

結晶性蛋白酵素に関する研究

内野研究室

醫學士 中村 正二郎

膵臓抽出液中の蛋白分解酵素なる Trypsin 及び Chymotrypsin が Northrop¹⁾ によつて結晶蛋白質として報告せられてゐる。兩者の作用特性について、Northropは Casein の逐次分解 (Stufenabbau) によつても之を指摘してゐるが、殊に Trypsin が血液を凝固し、Chymotrypsin が乳汁を凝固することを發見し、之に依つて兩者の作用を區別命名した。更に Bergmann²⁾ は合成基質 Benzoyl-argininamid 及び Benzoyl-l-tyrosyl-glycinamid に對する兩者の特異的分解作用を指摘せり。

元來、膵抽出液における蛋白分解酵素群と分泌膵液におけるそれとの異同の點については、既に研究せられてゐるが (例へば抽出液に於ては Carboxypeptidase 又 Dipeptidase 等を著明に證明し得るが、分泌膵液に於ては然らず)、抽出液より結晶性に析出した Trypsin 及び Chymotrypsin が分泌膵液中に見られる酵素自體と如何なる關係にあるか、又兩酵素の作用特性及び賦活性について更に知見を明にするために内野教授指導の許に以下の實驗に着手したのである。

1. Chymotrypsinogen-Fraktionの結晶酵素の作用に就いて。

Northrop の方法により Chymotrypsinogen 分割に於て收得した針狀結晶酵素について、種

第一表 Chymotrypsinogen-Fraktionの結晶酵素の蛋白分解作用。

試験液：5ccm 基質溶液 (5% Casein, Pepion-Gehe 或は 0,2Mol 合成 Peptid 溶液)

+10ccm 0,2Mol-磷酸鹽緩衝液 (pH 8,3)

+2ccm 結晶酵素液 ($[\eta]_D = 1,51^{10}$)；全量 20ccm となして混和後、トルオール下に 37° 分解せしむ。

對照として緩衝液及酵素液のみを試験す。

24時間後、試験液 5ccm につき、フォルモール滴定による酸値を 0,05n NaOH によつて測定し、本試験値より對照値を引き去りたる酸値増加を表に掲ぐ。

酸 値 増 加	
基 質	ccm 0,05n NaOH
Casein	0,71
Pepion-Gehe	0,22
Hippursäure	0,01
Benzoyl-diglycin	0,03
Chloracetyl-diglycin	0,06
Glycyl-glycin	0,07

種の基質を用ひてその活性を検査するに、結晶は完全には不活性の状態では存せず、部分的に活性を有し Casein 及び Pepton の分解を認めた。第一表に見る如くである。

これは材料入手に相当時間を要したため、その間に Chymotrypsinogen の一部が活性化し、Chymotrypsin を生じたものであらうと考へられる。この部分的に活性化せる結晶について五回乃至七回再結晶を繰り返すことにより、殆んどカゼイン分解及び乳汁凝固作用を示さざる結晶 Chymotrypsinogen を收得することが出来たのでそれに就いて目下研究を進めて居る。

2. Chymotrypsinによるカゼインの分解産物.

藤田⁹⁾ 及び河原田¹⁰⁾は、夫々、Tripeptidase及びDipeptidaseを證明し得ない Trypsin(Grübler) 或は大隣液をカゼインに作用せしめ、その分解産物として Leucin 及び Tyrosin を分離した。ここには Chymotrypsin の作用によつても亦、アミノ酸が遊離せられるか否かを検査した。其の結果、分解産物として Leucin 又 Tyrosin を收得した。分解及び分離の操作を略記すれば以下の如し。

10gカゼイン (Hammarsten) をm/10 磷酸鹽調節液50ccm に溶かし、pH 7,6となし、蛋白窒素28mgに相當する Chymotrypsin を加へ、37°Cに於て消化した。第八日に分解液 2ccm をとり 0,05n NaOH により Formol 滴定を行ひ酸値増加 3,15ccm を得た。同日、蛋白窒素14mgに相當する Chymotrypsin を新たに添加す。消化第十八日目の酸値増加は1,17ccmなり。同日、蛋白窒素14mg に相當する Chymotrypsin を新たに添加し、消化を繼續したが第二十五日目の酸値増加は0,2ccmに止る。斯くの如く Chymotrypsin によつてカゼインを分解し、Chymotrypsin を追加するも分解酸値の増加を見ざるに至つて分解液を取り出し、之を検するに絮狀の沈澱を認めた。之を検鏡すれば、無定形物質の間に、Leucin 及び Tyrosin に相當する結晶を認む。この沈澱を濾別し、濾液及び沈澱の洗滌液を合して減壓濃縮し、析出せる結晶を收得す、之等を更に分別結晶せしめて二部分に分つ。收得せる結晶は夫々 Leucin 及び Tyrosin に相當する結晶型を示し、Leucin に相當するものは昇華し、Tyrosin に相當するものは Millon 氏反應陽性であつた。

3. 隣液の酸賦活 (Säureaktivierung) の問題に就いて。

隣液の自賦活 (Spontane Aktivierung)¹¹⁾ に關し、河原田¹⁰⁾ は酸賦活及び酸チヌステイン賦活の現象を發見し、之を自賦活の本態の一知見として報告してゐる。即ち、不活性隣液を pH 5,0 に於て 37°C に一定時間放置すれば活性化されることを見たのである。

純化 Chymotrypsinogen の活性化については、Northrop は、これが唯 Trypsin のみによつて活性化され、Enterokinase は直接 Chymotrypsinogen に作用せずと報告してゐるが、不活性隣液の酸賦活の際における Chymotrypsinogen の賦活についてはどうであらうか。

a) Chymotrypsinogen と酸賦活.

部分的に活性化せる Chymotrypsinogen 結晶について再結晶を五回繰返し、第二表對照試

験に示す如く、不活性の Chymotrypsinogen を收得して、本 Chymotrypsinogen 溶液が酸賦活性を示すや否やを検し第二表の結果を得た。本試験の結果を見るに、不活性酵素の場合と異り、Chymotrypsinogen 自体はカゼイン分解酸値の増加を示さず、成績は單に氷室に保存せるものと同値である。更に pH の全領域に亘つて 37°C 保置の試験をするも活性の増加を認

第二表 Chymotrypsinogenの賦活に及ぼす互應の影響

酵素液：結晶Chymotrypsinogen溶液， $[\alpha]_D = -0,48^\circ$ 。

各pH處理液：2ccm 酵素液に 0,1ccm 緩衝液*(Nr.1,2,3,4にはm/5醋酸鹽，Nr.5, 6, 7, 8にはm/5磷酸鹽)を加へ，Nr.9-10には 0,5ccm 0,1%Trypsin¹⁾, m/10 磷酸鹽溶液，Nr.11には 0,5ccm 0,1% Kinase²⁾, m/10 磷酸鹽溶液を加へ，所定の pH となしたる後，水を以て全量 2,5ccm となし，24時間 37°C に保置す (Nr.9を除く)。對照としてNr.O₁には0,5ccm Trypsin 液又 Nr.O₂には 0,5ccm Kinase 液のみを，Nr.O₃には酵素液のみを加へ，全量2,5ccmとなし，Nr.9と共に氷室に保置す。

分解液：5ccm 2%カゼイン m/10 磷酸鹽溶液に0,5ccm 處理液又は對照液を加へ，24時間37°C に於て分解せしめたる後 2ccm についてFormol滴定を行ふ。

凝固試験液：10ccm 牛乳(10ccm 牛乳に1ccm (m 磷酸鹽溶液 (pH5,0)を加へたるもの)+1ccm 處理液又は對照液を加へ，Kunitz*)に従つて凝固時間を測定す。

- 1) 乾燥犬痔臟液。
 - 2) Dipeptidaseを證明せざる豚小腸粘膜炎乾燥粉末。
- * J. of gen. Physiol. 18, 459(1935).

	Nr	pH	賦活劑	保置溫度	カゼイン分解酸値増加 (ccm 0,05n NaOH)			凝固時間 (分);pH5,0
					4,5時間	24時間	72時間	
對照	0 ₁	7,6	Trypsin	氷室	0,01	0,01	0,02	(—)
	0 ₂	7,6	Kinase	氷室	0,00	0,05	0,09	(—)
	0 ₃	4,0	—	氷室	0,03	0,06	0,10	(—)
本試験 37°C	1	3,0	—	37°	0,03	0,04	0,07	(—)
	2	4,0	—		0,02	0,04	0,07	(—)
	3	5,0	—		0,04	0,04	0,08	(—)
	4	6,0	—		0,01	0,02	0,09	(—)
	5	7,0	—		0,04	0,04	0,09	(—)
	6	8,0	—		-0,01	0,05	0,09	(—)
	7	9,0	—		-0,02	0,05	0,10	(—)
	8	10,0	—		0,03	0,01	0,06	(—)
對照	9	7,6	Trypsin	氷室	---	0,04	0,15	(—)
	10	7,6	Trypsin	37°	0,01	0,04	0,09	(—)
	11	7,6	Kinase		0,14	0,17	0,25	12,3

めない。之に對しpH7,6に於てKinaseを加へ37° Cに保置したるものは微弱ながらカゼイン分解酸値増加を示し、又明に乳汁凝固を起した。即ち一定の反應のみによる結晶性Chymotrypsinogenの自賦活現象は證明できなかつた。本試験にてTrypsinを使用したものは影響が現れなかつた。Kinase及びTrypsinに就て更に吟味して見たい。

b) 犬の乾燥不活性唾液の酸賦活と乳汁凝固との關係。

犬の乾燥不活性唾液に酸賦活を行へば、pH5,0において24時間保置のものは著明なるカゼイン分解を示すが、乳汁凝固は甚だ微弱である。pH5,5—8,0間の試験に於てはCasein分解も著明であり、乳汁凝固も認められるが、後者は著しくない。pH6,0保置のものはカゼインを著明に分解してゐるが、又乳汁凝固も比較的に最も著明に現はれてゐる。

之等の成績は酸活性唾液のカゼイン分解能と、乳汁凝固能との關聯を思はしめるものがあるが、pH5,0の試験結果によれば、カゼインの分解と乳汁の凝固とが必ず一致するとは言ひ難い。

c) 酸賦活と他の賦活剤による賦活との關係。

犬の乾燥唾液に酸賦活を行ひ、保置時間を48時間(第四表)に延長すれば、pH6,0保置のものには

第三表 乾燥不活性犬唾液の酸賦活とカゼイン凝固作用。

酵素液：0,5%乾燥不活性犬唾液。

處理液：6ccm 酵素液に1ccm 緩衝液(pH5,6には醋酸鹽又、pH7,8には磷酸鹽)を加へnHCl又はNaOHによつて所定のpHとなしたる後、水を以て全量10ccmとなす。

トルオール下に24時間、37°Cに保置後4ccmをカゼイン分解に、1ccmを乳汁凝固に使用する。

分解液：4ccm 酵素處理液に5ccm 5%カゼイン(0,1Mol磷酸鹽を含む)を加へ、pH7,6となし、水を以て全量を10ccmとしトルオール下に37°Cに於て分解せしむ。2ccmに就いてフォルモール滴定を行ふ。

凝固液：1ccm酵素液に10ccm牛乳(1 MolのpH5,0 醋酸鹽緩衝液1ccmに10ccm牛乳を加へたるもの)を加へKunitz⁶⁾に従つて凝固時を測定す。

保置pH 37°C	カゼイン分解酸値増加 (ccm (0,05nNaOH))			乳汁凝固時間 (分) pH5,0
	2,5時間	24時間	72時間	
3	0,01	0,06	0,14	凝固せず
4	0	0,05	0,2	凝固せず
5	0,13	0,56	1,15	20'
5,5	0,1	3,03	0,79	85'
6	0,08	0,42	0,95	50'
7	0,13	0,61	1,98	63'
8	0,15	0,6	1,97	78'

ゼイン分解は著明に現はれ、乳汁凝固も相當著明に惹起せられる。第三表の如く24時間保置のものに於ては、カゼイン分解は pH5,0 に於て、乳汁凝固は pH6,0 に於て最も著明であつた。pH5,0保置のものでは、之に比し分解も凝固も稍低値である。

前述の酸處理試驗(3.b)によつて胰液のカゼイン分解能と乳汁凝固能とが必ずしも一致しないことを見たのであるが、一面に結晶性 Chymotrypsinogen 自體には酸賦活の現象は認められなかつたのであるから(3.a)、Chymotrypsinogen の賦活は、Northrop の意見の如く活性化された Trypsin によつて二次的に起るものであらう。胰液の酸賦活は一次的には Trypsinogen の賦活が主の様考へられる。即ち酸處理時間を48時間に延長すれば、胰液のカゼイン分解及び乳汁凝固共に pH6,0 保置のものに於て、pH 5,0 保置のものより著明となる。これは、pH 6,0 保置のものに於ては、活性 Trypsin に依つて時間経過と共に、pH 6 に於て不完全ながら二次的に Chymotrypsin の増加が起り、従つてそのカゼイン分解作用が Trypsin のそれに加はり、pH5,0 保置のものに於けるより大なる分解作用を示すものと考へられるのである。

更にまた、Kinase 賦活におけるカゼイン分解及び乳汁凝固の觀測により、兩酵素の態度をうかがふことが出来る。

即ち、pH 5,0に48時間保置後、更に30分間 Kinase 賦活を行つたものに於ては、Kinase 賦活

第四表 乾燥不活性犬胰液の賦活によるカゼイン分解及び乳汁凝固。

酵素液：2,5%乾燥不活性犬胰液、

處理液：5ccm 酵素液に1ccm 0,2M-J緩衝液を加へ(Nr. 1, 2, 3 には醋酸鹽、4, 5に磷酸鹽)、所定のpHとなしたる後、Nr.4には1ccm 0,5% Kinase¹⁾、Nr.5 には1ccm 0,5% Trypsin²⁾ を加へトルオール下に48時間37°Cに保置す。

48時間後 Nr.2 は1ccm 0,5% Kinase¹⁾ を加へて 30分間37°Cに於て賦活す。各水を以て全量 1ccm となし、4ccm をカゼイン分解に、1ccm を乳汁凝固に使用する。

分解液：4ccm 酵素處理液+5ccm 5%カゼイン (m/10磷酸鹽 (pH7,6)を含む)、全量10ccm とす 2ccmについてフォルモール滴定を行ふ。

凝固液：第三表に示せると同様なり。

番號	酵素處理液		カゼイン分解酸値増加 (ccm 0,05 nNaOH)		乳汁凝固時間 (分); H 5,0
	pH	賦活劑	3,5時間	24時間	
1	5,0		0,36	1,10	85'
2	〃	Kinase追加	0,56	1,41	20'
3	6,0		0,42	1,87	80'
4	7,6	Kinase	1,45	2,15	5'
5	7,6	Trypsin	0,25	0,90	54'

1) 2) 第二表におけると同一。

によつてカゼイン分解が増大すると共に乳汁凝固時間も稍短縮してゐるが、pH7.6に於て48時間 Kinase 賦活を行つたものに於ては、カゼイン分解も最も強く、凝固作用も最も著明に現はれてゐる。Chymotrypsinogen の賦活が直接には Kinase に依らぬものとすれば、之れ等の Chymotrypsinogen 賦活は、活性 Trypsin に依つて起つたものと考へられる。

尚、Chymotrypsinogen 及び Trypsinogen の結晶を得て、更之等の諸點について實驗を續行する筈である。(昭和十七年十二月四日化學研究所講演會發表)

文 獻

- 1) Northrop, J. H. and Kunitz, M.: J. of gen. Physiol., **16**, 267(1932).
- 2) Northrop, J. H. and Kunitz, M.: J. of gen. Physiol., **18**, 433(1935).
- 3) Bergmann, M.: J. of biol. Chem., **118**, 405(1937). Science, **85**, 410(1937).
- 4) Fujita, Sh.: Tohoku J. of experim. Med., **34**, 525(1938).
- 5) Kawaharada, M.: J. of Biochem., **36**, 457,485(1944).
- 6) Kunitz, M.: J. of Gen. Physiol., **18**, 459(1935).