



種々カニ類中腸腺の蛋白質分解酵素：
2. ハナサキガニ中腸腺の蛋白質分解酵素の季節的変動

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2012-11-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伊藤, 裕三 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.32150/00002014

種々カニ類中腸腺の蛋白質分解酵素

2. ハナサキガニ中腸腺の蛋白質分解酵素の季節的変動

伊 藤 裕 三

北海道教育大学釧路分校化学教室

Proteolytic Enzyme from the Hepatopancreas of Various Crabs
 II. Seasonal Variation of Proteolytic Enzyme Activity
 of *Paralithodes brevipes* (H. Milve Edwardes et Lucus)

Yasuzo ITO

Chemical Laboratory, Kushiro Branch, Hokkaido University of Education

緒 論

前報¹⁾でタラバガニ、ハナサキガニ及びケガニの三種のカニ中腸腺に含まれるトリプシン様活性を有する蛋白質分解酵素のカラムクロマトグラフィー及び電気泳動的挙動を検索した結果を報告した。

本報告はハナサキガニ中腸腺の蛋白質分解酵素の酵素活性の季節的変動を雌雄別に検索した結果である。即ち、一般にカニ類（甲殻類全体を含め）は生長するに従って脱皮を行なうが、成体になると年一回脱皮すると報告されている。カニの種類によって脱皮の時期は異なっているがハナサキガニは脱皮時期が6月頃である。この時期の中腸腺の状態は他の時期、5月及び8月以降と比較して著しく着色していることが多かった。そこで脱皮前の時期と脱皮時期と脱皮後の時期とで、中腸腺に含まれる蛋白質分解酵素の活性に差があるのではないかと考え、前報¹⁾で報告したのと同ーの方法で各時期の酵素を雌雄別に調製しその酵素活性を比較検討した。その結果脱皮時期と他の時期との間に顕著な差が認められたので報告する。

実験試料及び方法

ハナサキガニ (*Paralithodes brevipes* (H. Milve Edwardes et Lucus)) は1970年5月、6月、8月、9月、10月及び11月浜中町霧多布沖及び根室市花咲沖で漁獲されたもので、水揚げ後直ちに雌雄に区別し脱甲し中腸腺を採取した。採取した中腸腺は直ちにドライアイスで -20°C で凍結し、研究室に持ち帰った。中腸腺から酵素の調製は前報¹⁾と同ーの操作で行なった。即ち、中腸腺に3倍量のM/15リン酸塩緩衝溶液(pH 6.8~7.2)を加え24時間 10°C 以下で抽出した。次いで酢酸鉛処理、硫酸分別、アセトン分別を行なった。また一部は硫酸分別後セファデックス G-50

(3×20 cm) を用いてカラムクロマトグラフィーを行なった後アセトン分別を行なった。
 酵素活性の測定及び蛋白質の定量は前報¹⁾と同一の方法で行なった。

実験結果並びに考察

1. 各時期における蛋白質分解酵素の調製

前報¹⁾と同一の方法で蛋白質分解酵素の調製を行なった。結果は第1表に示した。

第1表 各時期におけるハナサキガニ中腸腺の蛋白質分解酵素の調製結果

Fraction	Total Protein Nitrogen (mg)	Total Unit	Unit/mg	Fraction	Total Protein Nitrogen (mg)	Total Unit	Unit/mg		
♂ 5	1	325.8	296.4	0.91	♀ 5	1	1,208.0	1,016.0	0.84
	2	751.4	416.0	0.55		2	984.0	640.0	0.65
	3	145.6	457.6	3.14		3	697.0	1,163.0	1.67
	4	148.0	464.0	3.13		4	722.4	2,304.0	3.19
	5	7.2	6.4	0.89		5	73.5	57.5	0.78
	6	22.7	355.5	15.66		6	14.4	204.5	14.30
♂ 6	1	1,464.0	1,376.0	0.94	♀ 6	1	568.0	568.0	1.00
	2	1,384.0	2,584.0	1.87		2	1,792.0	1,904.0	1.06
	3	1,995.0	2,145.0	1.08		3	2,318.0	1,216.0	0.52
	4	602.0	3,120.0	5.18		4	728.0	2,800.0	3.85
	5	23.5	145.7	6.20		5	44.5	293.7	6.60
	6	276.1	3,368.4	11.47		6	217.0	3,016.3	13.90
♂ 8	1	1,380.0	732.0	0.53	♀ 8	1	2,730.0	2,040.0	0.74
	2	1,260.0	1,860.0	1.48		2	1,638.0	1,164.0	0.71
	3	580.0	1,140.0	1.97		3	3,920.0	7,800.0	1.90
	4	322.0	1,010.0	3.14		4	259.0	920.0	3.50
	5	7.2	14.0	1.94		5	31.2	21.8	0.70
	6	11.9	206.5	17.35		6	139.2	2,088.0	15.00

5: 脱皮前, 6: 脱皮時期, 8: 脱皮後.

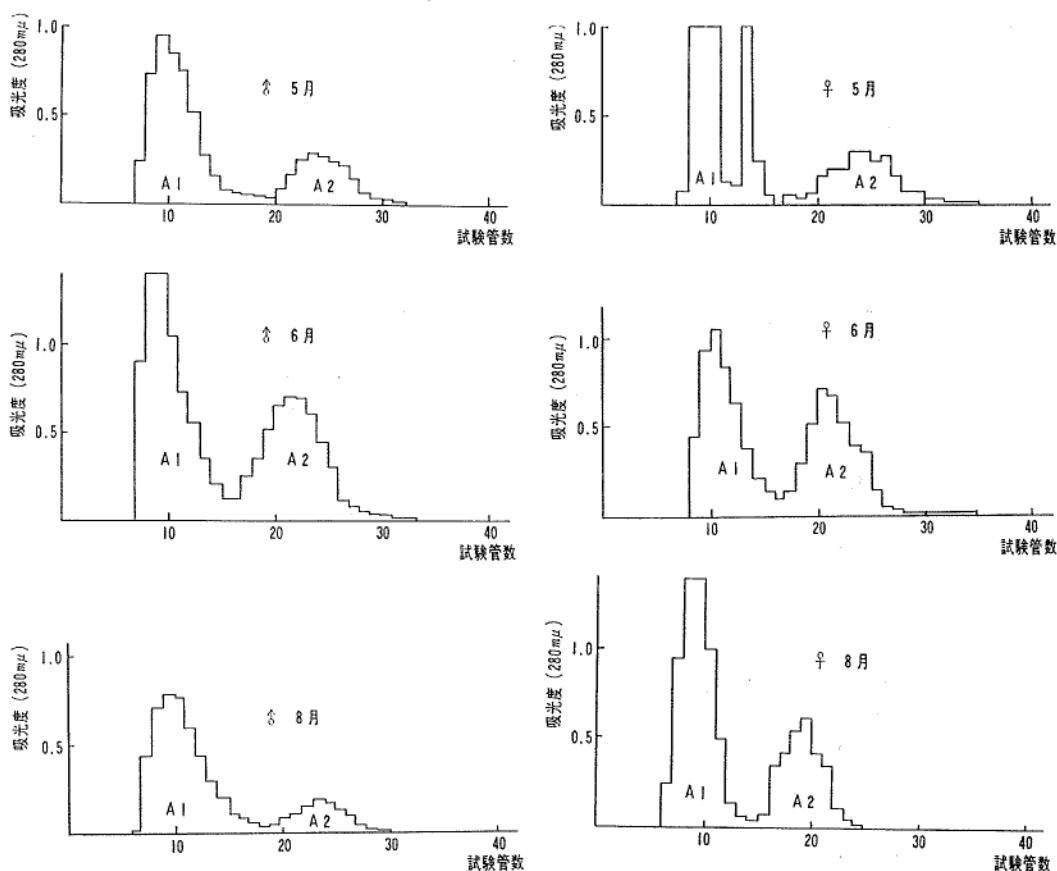
1: 粗抽出液 (3時間後), 2: 粗抽出液 (24時間後), 3: 酢酸鉛処理後, 4: 硫酸塩析物 (0.5飽和), 5: 硫酸塩析物 (0.2飽和), 6: アセトン沈澱物 (60%).

第2表 脱皮時期 (6月) の試料と他の時期との相違

Sample	Fraction Unit	Fraction 1	Fraction 5	Fraction 6
		Unit/protein mg	Unit/protein mg	Unit/protein mg
♂	5	0.91	0.89	15.66
	6	0.94	6.20	11.47
	8	0.53	1.94	17.35
♀	5	0.84	0.78	14.20
	6	1.00	6.60	13.90
	8	0.75	0.70	15.00

5: 脱皮前, 6: 脱皮時期, 8: 脱皮後.

Fraction 1, 5, 6は第1表を参照.



第1図 各時期の粗酵素のセファデラックス G-50 カラムクロマトグラフィー

第3表 セファデラックス G-50 カラムクロマトグラフィーにより分離された A₁ 及び A₂ 区分の蛋白量と酵素活性

Sample	Fraction	Fraction I (A ₁)		Fraction II (A ₂)	
		Protein (%)	Activity (%)	Protein (%)	Activity (%)
♂	5	73.15	76.81	26.85	23.19
	6	58.02	44.30	41.98	55.70
	8	70.97	65.87	29.03	34.12
♀	5	67.02	60.92	32.98	39.08
	6	55.72	50.64	44.28	49.36
	8	68.46	78.61	31.54	21.39

5: 脱皮前, 6: 脱皮時期, 8: 脱皮後.

Fraction I (A₁), Fraction II (A₂): 第1図参照.

第1表から各時期における蛋白質分解酵素の比活性は粗抽出液からアセトン粉末の段階で5月の雌雄は凡そ17倍強、8月の雌雄は20倍以上に増加し著しく精製されたことが認められた。しかし6月の雌雄は共に13倍前後にしか比活性の増加が認められなかった。脱皮時期即ち、6月の試料と他の時期の試料との相違を示したのが第2表であって、第2表から5月及び8月の試料では活性を示さない硫酸分別の区分に6月の試料では活性が認められた。

この事からカニの脱皮前(5月), 脱皮時期(6月), 脱皮後(8月)の3時期の間には明らかに含有される蛋白質分解酵素の状態に相違があると考えられた。

次にこれらの事を詳しく検討する目的で硫酸分別後, セファデックス G-50 カラムクロマトグラフィーを行なった。結果は第1図に示した。

第1図に示されたように各時期共二つの区分(A_1 及び A_2) が表われた。 A_1 区分の変動は雌雄とも脱皮時期(6月)に最低になった。 A_1 区分は8月以降徐々に増加し5月の値に近づくことが雄の場合には認められた。

一方 A_2 の区分は A_1 の区分の変化とは対照的に脱皮時期(6月)に雌雄ともに最大になり以後次第に減少し, 9月, 10月, 11月にかけ徐々に増加し5月の値に近づくことが雄の場合には明らかに認められた。

A_1 , A_2 区分の蛋白質量, 酵素活性は第3表に示した。第3表から A_1 と A_2 区分について脱皮時期(6月)には特異的であることが明らかであった²⁾。

以上の事から, 脱皮時期(6月)のハナサギガニ中腸腺の蛋白質分解酵素は他の時期と比較してその挙動を異にすると考えられる。この A_2 区分と第2表に示した硫酸分別区分との関係についてはまだ明らかでない。

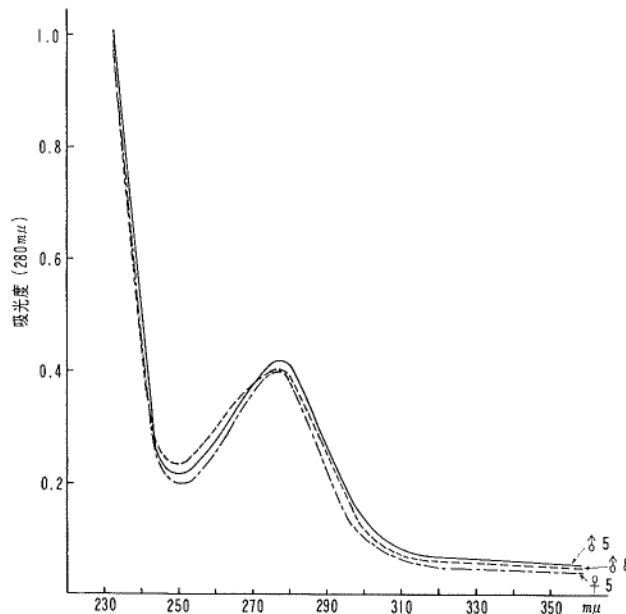
2. 各時期の A_1 区分に含まれる蛋白質分解酵素の二, 三の性質

各時期の A_1 区分を更に DEAE-セファデックスを用いてクロマトグラフィーを行ない, 得られた区分をアセトン粉末とした。このアセトン粉末は前報¹⁾で報告した様にディスク電気泳動的には均一であった。このアセトン粉末の紫外外部吸収測定結果²⁾の一部は第2図に示した。またアセトン粉末から得られた結晶は第3図に示した。結晶についての詳細は他に報告する。

i) 至適 pH

pH 5.5 から 9.0 の間で 37°C, 10 分間反応を行ない酵素作用を測定した。結果は第4図に示した。

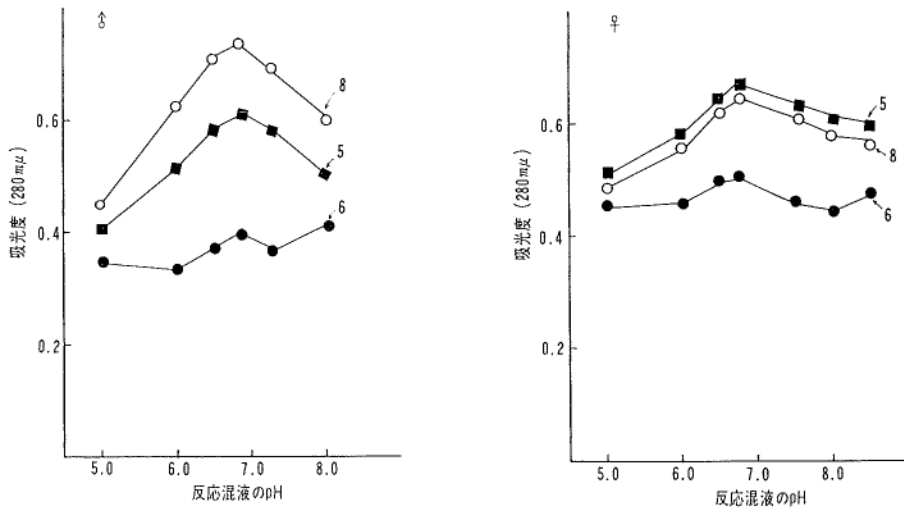
第4図に示したように, 5月, 8月の試料の結果は雌雄共に至適 pH は 7.0 であった。これはタ



第2図 酵素のアセトン粉末の紫外外部吸収



第3図 酵素の結晶



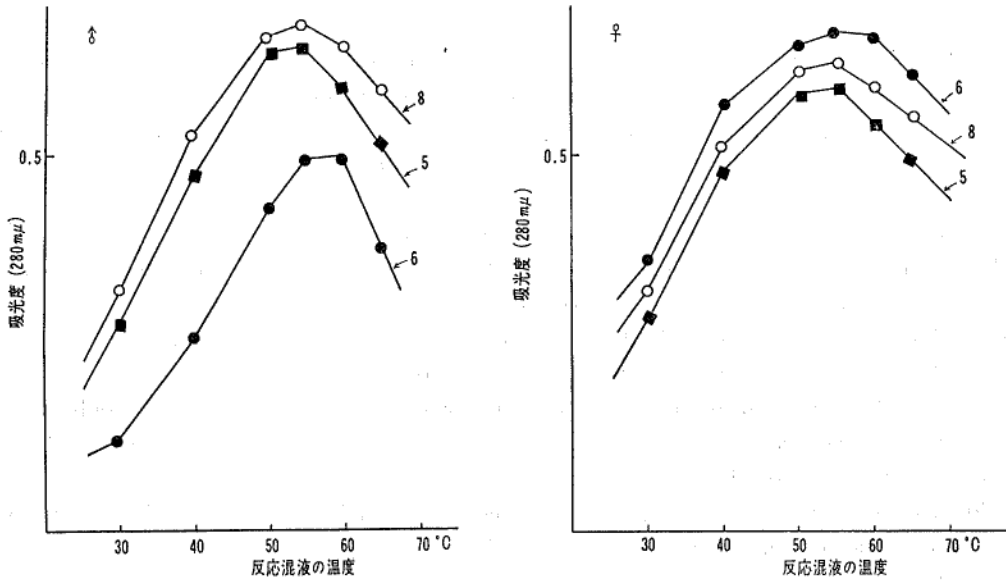
第4図 pH と作用の関係

ラバガニ中腸腺の蛋白質分解酵素の結果と同じであった³⁾。しかし6月の試料の結果は雌雄共に少々酸性に偏っていた。さらにアリカリ側にも活性が認められた。

ii) 至適温度

pH 7.0 で 25°C から 70°C までの温度範囲で各 10 分間反応を行ない酵素作用を測定した。結果は第5図に示した。

第5図に示したように5月、8月の試料の結果は雌雄共に 50°C~55°C の間に至適温度が認められた。これはタラバガニ中腸腺の蛋白質分解酵素について得られた結果と同じであった³⁾。しかし6月の試料では雌雄共に 55°C~60°C に偏っていた。pH に対する安定性を検討した結果⁴⁾ではザリガニ中腸腺のトリプシン様酵素の結果³⁾と同じ傾向を示した。温度に対する安定性を検討した結



第5図 温度と作用の関係

果々は、50°C、55°C では30分以内に速やかに失活した。しかし35°C 前後ではザリガニ中腸腺のトリプシン様酵素の結果⁷⁾と同じく長時間安定であった。

以上の事から精製した A₁ 区分については5月と8月の試料ではザリガニ中腸腺のトリプシン様酵素ときわめて類似した傾向が認められ、前報⁷⁾で報告したタラバガニ中腸腺の蛋白質分解酵素での結果とよく一致した。しかし6月の試料ではその結果は他と比較して異なっていた。6月の試料が5月、8月の試料の結果と異なることは1969年度の実験でも認められているので脱皮時期特有のものと考えられる。この相違が何に由来するのかまだ明らかではないがインシュリン B 鎖に対する分解特異性⁸⁾、合成基質 BAEE に対する分解特異性⁹⁾の結果及び大豆トリプシン阻害剤を用いた阻害実験¹⁰⁾の結果から触媒作用には差がないと考えられる。その他の理由については目下検討中である。

要 約

1) ハナサキガニ中腸腺の蛋白質分解酵素を脱皮前、脱皮時期、及び脱皮後の3時期に分けて調製した。

2) 各時期の試料を比較すると、脱皮時期の試料は至適 pH、至適温度、セファデックスクロマトグラフィー等の検討結果、他の時期との間に特異的な相違が認められた。

3) 脱皮時期の試料を除く他の時期の試料から得られた中腸腺の蛋白質分解酵素の性質はタラバガニ中腸腺の蛋白質分解酵素の性質と同じ傾向であった。この事はまたザリガニをはじめ無脊椎動物中腸腺のトリプシン様酵素の諸性質ともきわめて類似した。

試料の採取にご協力下さった北海道釧路水産試験場相沢悟科長、浜中町霧多布漁業協同組合、浜中町山崎岳詰株式会社及び根室市漁業協同組合の各位に深謝する。また、結晶写真を撮影して戴いた本学生物学教室長尾善助教授並びに分析にご協力頂いた小沢成子氏に深謝する。

Abstract

In the previous paper, a report was presented on the column chromatography and electrophoresis of proteolytic enzymes from the hepatopancreas of various crabs.

The present paper deals with the seasonal variation of proteolytic enzyme activity from the hepatopancreas of the shore crab. (*Hanasaki gani*, *Paralithodes brevipes* (H. Milve Edwardes et Lucas)).

The experimental results obtained may be summarized as follow ;

1. Proteolytic enzyme from the hepatopancreas of the shore crab, Hanasaki-gani, in moulting and non-moulting periods have been isolated, purified and crystallized.
2. Proteolytic enzyme activity of the shore crab, Hanasaki-gani, in moulting period was considerably different from that of enzyme in non-moulting period.
3. Optimum pH of the enzyme from the hepatopancreas of the shore crab in moulting and non-moulting periods for the hydrolysis of casein was found at pH 6.6-7.0 and pH 7.0-7.4, respectively. The activity of these enzyme was stable over the pH range 6.0-8.0 at below 40°C for 24 hours, while in more prolonged times the activity declined gradually. Beyond this pH range, the loss of activity proceeded rapidly.
4. Optimum temperature of the enzyme from the hepatopancreas of the shore crab, in moulting and non-moulting periods for hydrolysis at pH 7.0 was 55-60°C and 50-55°C, respectively. The activity of these enzymes declined sharply at temperatures, particularly at 45 and 50°C, with incubation time longer than 10 minutes, while at below 40°C no changes of the activity were observed over a period of 24 hours.
5. The value obtained with the enzyme in non-moulting period was similar to that of the king crab trypsin-like enzyme.

文 献

- 1) 伊藤裕三・小沢成子・帆保罔雄 北教大紀要 II (A) 21, 66 (1971).
- 2) 伊藤裕三 日本水産学会 (於東京昭和45年4月) 講演.
- 3) T. Saito, Y. Ishihara, Y. Maita and Y. Ito. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 28, 1015 (1962), 29, 942 (1963).
- 4) 伊藤裕三 日本化学会秋季大会 (於札幌昭和45年8月) 講演.
- 5) R. Zwillig, G. Pfeleiderer, and H. H. Sonneborn, *Compt. Biochem. Physiol.*, 28, 1275 (1969).
- 6) 伊藤裕三・小沢成子 第20回北海道栄養食糧学会 (於札幌昭和45年9月) 講演.
- 7) 伊藤裕三 日本水産学会秋季大会 (於函館昭和46年10月) 講演.
- 8) 伊藤裕三 未発表.