

魚類プロテアーゼに関する研究—IX

ビンナガ鮪幽門垂プロテアーゼの酵素化学的性質—IV

硫安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—IX

On the Proteolytic and Chemical Properties of the Enzymes in Pyloric Appendage of Long Fin Tuna *Thunnus alalunga*—IV

Precipitation of Protease-compound in Enzyme Solution Extracted from
Powder of Pyloric Appendage of Long Fir Tuna by Adding Ammonium-sulfate
of Various Concentration and Proteolytic Activity of that Precipitate.

By

Minoru FUJII

By adding ammonium-sulfate of various concentration-degree of saturation : 1/3, 1/2 and 3/5 by Osborne's degree to the enzyme solution extracted from the powder of pyloric appendage of long fin tuna, we found the greater precipitation under condition of 3/5—saturation-degree than under that of any other degree and its proteolytic activity was ca. 95% of original activity or more.

Protease-activity was not inhibited at all, though precipitating of protease-compound was repeated by means of ammonium-sulfate.

硫安は酵素蛋白の塩析剤として古くから使用せられている。著者もプロテアーゼの精製を行う上にもその塩析及び分離に該塩を使用する為の予備実験として硫安のプロテアーゼに対する諸影響を検討した。

実 験 の 部

1) 硫安添加に依る沈澱生成量及び其の蛋白分解酵素的作用力

著者等の研究¹⁾に依れば硫安に依るカゼインの塩析は反応液の pH を約5.2にした時に最も良い成績を示したのでプロテアーゼの塩析を行う反応液の pH はすべて5.2とした。硫安の飽和度はオスボーン (OSBORNE) の飽和度表示方式に従つて算出した硫安の固形量を酵素液に添加して生ずる沈澱を分離し数回同一濃度の硫安液で洗滌した後更に5%トリクロール酢酸液で

* 水産講習所研究業績 第227号, 1957年7月25日 受理

洗滌し、洗滌濾液にアンモニウムイオンの反応がなくなる迄洗滌を行う。然る後硫酸分解に附して窒素量を測定する。別に同時に全く同様な操作に依り生成させた沈澱をトリクロール酢酸液で洗滌することなく直ちに5%カゼイン5cc (或は10cc) を含む pH 8.5 の反応液に添加して40°C 1時間反応させて、反応後20%トリクロール酢酸液一定量(混液のトリクロール酢酸濃度5%になる様にする)及び少量の水酢酸を添加して酵素作用を止め、生じた未反応の蛋白沈澱物を5%トリクロール酢酸液で充分洗滌してアンモニウムイオンの反応の無くなった後硫酸分解に附して窒素量を測定する。対照試験は硫安処理により生じた沈澱を熱処理して酵素活性を破壊した後反応液に添加して以下全く同様な操作を行つたものである。尙沈澱を作るまでの操作はすべて反応液を氷水で0°C近くに冷却して行つた。実験結果の1例を示すと第1表の通りである。

Table 1. Precipitate in enzyme solution by adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of various concentration and its activity.

| Saturation-degree of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (by OSBORNE's method) | 1/5 | 1/2 | 3/5 | None-adding (control) |
|--|--------|--------|--------|--------------------------|
| Content of nitrogen in precipitate in 1cc of enzyme-solution ($\text{mg} \times 10^{-3}$) | 865.0 | 927.8 | 1036.0 | |
| Content of nitrogen in residual precipitate, coagulated by adding CCL_3COOH ($\text{mg} \times 10^{-3}$) | 5546.5 | 3423.0 | 3236.5 | 3074.6 |

第1表の結果から此の実験の範囲では%飽和度の場合が沈澱生成物の窒素含有量最も多く又カゼインに対する該沈澱生成物のプロテアーゼ作用力も最強であることが明かとなつた。即ちプロテアーゼ態沈澱生成物は硫安の濃度増加と共に増大し%飽和では対照(硫安無処理)の約95%の作用力を示した。

2) 硫安沈澱(3/5飽和)の反復による酵素活性の失活の有無

pH 5.2にした酵素溶液に%飽和度になるように固形硫安を添加して沈澱を生ぜさせその沈澱を溶液より分離して再びpH 7の緩衝液(Mc ILVAINE氏緩衝液)に溶かして再び元の酵素液量として其の1部を用いて作用力及び蛋白態窒素量を測定する。残液に就いて再び同様な処置を繰返して沈澱を生成しそれを溶かして元の液量にして作用力及び蛋白態窒素量を測定すること上述と全く同様にする。これらの結果は第2表の通りである。尙実験に用いる溶液はす

Table 2. Repeating of precipitation by means of adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and its activity.

| | Original | 1st. ppt. | 2nd. ppt. |
|---|----------|-----------|-----------|
| Content of nitrogen in 1cc-enzyme-sol. ($\text{mg} \times 10^{-3}$) | 288.5 | 230.3 | 243.4 |
| Relative proteolytic activity of 1cc of enzyme-sol. | 313.5 | 307.9 | 308.7 |
| Relative proteolytic activity of 1 mg of nitrogen. | 1087 | 1337 | 1298 |

て氷水中に浸して0°C近くにしたものである。

第2表の結果に依ると硫安添加により酵素液中の窒素量は若干減少するが、1cc当りの作用

力は殆んど原液の98%以上の作用力を保持し、1mg当りの作用力を比較すると処理した酵素液は原液に対し逆に作用力の上昇を示し第2回目の処理のものは第1回目のそれに比し殆んど作用力は劣らない。以上の事実から次の如く考えることが出来る。即ち硫安処理により非酵素態窒素化合物がかなり除去された結果1mg当りの作用力が上昇したものであり、且硫安はプロテアーゼに対し殆んど阻害作用を示さないということである。

総 括

pH を約5.2にしてプロテアーゼ溶液に硫安を添加してその飽和度を夫々 $\frac{1}{3}$ 、 $\frac{1}{2}$ 及び $\frac{2}{3}$ とした所%飽和度で最も多量の沈澱性窒素化合物を生じ且その酵素活性も最強で原酵素活力の約95%或はそれ以上を保持した。又硫安塩析を繰返したが酵素活性は殆んど減少を示さなかつた。即ち硫安はプロテアーゼに対し阻害作用を殆んど示さない。

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（於広島市）に於いて発表した。尙分析を分担された西野イチ氏に深謝する。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。

文 献

- 1) 藤井 実・立川成章：1957. 本報告, 7 (1).