



Title	カニ中腸腺の蛋白質分解酵素
Author(s)	伊藤, 裕三; 小沢, 成子; 帆保, 圀雄
Citation	北海道教育大学紀要. 第二部. A, 数学・物理学・化学・工学編, 21(2) : 66-72
Issue Date	1971-02
URL	<a href="http://s-ir.sap.hokkyodai.ac.jp/dspace/handle/123456789/5931">http://s-ir.sap.hokkyodai.ac.jp/dspace/handle/123456789/5931</a>
Rights	

## 種々のカニ類中腸腺の蛋白質分解酵素

## I. カラムクロマトグラフィーと電気泳動\*

伊藤 裕三・小沢 成子・帆保 罔雄

北海道教育大学釧路分校化学教室

Proteolytic Enzyme from the Hepatopancreas of Various Crabs.

## I. Column Chromatography and Electrophoresis

Yasuzo ITO, Shigeko OZAWA and Kunio HOB0

Chemical Laboratory, Kushiro Branch, Hokkaido University of Education

## Abstract

The physical and chemical properties of mammalian trypsins have been well defined.

This report deals with the chromatography done by a Sephadex G-50, DEAE-Sephadex A-25 and CM-Sephadex C-25 and with a disc- and acetyl cellulose membrane-electrophoresis of the purified proteolytic enzyme isolated from the hepatopancreas of various crabs (*Paralithodes camtschatica* (Tilesius), *Paralithodes brevipes* (H. Milve Edwardes et Lucas), and *Erimacrus isenbeckii* (Brandt)).

## 緒 論

陸棲哺乳動物、特に高等動物の trypsin, chymotrypsin 等の物理的、化学的諸性質は古くから多くの研究者達によって詳細に研究され報告された。また、水棲哺乳動物の鯨の膵臓の trypsin, chymotrypsin については、松岡・小出等<sup>1)</sup>の一連の研究があり、その諸性質及び既知哺乳動物の trypsin, chymotrypsin の性質との比較結果も報告された。更にまた、魚類について各臓器中の蛋白質分解酵素について新井<sup>2)</sup>、大城<sup>3)</sup>、小出<sup>4)</sup>等により討論された。一方無脊椎動物のアメリカザリガニ (*Procambarus clarki* (GIRARD)) の中腸腺の trypsin-様酵素の分離精製は矢後<sup>5)</sup>により、また crayfish (*Oreonectes virilis*) の hepatopancreas 中の trypsin-様酵素の詳細な研究は R. Zwillling<sup>6)</sup>等によって行なわれ、この酵素の哺乳動物の trypsin の性質との比較検討もなされた。更にまた、エビ (*Penaeus setiferus*) の hepatopancreas 中の trypsin-様酵素についての精製及び哺乳動物の trypsin の性質との比較は B. T. Gates<sup>7)</sup>等によって速報された。更に、無脊椎動物の昆虫、微生物類の trypsin-様酵素についても報告された<sup>8)</sup>。

著者等は、1964年以來、甲殻類特にタラバガニ (*Paralithodes camtschatica* (Tilesius)) の中腸腺中に含まれる蛋白質分解酵素について研究を行ない、その酵素を結晶状に分離し、二、三の性質について報告した<sup>9)</sup>。更に、ハナサキガニ (*Paralithodes brevipes* (H. Milve Edwardes et Lucas)),

\* この報告の一部は、日本化学会北海道支部大会・函館 (昭和43年7月) に於いて発表した。

ケガニ (*Erimacrus isenbeckii* (Brandt)) の中腸腺中に含まれる蛋白質分解酵素をタラバガニの場合と全く同一の条件で分離精製し、得られた酵素のカゼインに対する分解の様子をフィンガープリント法で検討し、これら三種類の酵素について比較を行なった<sup>10)</sup>。

この報告はハナサキガニ及びケガニの中腸腺中に含まれる蛋白質分解酵素を従来通りの方法でアセトン粉末としたものを試料とし、セファデックス G-50, DEAE-セファデックス A-25 及び CM-セファデックス C-25 のカラムクロマトグラフィーの結果と、アセチルセルロース膜電気泳動及びディスク電気泳動の結果について述べたものである。比較対照としてカラムクロマトグラフィーではタラバガニより精製したアセトン粉末を、また、ディスク電気泳動には市販の trypsin を用いた。

### 実験試料及び方法

ハナサキガニ (*Paralithodes brevipes* (H. Mwardes et Lucus)) 及びケガニ (*Erimacrus isenbeckii* (Brandt)) は1968年9月から10月にかけて白糠町沖で漁獲されたもので、水揚げ後直ちにドライアイスで凍結して研究室に持ち帰り中腸腺を採取し、再びドライアイスで急速に  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結貯蔵したものである。アセトン粉末にまで調製する方法は、タラバガニについて既に報告した<sup>9)</sup>方法と全く同一の操作によった。即ち、中腸腺に3倍量の M/15 リン酸緩衝液 (pH 6.8~7.2) を加え24~48時間  $10^{\circ}\text{C}$  以下で抽出、次いで酢酸鉛処理、硫酸分別、アセトン分別を行なって得たものである。このようにして得られた標品はタラバガニのものとはほぼ同一の活性を有していた。この標品を今回の実験試料として用いた。タラバガニ (*Paralithodes camtschatica* (Tilesius)) の酵素は当研究室で先に調製した標品を用いた。trypsin は Merck 製品を用いた。

**酵素活性の測定**；Kunitz のカゼイン消化法を用い、 $280\text{m}\mu$  の吸光度で求めた。即ち、M/15 リン酸緩衝液に溶かした酵素液 1 ml に1% カゼイン (pH 6.8)-M/15 リン酸緩衝液 1 ml を加え  $37^{\circ}\text{C}$  で10分間反応を行なった。次に  $0.44\text{M}$  三塩化酢酸 5 ml を加え、室温で数時間放置後濾過し、その濾液の  $280\text{m}\mu$  における吸光度を求めた。酵素の比活性は酵素蛋白質 1 mg 当り  $280\text{m}\mu$  で1分間に变化した吸光度で表わした。吸光度の測定は日立製分光光度計 139にて測定した。

**蛋白質の定量**；マイクロケルダール法及び  $280\text{m}\mu$  における吸光度から求めた。

**アセチルセルロース膜電気泳動**；Jōkō Sangyo Co. Ltd. 製 Separax を用い、ベロナール緩衝液 (pH 8.6 及び 8.0)、リン酸緩衝液 (pH 7.0) 及びクエン酸緩衝液 (pH 6.0) で行なった。

**ディスク電気泳動**；ミツミ科学産業株式会社製の装置を用い、トリス-グリシン緩衝液 (pH 8.3) で行なった。

**カラムクロマトグラフィー用カラムの調製**；セファデックス G-50 ( $0.8 \times 20\text{cm}$ ) は予め M/15 リン酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡に保った後に用いた。溶出は M/15 リン酸緩衝液 (pH 6.8) で20分間に 5 ml の流出速度で行ない、溶出液の蛋白質は、 $280\text{m}\mu$  の吸光度を日立製分光光度計で測定し、酵素活性は溶出液の 1 ml を用いて前述の方法で測定した。DEAE-セファデックス A-25 及び CM-セファデックス C-25 はセファデックス G-50 と同様に M/15 リン酸緩衝液で平衡にさせた後に用いた。カラムからの溶出はリン酸緩衝液 (pH 6.8) 及びこれに順次食塩を加えて行なった。蛋白質の定量及び酵素活性の測定はセファデックス G-50 のときと同様である。

**カラムクロマトグラフィー**；試料の一定量を M/15 リン酸緩衝液に溶かしその全量をまずセファデックス G-50 のカラムに供した。溶出液中の活性区分を集め、低温で減圧濃縮し、その濃縮液を DEAE-セファデックス A-25 に供した。前記同様溶出液中の活性区分を集めて濃縮し、更に CM-セファデックス C-25 に供した。

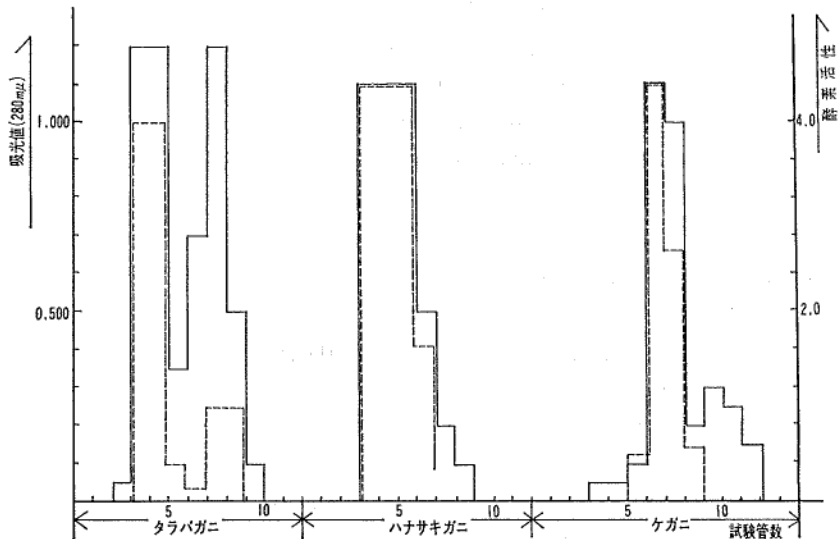
## 実験結果並びに考察

本実験に供した三種のカニの標品の詳細は第1表に見る通りである。第1表から、アセトン分別で得たタラバガニの酵素は、9.3 mg, 比活性 21.6 unit/mg protein, ハナサキガニの酵素は 10.4 mg, 比活性 20.9 unit/mg protein, ケガニの酵素は 9.3 mg, 比活性 18.9 unit/mg protein であって、ほぼ同程度の活性を有するものであった。またこの標品はアセチルセルロース膜電気泳動及びディスク電気泳動で共に単一であることが示された。この結果は第4図、及び第5図に示した。

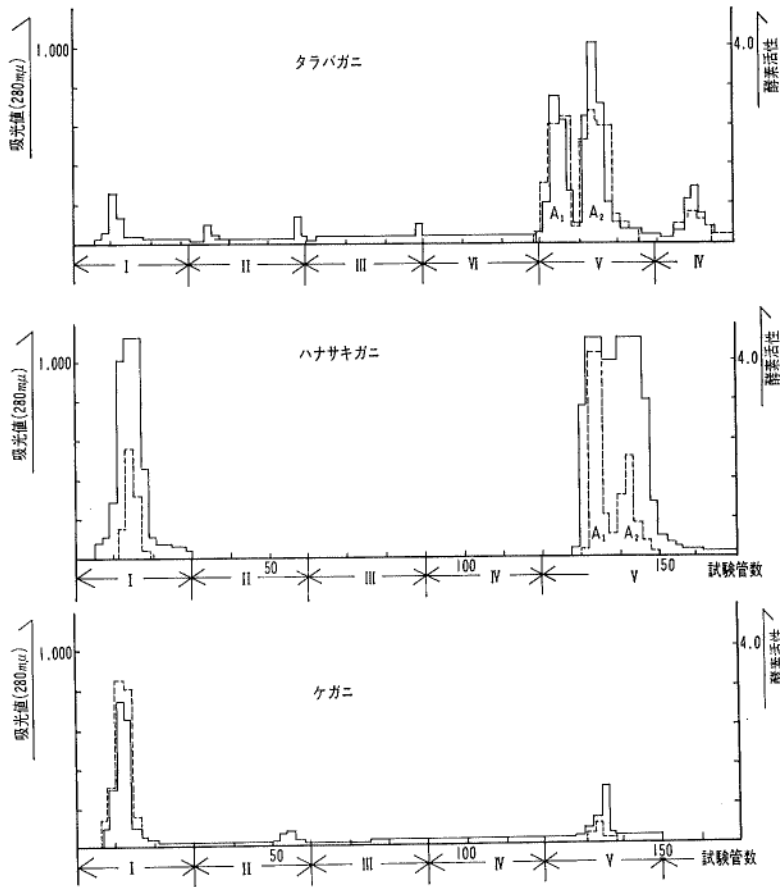
セファデックス G-50, DEAE-セファデックス A 25 及び CM-セファデックス C-25 の結果は夫々第1図、第2図及び第3図に示した。第1図から第3図までに示した結果から、タラバガニとケガニではセファデックス G-50 では二成分に分かれたが酵素活性の大部分は最初に溶出される区分に認められた。ハナサキガニでは一成分のみであった。DEAE-セファデックス A-25 カラムではケガニはそのまま通過してしまったが、タラバガニでは溶出液の食塩濃度 0.3~0.4 M で溶出された。ハナサキガニではそのまま通過する区分と食塩濃度 0.3 M で溶出される区分とが認められ、そのまま通過する区分と 0.3 M で溶出される両方の区分に酵素活性が認められた。尚タラバガニ及びハナサキガニの場合 0.3 M で溶出した区分は更に二区分に分かれたので、いずれの場合も最初の区分を  $A_1$ 、後の区分を  $A_2$  とした。

以上の結果から電荷を替えた CM-セファデックス C-25 では反対の現象が認められるのではないかと考えたが、三種のカニの酵素は全部そのまま通過した。

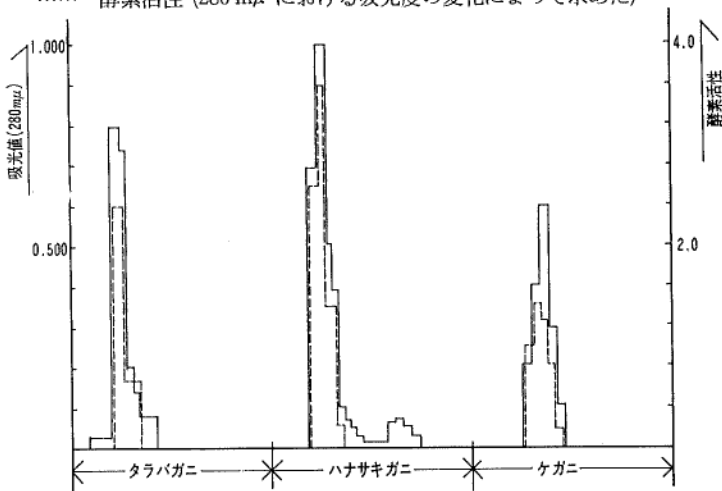
カラムクロマトグラフィーに供した試料の酵素活性を 100 としたときの各カラムクロマトグラフ



第1図 各種カニ酵素のセファデックス G-50, カラムクロマトグラフィー  
セファデックス G-50 カラム 1.5×30 cm, M/15 リン酸緩衝液で平衡 (pH 6.8), 緩衝液で溶出  
— 蛋白質  
..... 酵素活性 (280 mμ における吸光度の変化によって求めた)



第2図 各種カニ酵素の DEAE-セファデックス A-25, カラムクロマトグラフィー DEAE-セファデックス A-25 カラム 1.2×30 cm, 緩衝液で溶出  
 — 蛋白質  
 ..... 酵素活性 (280 mμ における吸光度の変化によって求めた)



第3図 各種カニ酵素の CM-セファデックス C 25 カラムクロマトグラフィー CM-セファデックス C 25 カラム 1.2×30 cm, 緩衝液で溶出  
 — 蛋白質  
 ..... 酵素活性 (280 mμ における吸光度の変化によって求めた)

イ後の相対的活性は第2表に示した。

アセチルセルロース膜電気泳動の結果は第4図に示した。試料はセファデックス G-50 に供したのと同じのもので、泳動条件は 0.4 mA/cm, 30~40 volt/cm 5 分間であった。染色はボンソー 3R-三塩化酢酸溶液を用いた。第4図に示した結果からは三種とも単一成分から出来ているように考えられ、

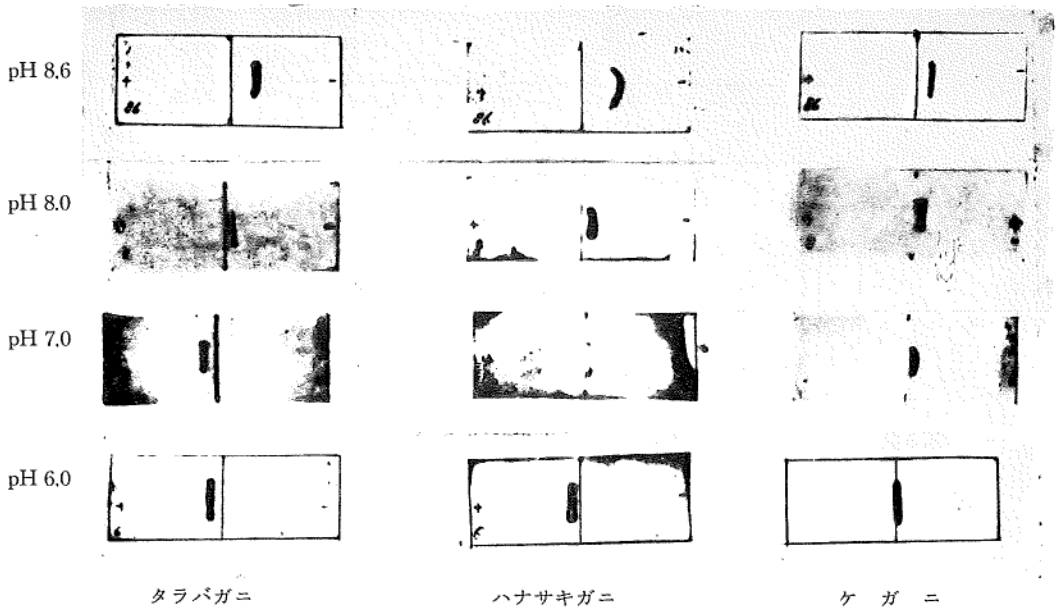
三種間の電荷の差は タラバガニ, ハナサキガニは類似し, ケガニが多少異なっていると考えられる。

ディスク電気泳動の結果は第5図に示した。市販の Merck 製 trypsin を対照として用いた。こ

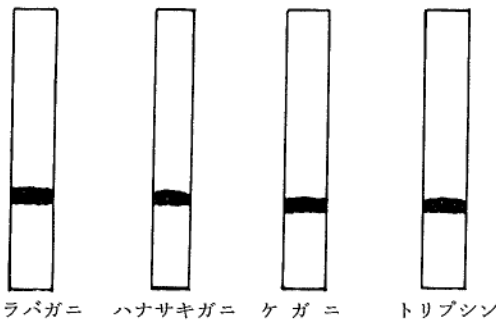
第2表 各クロマトグラフィーからの酵素の相対的活性

種類	相 対 的 活 性		
	カラムに供する前	セファデックス G-50	セファデックス A-25
タラバガニ	100	127.31	137.90 (A <sub>1</sub> )* 108.33 (A <sub>2</sub> )*
ハナサキガニ	100	154.07	135.41 (A <sub>1</sub> )* 47.85 (A <sub>2</sub> )*
ケガニ	100	85.61	63.72

\* 第2図参照



第4図 各種カニ酵素のアセチルセルロース膜電気泳動  
泳動条件 0.4 mA/cm, 30~40 Volt/cm, 5 分間



第5図 各種カニ酵素のディスク電気泳動  
泳動条件 pH 8.6 ゲル, 8 mA/ゲル, 250 V, 30 分間

の結果三種とも単一成分から出来ていることが認められた。pH 8.6 ゲルを使用して、永井の記載<sup>11)</sup>の条件と同じにして泳動を行なった。尚 trypsin によく用いられる pH 4.0 ゲルをも試みたが、ゲルの調製を改良したので永井の報告<sup>11)</sup>とは比較出来なかつた。またタラバガニとケガニを混合して試料とし同一条件で泳動を行なったが、アセチルセルロース膜の場合と異なり両者は分離せず一つの成分のみしか現われなかつた。ディスク電気泳動用の pH 8.6 ゲルは、分離用ゲルも濃縮用ゲルも処方通りでゲル化したが、pH 4.0 ゲルは処方通りではゲル化が進まなかつた。そこで TEMED (N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン) の混合比を変えてゲルを調製した。

以上の実験結果から、三種のカニの中腸腺に含まれる蛋白質分解酵素にはほとんど差を認めることは出来なかつた。ただ DEAE-セファデックス A-25 及び Separax の挙動から、タラバガニとハナサキガニのグループとケガニのグループに分けて考えることが出来るのではないかと考える。

今回の実験に供した試料は両電気泳動的には均一であることが確かめられた。

これらの酵素が trypsin-様酵素であるかどうか問題である。タラバガニについては既に報告した通り<sup>9)</sup>、SH-基修飾試薬により影響されなかつたので trypsin-様酵素と考えられる。ハナサキガニ、ケガニについても二、三の SH-基修飾試薬によって影響されないことが認められた<sup>12)</sup>。Ser-酵素であるかどうかは三種の酵素について目下検討中であり、これらの事柄は後日詳細に報告する。

またアミノ酸組成、両末端残基等についてはタラバガニについて定性的な知見を得ているが他の二種についてはまだ行なっていない。

## 要 約

1) 白糠沖で漁獲されたハナサキガニ、ケガニの中腸腺から、当研究室で考案した方法で蛋白質分解酵素を分離し、それを試料としてカラムクロマトグラフィー、アセチルセルロース膜電気泳動、ディスク電気泳動等を行なった。

2) 対照に当研究室で予め調製したタラバガニ中腸腺の蛋白質分解酵素を用い三者を比較検討した。その結果、カラムクロマトグラフィー、アセチルセルロース膜電気泳動の挙動から、タラバガニ、ハナサキガニのグループとケガニのグループに分けられるように考えられた。

3) この実験に用いた試料は三種とも電気泳動的に均一であった。

試料の採取に協力下さった白糖漁業協同組合、並びに釧路水産試験場 阿部晃治技師に深謝する。

また、本論文の御校閲を賜った本学(函館分校)教授 奈良盛博士、並びにアセチルセルロース膜電気泳動の実験に協力頂いた酒井千鶴子嬢に深謝する。

## 文 献

- 1) 松岡芳隆, 小出 醇. 日本水産学会(於仙台 昭和44年10月)講演.
- 2) 新井健一. 同上シンポジウム講演.
- 3) 大城善太郎. 同上.
- 4) 小出 醇. 同上.
- 5) 矢後 純. 生化学, **31**, 722 (1959), **32**, 138 (1960).
- 6) R. Zwillling, G. Pfeleiderer, and H. Sonneborn, *Compt. Biochem. Physiol.*, **28**, 1275 (1969).
- 7) B. J. Gates and J. Trevis, *Fedn. Proc.*, **27**, 770 (1968).
- 8) R. R. Balakrishna and F. W. Fish, *J. Insect Physiol.*, **11**, 961 (1965).

- 9) T. Saito, Y. Ishihara, Y. Maita and Y. Itō, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 28, 1015 (1962), 29, 942 (1963).
- 10) 伊藤裕三. 北海道科学研究成果報告, 第7集, 192 (昭40).
- 11) 永井 裕. 蛋白・核酸・酵素, 別冊 IX, 3 (1967).
- 12) 伊藤裕三. 未発表.