

シロサケ幽門垂プロテアーゼ活性の回遊中の変動について

誌名	日本大学農獣医学部学術研究報告
ISSN	00780839
巻/号	40
掲載ページ	p. 107-113
発行年月	1983年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



シロサケ幽門垂プロテアーゼ活性の回遊中の変動について*

内田直行**・田中ツネ***・西出英一**

(水産生物化学研究室**, 函館短期大学食物栄養学科***)

昭和57年10月14日受理

緒 言

魚類の消化酵素活性と生理状態、たとえば活動性¹⁾、回遊²⁾、成長段階^{3~7)}など、との関係が古くから検討され両者に密接な関連があることが報告されている。これらのことから魚類の消化酵素活性は魚類の生理状態を顕著に反映するものであり、これを追究することは魚類の生活力および習性を生化学的に解析する有効な手段であると考えられている⁸⁾。

一般にサケ類は河川でふ化後、海洋に降り索餌回遊を行い、性的成熟に達したものは産卵回遊を始め、適当な河川に溯上して産卵する。この間サケ類は生活環境に現れる甲殻類、軟体動物などを無選択に摂食しており、非常に複雑な食性を伴う生活史を営んでいる。

サケ類のこのような環境および生理的变化はその消化酵素、特に動物性食物を消化するために重要である幽門垂中のプロテアーゼ活性の変動に著しい影響を与えるものと予測され、プロテアーゼ活性と生理状態との関連性を明らかにすることはサケ類の生活史を生化学的に解析する有効な手段と考えられる。このような観点から、シロサケの幽門垂プロテアーゼ活性と生理状態との関連性を明らかにし、その生理的意義を明確にすることを考

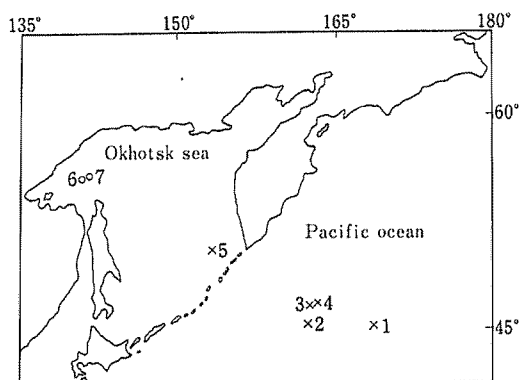


Fig. 1 Capture points of chum salmon in 1970 (X) and 1972 (O)

え、まず、比較的入手が容易である春から初秋にかけて北太平洋からオホーツク海にかけて回遊しているシロサケを入手し、その幽門垂のプロテアーゼ活性およびその構成成分の変動について検討したところ、有益な知見を得たので報告する。

実験材料および方法

1. 試料

プロテアーゼ活性の変動を測定するために用いたシロ

Table 1 Relation of number of capture point and state of sample

Number of capture point	Date	Locality		Average of body weight	Number and sex of prize	
		N	E		F	M
1	1970 3/20	45°34'	168°48'	1,550 g	9	11
2	4/23	45 38 ,	162 33	1,824	3	7
3	5/17	46 35 ,	162 36	2,163	5	5
4	5/24	46 56 ,	163 39	2,169	4	6
5	6/23	51 38 ,	153 30	2,605	5	5
6	1972 8/23	55 50 ,	141 00	2,573	5	5
7	9/ 4	55 51 ,	141 03	3,323	6	6

F: female, M: male.

Bull. Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ., No. 40, p.107~113 (1983).

* Variation of Protease Activity in the Pyloric Caeca of Chum Salmon During Migration.

** Naoyuki UCHIDA and Eiichi NISHIDE, Lab. Marine Biochemistry, Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ.

*** Tsune TANAKA, Course of Nutritional Science, Hakodate Junior Collage.

Pyloric caeca (3kg)

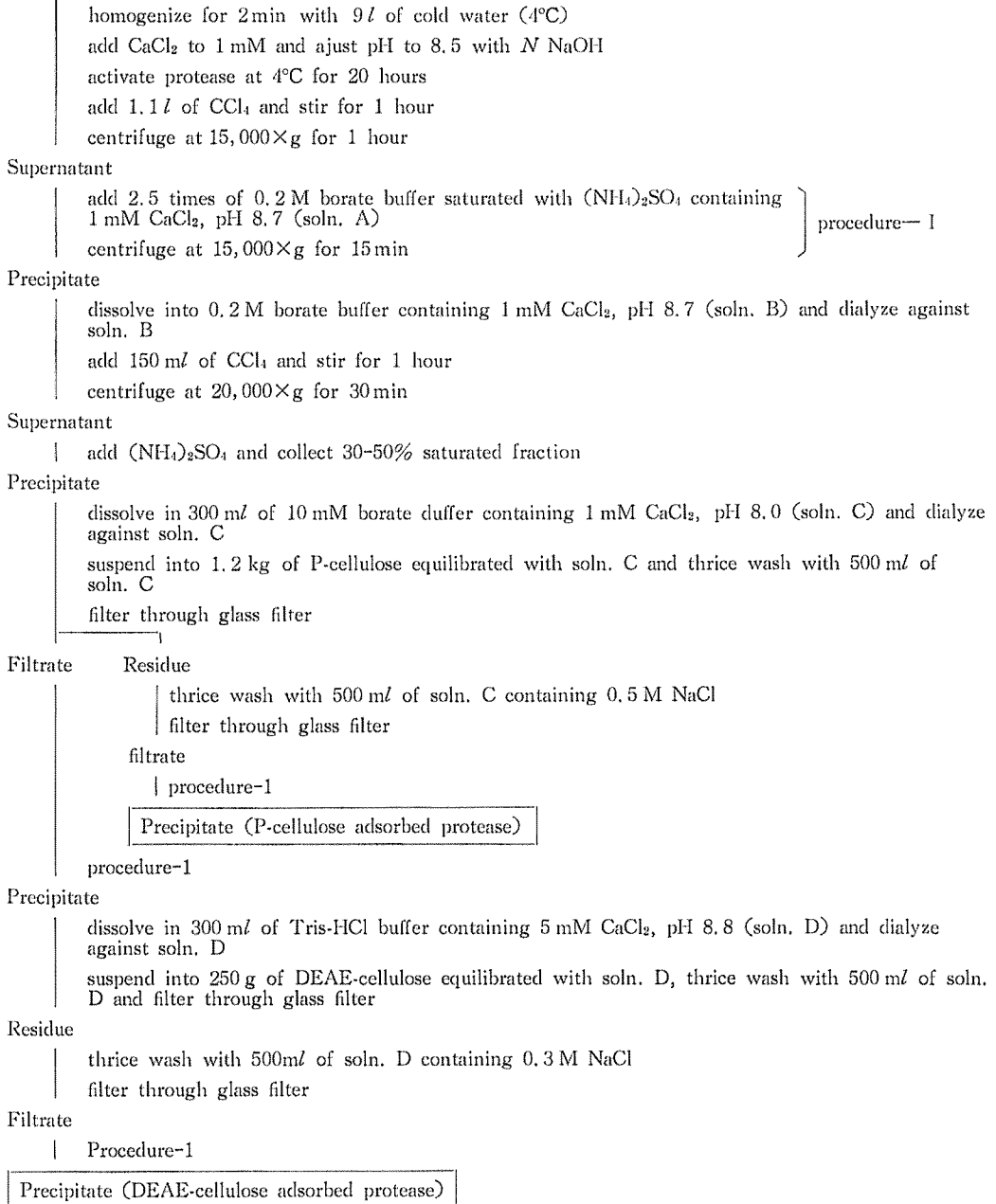


Fig. 2 Preparation procedure of P- and DEAE-cellulose adsorbed protease from the pyloric caeca of chum salmon.

サケ (*Oncorhynchus keta*) は北洋鮭鱒資源調査研究会親潮丸によって1970年3月～6月, 1972年8月～9月にかけて Fig. 1 に示す北太平洋およびオホーツク海にわたる各点で捕獲されたものを使用した。各捕獲地点, 捕獲日, 魚体平均重量および性別については Table 1 にまとめた。

プロテアーゼ構成成分の変動を測定するために用いたシロサケは1971年3月～6月にかけて親潮丸によって北太平洋およびオホーツク海で捕獲されたもの, 1971年6月に日本水産株式会社野島丸により北太平洋で捕獲されたものを用いた。

捕獲した魚体からただちに胃, 幽門垂および腸を含め

た消化器官を取り出し、 -20°C 以下に凍結して実験室に持ち帰り、半融解状態にもどし、ほかの器官が混在しないように十分注意しながら房状の幽門垂のみを切り取り -20°C に保存し適宜実験に供した。

2. 試薬

カゼインは Hammarsten の方法により調整した和光純薬工業製のものを、P-トシル-L-アルギニンメチルエステル塩酸塩 (TAME) は Nutritional Biochem 社製のものを、そのほかの試薬は和光純薬工業製の特級試薬を用いた。

3. 酵素活性測定法

1) プロテアーゼ活性

2%カゼイン-0.2M 硼酸緩衝液 (pH8.7) を基質とし、 30°C 、10分間の反応を行い、Anson-萩原⁹⁾の方法に基づいて測定した。酵素単位は1分間に生成する三塩化酢酸可溶物の量がチロシン 1 mg 当量に相当する場合の活性度を1チロシン単位のプロテアーゼ活性 (PU) とした。

2) トリプシン活性

TAME を基質とし、これを加水分解するエステラーゼ活性を Hummel¹⁰⁾の方法により測定し、トリプシン活性とした。酵素活性は pH8.4、 30°C における1分間当たりの 247 nm における吸光度変化 (ΔE_{247}) で表した。

4. タンパク質濃度の測定

Lowry らの方法¹¹⁾ に準じて測定した。なお、標準タンパク質としてはウシ血清アルブミンを用いた。

5. P-および DEAE-セルロース吸着性プロテアーゼの調製

P-および DEAE-セルロース吸着性プロテアーゼは Fig. 2 の方法により調製した。すなわち、幽門垂を冷水とホモジナイズし、pH8.5で活性化後、四塩化炭素による脱脂、硫酸による塩析を行い、30~50%飽和画分を得た。これをパッチ法により P-セルロース (Brown社製) 吸着画分と非吸着画分に分離し、この非吸着画分から更に DEAE-セルロース (Brown社製) 吸着画分を得た。

実験結果

1. プロテアーゼ活性の変動

1970年3月~6月にかけて北太平洋およびオホーツク海で捕獲した供試魚の魚体、幽門垂組織および生殖腺重量の平均値と捕獲日の関係を Fig. 3 に示す。平均魚体重量は3月~6月にかけてほぼ直線的に増加している。しかし、幽門垂組織重量は魚体重と平行せず5月中旬まではほとんど変化せず5月下旬~6月にかけて急増している。1972年8月23日および9月4日に捕獲したまったく別系統と思われる魚群においても8月23日~9月4日にか

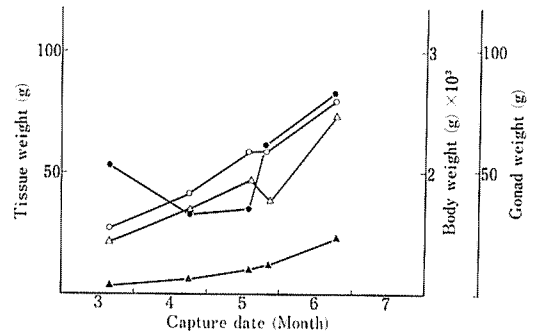


Fig. 3 Variation of average weights of the pyloric caeca tissue, the body and the gonad of chum salmon obtained from Pacific Ocean and Okhotsk Sea in 1970.

○: body, ●: tissue, △: gonad (female), ▲: gonad (male)

て魚体および幽門垂組織重量の増加が見られる (Table 2)。

これら供試魚から幽門垂を個体別に採取し、3倍量の 4°C の水を加え、ウォリングブレンダーにより 4°C に冷却下、30秒間ずつ計2分間ホモジナイズし、 4°C で12時間活性化後、 $59,000 \times \text{g}$ で30分間の遠心分離を行って得た上澄液についてプロテアーゼ活性を測定した。なお、

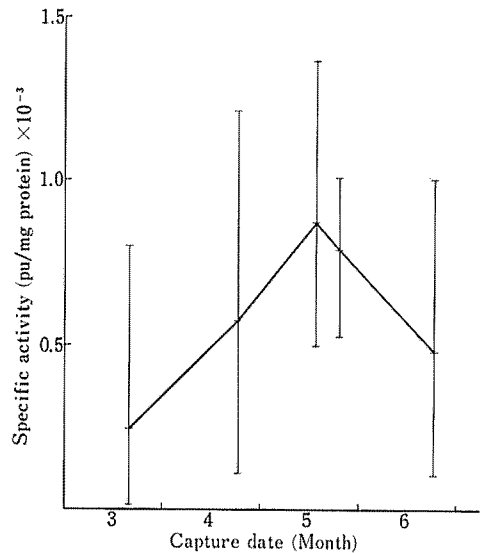


Fig. 4 Variation of the specific activities of protease in the pyloric caeca of chum salmon obtained from Pacific Ocean and Okhotsk Sea in 1970.

Perpendicular shows variation of the activity and small horizontal line shows maximum, minimum and average of the activity, and so forth.

Table 2 Protease activities in the pyloric caeca of chum salmon obtained from Okhotsk Sea in 1972

Date	Average of weight (g)				Specific activity (PU/mg of Protein)	Total activity (PU)
	body	tissue	gonad			
			F	M		
8/23	2,575	75.2	106	55	0.497×10^{-3}	0.555
9/4	3,323	100.8	172	2.2	0.221	0.456

F: female, M: male.

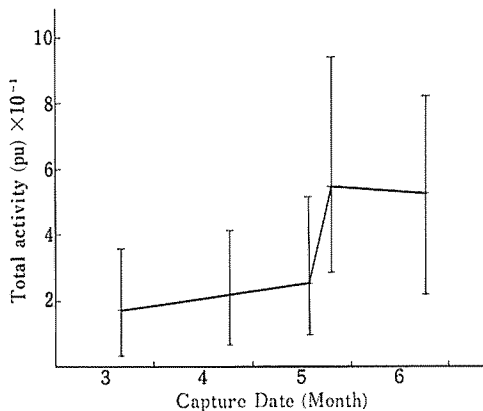


Fig. 5 Variation of the total activities of proteases in the pyloric caeca of chum salmon obtained from Pacific Ocean and Okhotsk Sea in 1970.

上澄液中のタンパク質濃度は5%三塩化酢酸沈澱物として求めた。

Fig. 4 および Fig. 5 に示すようにプロテアーゼ活性の変化は魚体および幽門垂組織重量の変化とは異なり比活性（前記上澄液中のタンパク質1 mg当りのPU）は3月～5月中旬に急激に増加し、それ以後低下した。しかし、組織中の全活性は5月中旬から下旬にかけ急増し、それ以後ははたに減少する傾向にあった。

比活性、全活性および組織重量の関係は1972年の試料についても同様な傾向が見られる。すなわち、8月23日～9月4日にかけて比活性は明らかに減少しているが、全活性は僅かに減少しているにすぎない。一方、組織重量は明らかに増加している（Table 2）。いずれの場合でも全活性の変動に先がけて比活性が変化することが観察された。

この間の幽門垂組織及び魚体重量の変動を考慮し生長期間中の幽門垂におけるタンパク質の消化様式を考えると、まず、プロテアーゼの生合成量を増加させることによりプロテアーゼ量を増加させ、タンパク質の消化をまかない魚体の生長を促進させる。魚体の生長に伴い組織が増大すると、組織量の増加により単位当たりの生合成

量を減少させても、全体としての必要酵素量をまかなっているものと推測される。

2. プロテアーゼ構成成分の変動

シロサケ幽門垂中のプロテアーゼは硼酸緩衝液を溶出液とするゲルクロマトグラフ法により数成分に分離でき、しかも分離された各成分中には更に電気的性質の異なる数成分が含まれることが示唆されている¹²⁾。このことからイオン交換およびゲルクロマトグラフ法によりプロテアーゼを分離し、各成分の消長を観察することによりプロテアーゼの質的变化を見た。

各グループ数百尾から得た幽門垂をミンチにより均一化し、そのうち3 kgを用い、P-および DEAE-セルロース吸着性プロテアーゼを得、各画分をセファデックス G-100カラム（5×105 cm）により分離した。その典型的な溶出図を Fig. 6 に示す。なお、溶出させた各フラクションについてプロテアーゼの中で生理的に重要なものの1つとされているトリプシン活性についても同時に測定した。

P-セルロース吸着性プロテアーゼは4つのプロテアーゼ活性をもつピークと3つのトリプシン活性をもつピークに、DEAE-セルロース吸着性プロテアーゼはプロテアーゼ活性とトリプシン活性ピークがよく一致する2つのピークに分離した。このうち、プロテアーゼ活性およびトリプシン活性において主成分と見なされる4つのピーク（図中、P-1、P-2、D-1 および D-2）を選びその活性と捕獲時期および捕獲地点の関係を Table 3 にまとめた。その挙動は各成分ごとに特異的であり、P-2 および D-2 はプロテアーゼおよびトリプシン活性ともに捕獲時期および捕獲地点による大きな変動はなく、P-1 および D-1 は5月～6月にかけて両活性ともに著しく増加した。この傾向は特にP-1のトリプシン活性において強い。また、この場合でも同時期の捕獲地点による差はほとんど見い出せなかった。

各成分が回遊に伴う生理変化に対してそれぞれ特異な挙動を示したことから、これらは互いに生理的に異なる意義を持つことが予測される。特に、同じトリプシン活性をもつプロテアーゼ画分がまったく異なった挙動を示

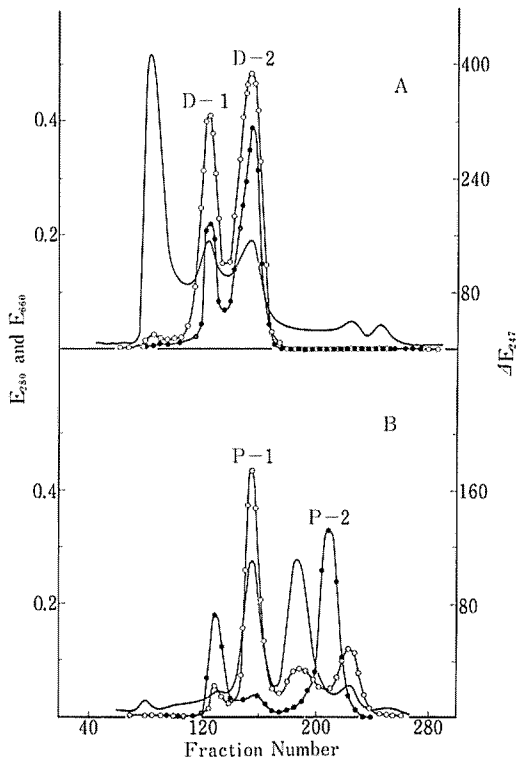


Fig. 6 Sephadex G-100 gel filtration chromatography of the DEAE-cellulose (panel A) and the P-cellulose adsorbed protease (panel B). The column (5×105cm) was equilibrated with 0.2M borate buffer containing 1mM CaCl₂ (pH 8.7). The protein (200 mg of A and 53 mg of B) was applied to the column and chromatography was operated in the cold room (3-5°C) at flow rate of 60ml per hour. Fractions of 10ml were collected. Curves are designated as follows; protein: E_{250nm} —, protease activity: E_{660nm} ○—○, trypsin activity: E_{217nm} ●—●.

すことは触媒作用が類似しているにもかかわらず生理的意義の異なる酵素を同じ組織内に持つことを意味していると考えられる。なお、これら各画分のトリプシン活性をもつ主要酵素の性質は後の研究により基本的にはウシトリプシンと類似していることが判明している(未発表)。

考 察

回遊中のシロサケの幽門垂プロテアーゼ活性は3月～5月にかけて増加し、それ以後減少する結果を得た。この結果はカツオ²⁾ およびスケトウダラ¹³⁾の幽門垂プロテアーゼ活性の時期的変化と同様な傾向であり、春～初夏

Table 3 Variation of protease and trypsin activities of fractions obtained from Sephadex G-100 gel filtration chromatography of P- and DEAE-cellulose adsorbed protease

Fraction	Capture date			
	Mar*	May*	Jun*	Jun**
	protease activity (PU/kg of tissue)			
D-1	0.130	0.149	0.244	0.252
D-2	0.152	0.156	0.176	0.147
P-1	0.111	0.136	0.308	0.319
P-2	0.049	0.033	0.054	0.071
	trypsin activity (ΔE ₂₁₇ /min/kg of tissue)			
D-1	474	546	942	1,052
D-2	744	720	716	720
P-1	15.1	26.1	149	239
P-2	128	135	192	164

* Okhotsk Sea.

** North Pacific Ocean.

Table 4 Comparison of protease activities in the pyloric caeca of mature and immature chum salmon obtained from Okhotsk Sea at August 23th, 1972

	Average of gonad weight (g)		Specific activity (PU/mg of protein)	Total activity (PU)
	F	M		
maturity	196	103	0.530×10 ⁻³	0.428
immaturity	15	3	0.463	0.682

F: female, M: male.

にかけての活性の増加は回遊性魚類における一般的な性状である可能性がある。この期間のプロテアーゼ活性の増加要因として摂餌量の増加あるいは高タンパク質含量の餌の摂取などが考えられるが、それが内的因子により索餌活動が増加したためか、餌料環境が良くなったためかは不明である。

ヤマベおよびヒメマス¹⁴⁾の幽門垂プロテアーゼ活性は産卵前に比べ産卵中あるいは産卵後に明らかに低い値を示す¹⁵⁾。この1つの原因として成熟することにより索餌活動が不活発になることが考えられている。

シロサケにおいても沿岸に近づくにしたがい活性が減少し、またこの期間に生殖腺重量が増加している。このことから、この期間の活性低下原因として成熟による索餌活動の低下が考えられる。しかし、1972年8月23日に捕獲したシロサケについて成熟したグループと未成熟グループとの活性を比較してみるとTable 4に示すように明確な相違は見い出せない。このことは必ずしも成熟による索餌活動の低下が活性低下の原因であるとは考えら

れず、沿岸における餌料環境の悪化による摂餌量の低下によるものとも考えられる。

いずれにしてもシロサケの幽門垂プロテアーゼ活性は回遊中に起こる種々の生理状態変化を良く反映して変動するものと考えられ、この変化を追跡することはシロサケを含む魚類の生活史を生化学的に解析する有効な手段となり得る。特に、プロテアーゼの構成成分変化を追跡することは魚類の生活状態の変化を知る上で更に多くの知見を与えるものと考えられる。

要 約

魚類の生理状態の変化と幽門垂中プロテアーゼ活性の関連性を明らかにするため、シロサケ幽門垂プロテアーゼ活性およびその構成成分の回遊中の変動を観察した。

北太平洋およびオホーツク海で3月～6月にかけて採取したシロサケの幽門垂プロテアーゼ活性を測定したところ、比活性は3月～5月中旬にかけ増加し、それ以後低下した。全活性は5月上旬～下旬にかけ急増しそれ以後はしだいに減少する傾向にあった。

幽門垂プロテアーゼを硫酸塩析後、P-およびDEAE-セルロース吸着性プロテアーゼに分離し、それぞれのゲルクロマトグラフ法における溶出状況の時季的变化を検討したところ、ほとんど変化しない成分と顕著な変化を示す成分が存在した。

これらのデータは幽門垂のプロテアーゼ活性およびその構成成分変化を追跡することは魚類の生活状態を生化学的に解析するために有効な手段であることを示唆するものであった。

謝 辞

本研究を進めるに当たり、終始ご指導を賜りました北海道大学水産学部名誉教授齋藤恒行博士、ならびに試料採集にご協力を賜った北海道大学水産学部島崎健二博士および日本水産株式会社鶴本多次郎氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Chesley, L.C.: (1934) The influence of temperature upon the amylase of cold and warm blooded animals. *Biol. Bull.*, **66**, 330～338.
- 2) 柏田研一: (1952) カツオの内臓酵素に関する研

究—I, 幽門垂プロテアーゼの時季的消長について, 日水誌, **18**, 151～154.

- 3) 北御門学, 立野新光: (1960) エジマス消化酵素の研究—II, Protease, 日水誌, **26**, 685～690.
- 4) 森下達雄, 野田宏行, 北御門学, 高橋 喬, 立野新光: (1964) 養殖魚の消化酵素について, 三重県立大学水産学部紀要, **6**, 239～246.
- 5) 田中 克, 川合真一郎, 山本章造: (1972) アユ仔稚魚の消化系の発達と消化酵素活性について, 日水誌, **38**, 1143～1152.
- 6) Kawai, S., and S. Ikeda: (1973) Studies on digestive enzymes of fishes—III. Development of the digestive enzymes of rainbow trout after hatching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in the juvenile stage. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **39**, 819～823
- 7) Kawai, S. and S. Ikeda: (1973) Studies on digestive enzymes of fishes—IV. Development of the digestive enzymes of carp and black sea bream after hatching. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **39**, 877～881.
- 8) 池田静徳: (1969) 魚類の消化酵素に関する展望, 昭和44年度日本水産学会秋季大会シンポジウム魚類の消化酵素講演要旨, 2～7.
- 9) 萩原文二: (1953) 標準生化学実験 (文化堂, 東京), 207～211.
- 10) Hummel, B.C.W.: (1959) A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 1393～1399.
- 11) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265～273.
- 12) 内田直行: (1971) シロサケ幽門垂蛋白質分解酵素のゲル濾過における挙動, 北大水産集報, **21**, 305～314.
- 13) 新井健一: (1969) 養殖魚ならびに北洋魚の消化酵素活性の時期的変化, 昭和44年度日本水産学会秋季大会シンポジウム魚類の消化酵素講演要旨, 15～21.

Variation of Protease Activity in the Pyloric Caeca of Chum Salmon During Migration

Naoyuki UCHIDA*, Tsune TANAKA** and Eiichi NISHIDE*

* Lab. Marine Biochemistry, Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ.

** Course of Nutritional Science, Hakodate Junior Collage

(Received October 14, 1982)

Activities of digestive enzymes of fish have been known to vary according to changes of these physiological conditions.

In the present study, we have examined variation of protease activity and these components in the pyloric caeca of chum salmon, *oncorhynchus keta*, captured at Okhotsk Sea and North Pacific Ocean from March to September.

The specific activity (PU/mg of protein) in enzyme extract reached the maximum level in the middle of May and the total activity of pyloric caeca reached the maximum level in the end of May.

Four components (P-1, P-2, D-1 and D-2) which have protease and trypsin activities could be separated

from P- and DEAE-cellulose adsorbed protease fractions by the gel filtration chromatography. Protease and trypsin activities in two components, P-2 and D-2, were nearly constant throughout the examined period. However, both activities in P-1 and D-1 components increased from March to June. Particularly, trypsin activity in P-1 component of pyloric caeca obtained at June increased about ten times as large as that of March.

These results suggest that to investigate the variation of protease activity and components in pyloric caeca is very useful for biochemical studies on physiological behaviors of fish.