

学位論文題名

Studies on Hydrolytic Enzymes from the Liver of
Neon Flying Squid

（アカイカ肝臓加水分解酵素の精製と性質）

学位論文内容の要旨

アカイカの肝臓（以下肝臓）は肝臓中に含まれる各種酵素の活性が非常に強い。そのため自己消化作用の進行が速く、アカイカ肝臓の利用には困難が伴う。このため現状ではその大半が大量に廃棄されている。したがって、もしアカイカの肝臓に含まれる各種の有用酵素を利用することが可能になれば、資源の有効利用や廃棄物処理の負担の軽減に大きく貢献し得る。

本研究では有用加水分解酵素としてアカイカの肝臓よりリパーゼとプロティナーゼを分離することを試み、得られた酵素についてその性質を検討し、併せて分離した酵素を用いて新たな利用法についても検討を行った。

アカイカの肝臓をアセトン、酢酸エチル、ジエチルエーテルなどの有機溶媒で脱脂処理をして得た粗酵素（比活性 20.0 units/mg）を、ふっ化フェニルメチルスルホンで処理後、DEAE-セルロース・イオン交換クロマトグラフィー（比活性 72.3 units/

mg), セファデックス G-100ゲル浸透クロマトグラフィー (比活性 159.2 units/mg), 調製ディスク電気泳動法の各精製法を経てリパーゼを分離した。本酵素の分子量は約 33,000 (SDS-PAGE) であり, 水溶液中では活性を有しないこと, 乳化系や逆ミセル系で活性を発現することから本酵素がエステラーゼやクチナーゼを含まずリパーゼのみより成ることを確認した。さらにアンチパイン, ペプスタチン A, トリプシン・インヒビターなどの各種プロテアーゼ・インヒビターの有無による活性の比較によっても差がみられなかったことから, 本酵素中にプロテアーゼが混在していないことを確かめた。なお, 本リパーゼの活性発現にはコファクターの共存が不可欠であった。このリパーゼの至適 pH は 7.0, 至適温度は 25℃ であり, 至適温度の特異性として低温側にあることを認めた。

本リパーゼによる各種脂質並びに個々の脂質分子種の加水分解のタイムコースの解析より, 本酵素はランダム型であり, とくにオレイン酸に対して優先的に作用することが判明した。

ついで, アカイカ肝臓プロティナーゼ (セリン・プロティナーゼ) の基本的性質とタンパク質類似物プラスチン合成への応用について検討した。

アカイカ肝臓のアセトン沈澱物を粗酵素 (比活性 15.56 units/mg) とし, これを DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー (比活性 98.37 units

/mg) 及びセファデックス G-100ゲル浸透クロマトグラフィーに供してプロティナーゼを精製した。その比活性は 847.50 units/mgで粗酵素のそれと比較して55倍の比活性を有していた。SDS-PAGEザイモグラムによる分子量推定の結果、本プロティナーゼの分子量は24,000、加水分解至適 pHは5.0であり、pH 4から7の範囲で安定であった。至適温度は37℃であり、また温度安定性も37℃まで安定であることを認めめた。ジチオスレイトール、L-システイン、グルタチオン、カリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウムのイオン等によって活性化し、ヨード酢酸、大豆トリプシンインヒビター、鉄(2価)、水銀、銀の各イオン等によって活性が阻害されることを認めた。

アカイカ肝臓の加水分解物を濃縮し、本プロティナーゼを再添加することによりタンパク質類似物のプラスチンを合成した結果、ハンター白色度が58-65のプラスチンを得ることができた。48時間のプラスチン合成反応では、生成プラスチンのアミノ酸組成はアカイカ肝臓タンパク質のそれとほぼ同一であったが、反応96時間ではリジンとトリプトファンが減少し、逆にアスパラギン酸、グルタミン酸、アラニンなどのアミノ酸が増加した。このことからアカイカ肝臓のプロティナーゼによる反応条件を調節することによって栄養性を考慮したプラスチンを合成できることが示唆された。

以上より、経費等はかかるが、廃棄物再利用の視点から、アセトン可溶部より得られる脂質はもとより、本酵素と内臓加水分解物は餌料等の用途に十分に耐え得えることを認めた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 羽 田 野 六 男

副 査 教 授 関 伸 夫

副 査 助 教 授 高 橋 是 太 郎

学 位 論 文 題 名

Studies on Hydrolytic Enzymes from the Liver of Neon Flying Squid

(アカイカ肝臓加水分解酵素の精製と性質)

アカイカの肝臓(以下肝臓)に含まれる各種酵素は活性が非常に強い。そのため自己消化作用の進行が速く、アカイカ肝臓の利用には困難が伴い、その大半が大量に廃棄されている現状にある。本研究は、アカイカの肝臓に含まれる有用酵素のリパーゼとプロティナーゼを利用することを目的として行ったものである。

本研究では以下の4点を明らかにした。

(1) アカイカの肝臓をアセトン、酢酸エチル、ジエチルエーテルなどの有機溶媒で脱脂処理をして得た粗酵素を、ふっ化フェニルメチルスルホニルで処理後、DEAE-セルロース・イオン交換クロマトグラフィー、セファデックスG-100ゲル浸透クロマトグラフィー、調製ディスク電気泳動法の各精製法を経てリパーゼを分離、精製した。本酵素の分子量は約33,000(SDS-PAGE)であり、水溶液中では活性を有しないこと、乳化系や逆ミセル系で活性を発現することから本酵素がエステラーゼやクチナーゼを含み、リパーゼのみより成ることを確認した。さらにアンチパイニン、ペプスタチンA、トリプシン・インヒビターなどの各種プロテアーゼ・インヒビターの有無による活性の比較によっても差がみられなかったことから、本酵素中にプロテアーゼが混在していないことを確かめた。このリパーゼの至適pHは7.0、至適温度は25℃であり、至適温度の特異性として低温側にあることを認めた。なお、本リパーゼの活性発現にはコファクターの共存が不可欠であった。

(2) このリパーゼによる各種脂質並びに個々の脂質分子種の加水分解のタイムコースの解析より、本酵素はランダム型であり、とくにグリセリドに結合しているオレイン酸に対して優先的に作用することを認めた。

(3) アカイカ肝臓のアセトン沈澱物を粗酵素とし、これをDEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー及びセファデックスG-100ゲル浸透クロマトグラフィーに供してセリン・プロティナーゼを精製した。その比活性は847.50 units/mgで粗酵素のそれと比較して55倍の比活性を有していた。SDS-PAGEザイモグラムによる分子量推定の結果、本プロティナーゼの分子量は24,000、加水分解至適pHは5.0であり、pH4から7の範囲で安定であった。至適温度は37℃であり、また温度安定性も37℃まで安定であることを認めた。ジチオスレイトール、L-システイン、グルタチオン、カリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウムの各イオンによって活性化し、ヨード酢酸、大豆トリプシンインヒビター、鉄(2価)、水銀、銀の各イオンによって活性が阻害されることを認めた。

(4) アカイカ肝臓の加水分解物を濃縮し、本プロティナーゼを再添加することによりタンパク質類似物のプラスチンを合成した結果、ハンター白色度が58-65のプラスチンを得ることができた。このプラスチンのアミノ酸組成を検討した結果、アカイカ肝臓のプロティナーゼによる反応条件を調節するこきによって栄養性を考慮したプラスチンを合成できるとことが示唆された。以上より、経費等はかかるが、廃棄物再利用の視点から、アセトン可溶部より得られる脂質はもとより、本酵素と内臓加水分解物は餌料等の用途に十分に耐え得ることと認められた。

よって、本論文はアカイカ肝臓が大量に廃棄され、現状に於ては資源の有効利用や廃棄物処理の負担の軽減に大きく貢献し得る点があり、利用方法を提示した内容として評価される。審査員一同は、学術的立場から、博士(水産学)の学位を授け、格があるものと判定した。