に貯蔵すれば, それぞれ1および2週間以上プロテアーゼ活性を維持した。
3. 新鮮なスルメイカ肝臓ホモジェネートとそれを4℃で7日間放置したものとでプロテアーゼの回収量に大差はなく, イカ肝臓は酵素の安定な供給源であるものと判断された。

4. スルメイカ, アカイカ, ヤリイカ, コウイカおよびソデイカの肝臓粗酵素液のプロテアーゼ活性を比較・検討した。イカ肝臓のプロテアーゼ活性の強さは種によって異なっていたが, いずれのイカにおいてもpH4.0の酸性域で活性が強く, 肝臓1g当たりpH4.0では15~25units, pH7.0では1.7~10unitsを示した。ソデイカ肝臓は分析種のみで最強のプロテアーゼ活性を示し, 特にpH7.0でのプロテアーゼ活性は他のイカに比べ2.4~7.6倍も高かった。
5. ソデイカ肝臓のプロテアーゼ成分をSP-Sephadex C-25クロマト法で分離し, 少なくとも3種類のプロテアーゼが存在していることが示唆された。

以上の結果は, イカ肝臓がプロテアーゼの酵素源として利用できる可能性を示唆する。

文 献

- 1) 高橋 喬: 日水誌, 20, 500-503 (1960).
- 2) 高橋 喬: 日水誌, 26, 504-507 (1960).
- 3) 高橋 喬: 日水誌, 27, 85-90 (1961).
- 4) T. Inaba, N. Shindo, and M. Fujii: *Agr. Biol. Chem.*, 40, 1159-1165 (1976).
- 5) K. S. Hameed and N. F. Haard: *Comp. Biochem. Physiol.*, 82B, 241-246 (1985).
- 6) E. L. Leblanc and T. A. Gill: *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B, 201-202 (1982).
- 7) G. Rodger, R. B. Weddle, P. Craig, and R. Hastings: *J. Food Sci.*, 49, 117-119 (1984).
- 8) Y. Okamoto, H. Otsuka-Fuchino, S. Horiuchi, T. Tamiya, J. J. Matsumoto, and T. Tsuchiya: *Biochim. Biophys. Acta.*, 1161, 91-104 (1993).
- 9) 須山三千三・鴻巣章二・浜部基次・奥田行雄: イカの利用, 改訂版, 恒星社厚生閣 (1973), pp. 80-104.
- 10) 幡手英雄: *JAMARC*, 43(1), 36-39 (1994).
- 11) Y. Wako, S. Ishikawa, and K. Muramoto: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 1353-1355 (1996).

- 12) 赤堀四郎 : 酵素研究法 2, 第 7 版, 朝倉書店, 東京, 1966, pp. 240-242.
- 13) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 14) K. Hara, T. Takeda, K. Sakai, and T. Ishihara : *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 1295-1300 (1987).
- 15) 牧之段保夫・中川孝之・藤田眞夫 : 日水誌, **59**, 1625-1629 (1993).