

# ニジマス,サバおよびイナダ 幽門垂におけるカチオニックおよび アニオニックトリプシンの分布

誌名	日本大学農獣医学部学術研究報告
ISSN	00780839
著者	内田, 直行
巻/号	42号
掲載ページ	p. 222-227
発行年月	1985年3月

# ニジマス, サバおよびイナダ<sup>1)</sup>幽門垂におけるカチオニック およびアニオニックトリプシンの分布\*

内田直行・渡辺和義・安齋 寛・西出英一\*\*

(水産生物化学研究室\*\*)

昭和59年10月24日受理

## 緒 言

膵臓性トリプシン (EC 3. 4. 21. 4) はその電氣的性質からカチオニックおよびアニオニックトリプシンとに大別される。アニオニックトリプシンは無脊椎動物から哺乳動物まで広く分布している。しかし、カチオニックトリプシンの存在が認められているのは現在のところ脊椎動物だけである。

系統発生的に脊椎動物の下位に位置する魚類においてはハイギョ<sup>1)</sup>, コイ<sup>2)</sup>, イワシ<sup>3)</sup>およびカブリ<sup>4)</sup>などのようにアニオニックトリプシンのみをもつもの、ナマズ<sup>5)</sup>, フナ<sup>6)</sup>, マスノスケ<sup>7)</sup>およびシロサケ<sup>8)</sup>のように両者をもつものが存在する。これらのことから、魚類における両酵素の分布は系統発生的および比較生化学的な観点から興味ある問題である。そこで今回は両酵素の分布を調べる簡便な手段としてクロマトフォーカシングの適用を検討し、さらに、3魚種の幽門垂トリプシンの分布を調べた。

## 材料および方法

### 1. 試料

サバ *Pneumatophorus japonicus* およびイナダ *Seriola quinqueradiata* は東京都中央卸売市場築地市場にて新鮮なものを、ニジマス *Salmo gairdnerii* は神奈川県小田原市の養魚場にて入手した。入手後直ちに氷冷し、実験室に持ち帰り、幽門垂のみを採取して-30°Cに保存し、適宜実験に供した。

### 2. 試薬

p-トシル-L-アルギニンメチルエステル塩酸塩 (TAM E) は Koch-Light Laboratories Ltd., ポリバツファ交換体 (PBE 94), ポリバツファ-96および74は Pharmacia

Fine Chemicals, ウマ心臓チトクロム c およびウシ血清アルブミンは SIGMA Chemical Company より入手した。その他の試薬は和光純薬工業製の特級試薬を用いた。

### 3. 粗酵素の調製

Fig. 1 にしたがって調製した、すなわち、細切した幽門垂を 1 mM 塩化カルシウムを含む 0.2 M 硼酸緩衝液 (pH 8.7) でホモジナイズし、活性化後、四塩化炭素による脱脂、硫酸アンモニウムによる塩析を行い 70% 飽和画分を得、これを粗酵素とした。

### 4. クロマトフォーカシング

20 mM 塩化カルシウムを含む 25 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 8.2 (開始緩衝液) を用いて平衡化した PBE 94 カラム (1×20 cm) に、少量の開始緩衝液に溶解し、同

#### Pyloric caeca (50 g)

Homogenize for 2 min with 150 ml of 0.2 M borate buffer containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.7.

Activate trypsin at 3-5°C for 20 hr.

Add 25 ml of CCl<sub>4</sub> and stir for 1 hr, and centrifuge at 15,000×g for 30 min.

#### Supernatant

Add 2.5 times of 0.2 M borate buffer saturated with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.7, and centrifuge at 15,000×g for 15 min.

#### Precipitate

(Crude enzyme fraction)

Fig. 1 Preparation procedure of the crude enzyme fraction from pyloric caeca. All operations were performed at 3-5°C.

Bull. Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ., No. 42, p. 222~227 (1985).

\* Distribution of Anionic and Cationic Trypsins in the Pyloric Caecas of Rainbow Trout, Mackerel and Yellow-tail.

\*\* Naoyuki UCHIDA, Kazuyoshi WATANABE, Hiroshi ANZAI and Eiichi NISHIDE, Lab. Marine Biochemistry, Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ.

緩衝液に透析した後、 $15,000\times g$ 、30分間の遠心分離により得た粗酵素溶液 5 ml を重層した。引き続き、50 ml の開始緩衝液、300 ml の溶出緩衝液（ポリバッファ-96：ポリバッファ-74（1：2）-塩酸，pH 4.0， $7.5\ \mu\text{mole/pH}$  単位/ml），次に 100 ml の 1 M NaCl を含む開始緩衝液で順次溶出した。流速は 10 ml/hr とし、1 フラクション当たり 125 ドロップで分画した。

#### 5. トリプシン活性の測定法

前報<sup>9)</sup>にしたがって HUMMEL の方法<sup>10)</sup>により測定した。

#### 実験結果および考察

本条件によるクロマトフォーカシングの分離状態を見るため、等電点既知のウマ心臓チトクロム C（等電点 10.1<sup>11)</sup>）およびウシ血清アルブミン（4.7～4.9<sup>11)</sup>）を本条件下で分離した。その結果、Fig. 2 に示すようにチトクロム C は pH 8.1 以上の画分に、またウシ血清アルブミンは pH 4.5～4.7 に溶出され、本条件での溶出はタンパク質の等電点をよく反映しており、溶出されるトリプシ

ンを電気的性質に基づいて分類するには十分な分離能力をもつものと判断された。また、本条件下のクロマトフォーカシングによるサバ幽門垂中のトリプシン活性の回収は約 70% と良好であったことから（Fig. 3），本法は魚類幽門垂中のトリプシン分布の検討に適用できるものと考えた。

サバ、ニジマスおよびイナダ幽門垂トリプシンのクロマトフォーカシング溶出図をそれぞれ Fig. 3, 4 および 5 に示す。また、これらの結果を Fig. 6 にまとめた。

この結果から明らかなように、3 種いずれにおいてもアニオン性およびカチオン性トリプシンの存在が確認された。また、それらの溶出図は 3 魚種間で明らかに異なっており、それぞれ電気的に性質の異なる数種のトリプシンをもつことが明らかとなった。すなわち、ニジマスでは 2 種のカチオン性（等電点 8.4 以上）と 2 種のアニオン性トリプシン（等電点 5.6 および 4.3 以下）が確認され、3 魚種間で最も簡単な溶出図を示した（Fig. 4）。サバには 1 種のカチオン性（等電点 8.2 以上）と 5 種

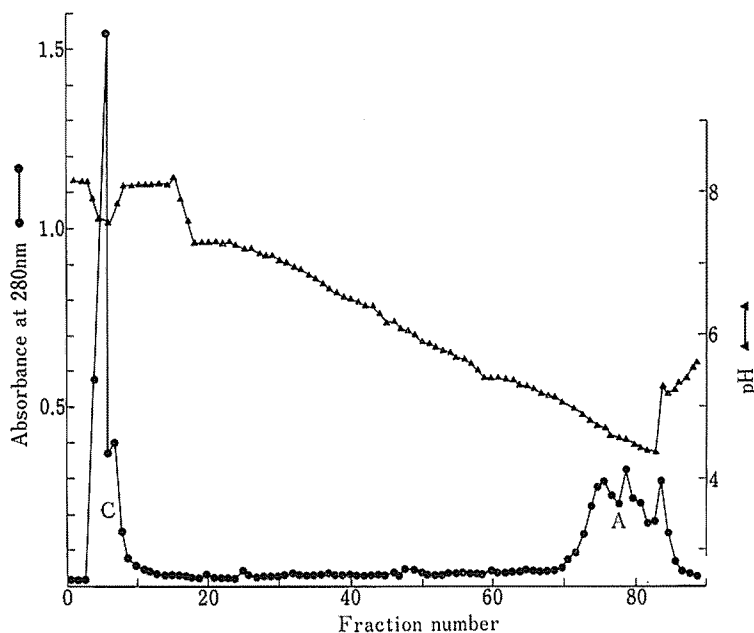


Fig. 2 Chromatofocusing of horse heart cytochrome c (C) and bovine albumine (A) on polybuffer exchanger (PBE 94) column.

Horse heart cytochrome c and bovine albumine were dissolved in the starting buffer (25 mM Tris-HCl containing 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8.2) and dialyzed against the same buffer. Protein solution (5 ml) was applied to the column equilibrated with the starting buffer and then continuously eluted with 50 ml of the starting buffer, 300 ml of polybuffer (polybuffer 96 : polybuffer 74 (1:2)-HCl, pH 4.0,  $7.5\ \mu\text{mol/pH}$  unit/ml) and 100 ml of the starting buffer containing 1 M NaCl. Chromatofocusing was operated in the cold room (3-5°C) at a flow rate of 10 ml/hr and fractions of 125 drops were collected.

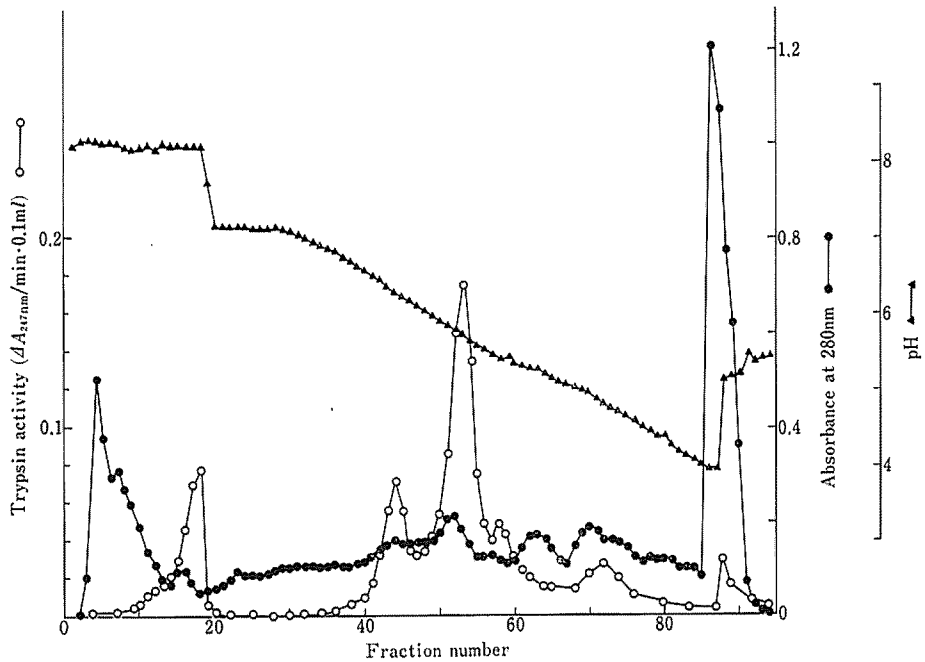


Fig. 3 Chromatofocusing of the crude enzyme fraction from the pyloric caeca of meckerel on PBE 94 column.

Trypsin activities in fractions were assayed at 30°C in 50 mM Tris-HCl, pH 8.4 according to the method of HUMMEL<sup>10)</sup>. The other conditions are described in the legend to Fig. 2.

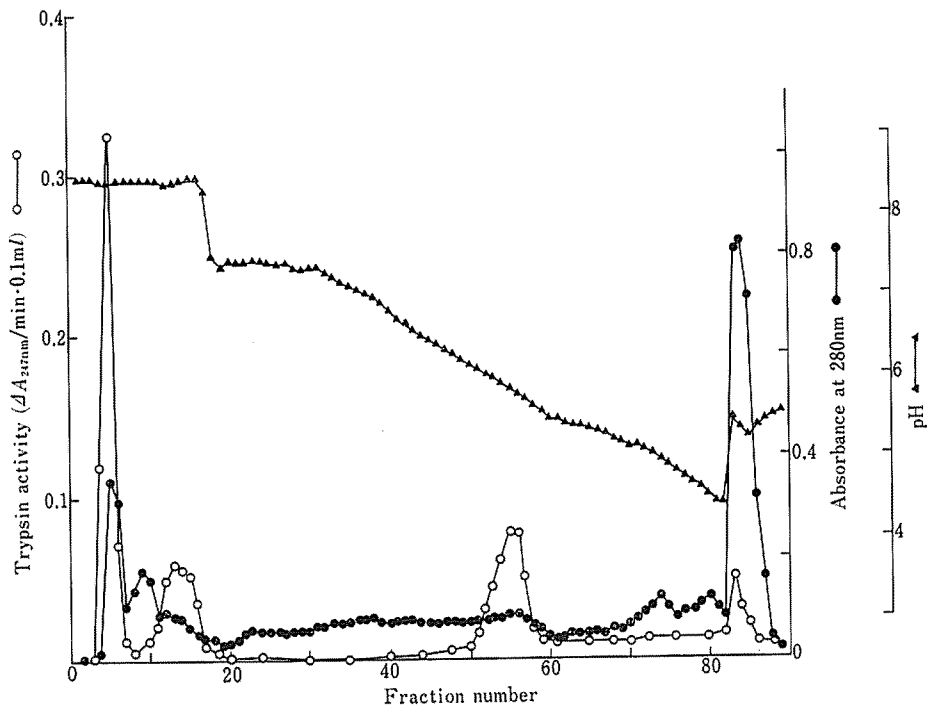


Fig. 4 Chromatofocusing of the crude enzyme fraction from the pyloric caeca of rainbow trout on PBE 94 column.

The chromatofocusing conditions are described in the legend to Fig. 3.

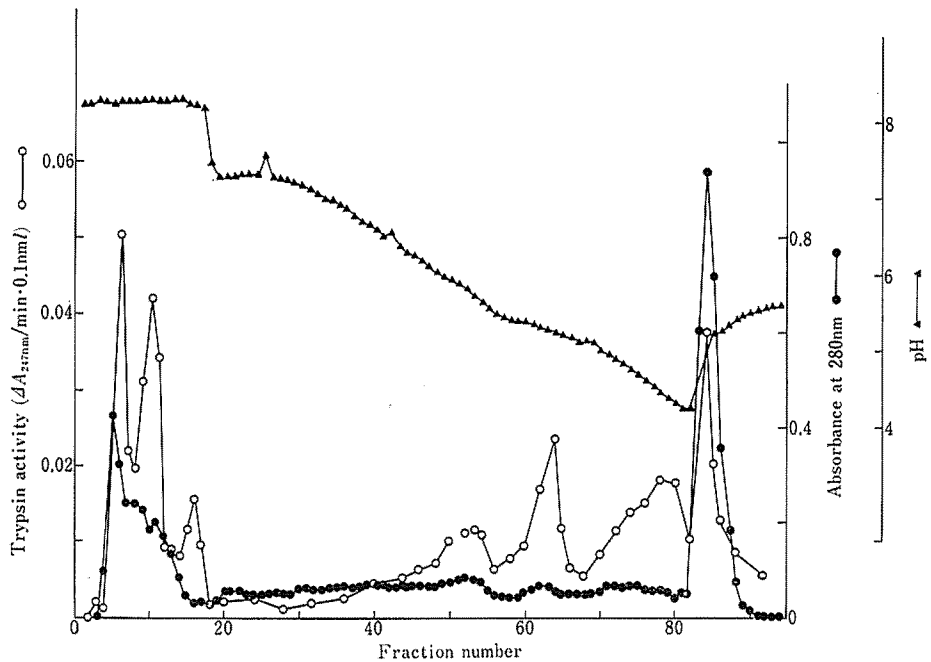


Fig 5 Chromatofocusing of the crude enzyme fraction from the pyloric caeca of yellowtail on PBE 94 column.

The chromatofocusing conditions are described in the legend to Fig. 3.

のアニオンックトリプシン (等電点6.3, 5.8, 5.4, 4.6 および4.0以下)が存在した (Fig. 3)。イナダは3魚種間中最も複雑な溶出図を示し, 3種のカチオンック (等電点8.3以上)と4種のアニオンックトリプシン (等電点5.7, 5.3, 4.5および4.2以下)の存在を示した(Fig. 5)。

ここで検討した3魚種いずれにおいても複数のトリプシンの存在が確認された。魚類は一般に複数のトリプシンをもつものが多い。例えば, ハイギョ<sup>11)</sup>では4種, コイ<sup>12)</sup>で4種, カブリン<sup>13)</sup>では2種のアニオンックトリプシンが, シロサケ<sup>14)</sup>では1種のカチオンックと7種のアニオンックトリプシンの存在が報告されている。これらのことから, 複数のトリプシンをもつことが魚類の特性と予測される。また, いずれにおいてもアニオンックおよびカチオンックトリプシンが存在した。このことは魚類一般に両酵素をもつ可能性があり, 現在までカチオンックトリプシンの存在が知られていない魚種について再検討が必要と思われる。さらに, それぞれが特異的な溶出図を示したことから, トリプシンの分布に種特異性を示す可能性があり, 今後さらに他種についても検討する必要があると思われる。魚類アニオンックトリプシンはその pH 安定性, EDTA による不安定化など特異的な性質をもつことが明らかになっている<sup>12,13)</sup>。カチオンックおよびアニオンックトリプシンの分布と併せこれらの点を広く検討する手段として本法は優れていると言える。

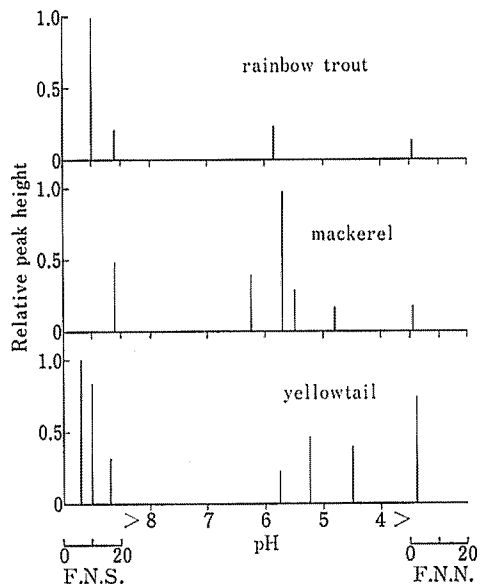


Fig. 6 Summary of elution profiles of the trypsins from the pyloric caecas of rainbow trout, mackerel and yellowtail by chromatofocusing on PBE 94 column.

F.N.S: fraction number eluted with starting buffer.

F.N.N: fraction number eluted with the starting buffer containing 1 M NaCl.

## 要 約

魚類幽門垂トリプシンの分布を調べるために、ポリバフファ交換体 (PBE 94) カラムを用い、ポリバフファ-96:ポリバフファ-74 (1:2)-塩酸、pH 4.0を溶出液とするクロマトフォーカシングによる分離を検討した。

その結果、ニジマス、サバ、イナダの幽門垂中にはカチオニックおよびアニオニックトリプシンが存在し、3種間で溶出図が明らかに異なることが判明した。

これらのことより、本法は魚類幽門垂トリプシンの分布を比較検討するために非常に有効な手段であると考えられた。

## 文 献

- 1) Haën, C., K.A. Walsh and H. Neurath: (1977) Isolation and aminoterminal sequence analysis of a new pancreatic trypsinogen of the african lungfish, *protoperus aethiopicus*, *Biochemistry*, **16**, 4421~4425.
- 2) Cohen, T., A. Gertler and Y. Birk: (1981) Pancreatic proteolytic enzymes from carp, *cyprinus carpio*, I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B. *Comp. Biochem. Physiol.*, **69B**, 639~646.
- 3) Murakami, K. and M. Noda: (1981) Studies on proteinase from the digestive organs of sardine-I Purification and characterization of three alkaline proteinases from the pyloric caeca. *Biochim. Biophys. Acta*, **658**, 17~26.
- 4) Hjelmeland, K. and J. Paa: (1982) Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the arctic fish capelin, *mallotus villosus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **71B**, 557~562.
- 5) Yoshinaka, R., T. Suzuki, M. Sato and S. Ikeda: (1983) Purification and some properties of anionic trypsin from the catfish pancreas. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 207~212.
- 6) Jany, K.D.: (1976) Studies on the digestive enzymes of the stomachless bonefish, *carassius auratus gibelio* (bloch): endopeptidases. *Comp. Biochem. Physiol.*, **53B**, 31~38.
- 7) Croston, C.B.: (1965) Endopeptidases of salmon ceca: Chromatographic separation and some properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, **112**, 218~223.
- 8) 内田直行, 塚山貴以子, 西出英一: (1984)シロサケ幽門垂トリプシンの精製と2, 3の性質. 日本誌, **50**, 129~138.
- 9) 内田直行, 田中ツネ, 西出英一: (1983)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. 本誌, **40**, 107~113.
- 10) Hummel, B.C.W.: (1959) A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 1393~1399.
- 11) 日本生化学会編: (1979)生化学データブック I (東京化学同人, 東京), 91~135.
- 12) 内田直行, 塚山貴以子, 西出英一: (1984)シロサケ幽門垂に存在する2種の主要アニオニックトリプシンの性質. 日本誌, **50**, 313~321.
- 13) Yoshinaka, R., M. Sato, T. Suzuki and S. Ikeda: (1984) Enzymatic characterization of anionic trypsin of the catfish, *parasilurus asotus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **77B**, 1~6.

Distribution of Anionic and Cationic Trypsins in the  
Pyloric Caecas of Rainbow Trout, Mackerel and Yellowtail

Naoyuki UCHIDA, Kazuyoshi WATANABE, Hiroshi ANZAI  
and Eiichi NISHIDE

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

(Accepted October 24, 1984)

The trypsins from the pyloric caecas of rainbow trout, *salmo gairdnerii*, mackerel, *pneumatophorus japonicus*, and yellowtail, *seriola quinqueradiata*, were separated by chromatofocusing on polybuffer exchanger (PBE 94) column with eluent of polybuffer (pH 4.0) to examine distribution of anionic and cationic trypsins in the pyloric caeca of fishes.

All three fishes had the anionic and the cationic trypsins and they were distinctly different in the elution profiles.

Rainbow trout had two cationic trypsins having

isoelectric point (IP) above 8.4 and two anionic trypsins having IP of 5.6 and below 4.3. Mackerel had one cationic trypsin having IP above 8.2 and five anionic trypsins having IP of 6.3, 5.8, 5.4, 4.6 and below 4.0. Yellowtail had three cationic trypsins having IP above 8.3 and four anionic trypsins having IP of 5.7, 5.3, 4.5 and below 4.2.

These results indicated that this method was effective for examining distribution of trypsins in the pyloric caecas of fish.