

ヒトデ消化系中のコンキオリン分解酵素について

石原忠・保田正人

A Study of the Conchiolin-Decomposing Enzyme Present in the Digestive Organs of the Starfish

Tadashi ISHIHARA and Masato YASUDA

An organic matter, which is present in small quantities in shells and pearls together with calcium carbonate, was named conchiolin by FREMY, and later, through the studies made by many researchers, it proved to be a kind of protein. The amino acid compositions and the structures of conchiolins, which are obtained from various species of molluscs, have been known to be different from one another. Few studies had been made on conchiolin till recently, but the development of the studies on pearls and the investigation on the calcium metabolism of molluscs-shells have promoted the studies on conchiolin. Nevertheless, very few studies have been reported on the enzymatic decomposition of conchiolin.

It is a very interesting phenomenon in nature that shellfish are eaten away by other aquatic animals, for example, starfish or some snails. The authors have detected a kind of enzyme decomposing conchiolin in the digestive organs of starfish (*Asterina pectinifera*) and purified it by the salting-out method with ammonium sulfate and by the use of DEAE-cellulose columns. The authors also investigated enzymatic properties of the purified enzyme, namely the optimum pH and temperature and the effects of metal ions.

緒 言

硬蛋白質に属するコンキオリンは軟体動物の貝殻や真珠中に炭酸カルシウムと共に数パーセント含有されており、研究例は非常に少なかったが近年真珠の研究や軟体動物の貝殻形成、カルシウム代謝の研究の進展と共にこの分野も注目される様になった。田中・波多野等¹⁻⁵⁾は真珠およびアコヤガイ貝殻のコンキオリンのアミノ酸組成について、更にその分画や、末端アミノ酸の検討、また比較生化学的見地からカルシウム代謝とコンキオリンの生成の関係についても研究を進めている。しかしコンキオリンの酵素的分解についてはコラーゲナーゼやエラスターゼのような硬蛋白質分解酵素に比較すると全く業績はみられない。自然界において二枚貝が巻貝や他の水棲動物に食害される現象を見ると、単に理化学的作用のみとは断定出来ず酵素作用の存在も充分考えられる。著者等はイトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) の消化系についてアサリ貝殻コンキオリンを基質とした場合の分解酵素の存否を調べ、認めたのでその酵素の二、三の性質、至適 pH、至適温度、および金属イオンによる影響を検討した。

実験方法および成績

実験材料：イトマキヒトデは長崎市網場沿岸で採集した生きたものを -10°C に凍結、

直ちに解剖し消化系を取り出し使用した。

粗酵素液：イトマキヒトデ消化系を 0°C 近くの低温で5倍量の蒸留水と共にホモゲナイズし遠心沈澱にて上澄液をとり、これを粗酵素液とした。

基質：アサリ貝殻をFig. 1の方法で処理して基質を得た。

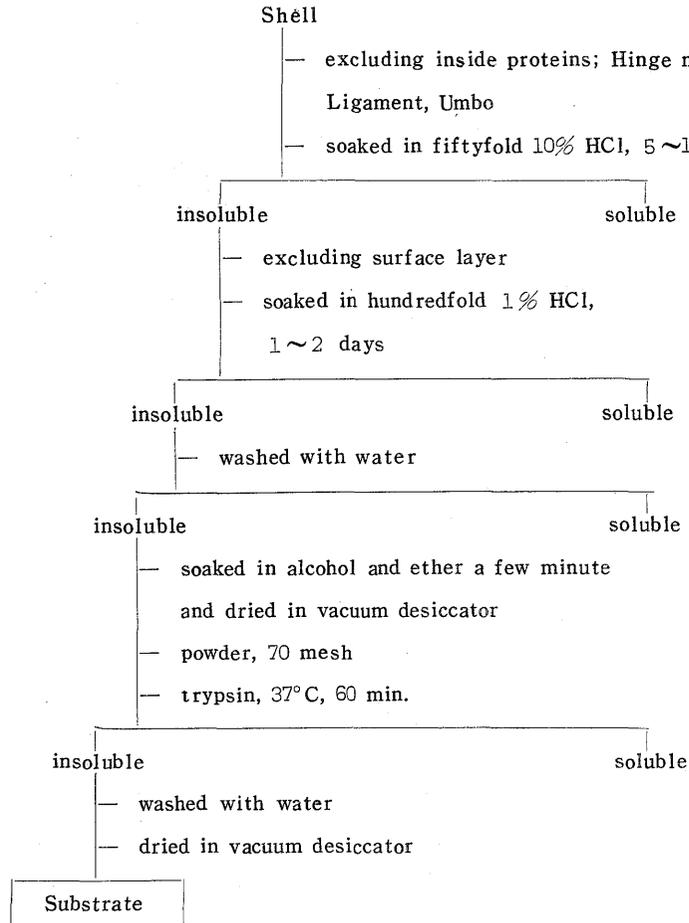


Fig. 1. Preparation of the substrate from shell.

反応測定方法：基質20mg，緩衝液（ $\text{M}/15\text{KH}_2\text{PO}_4$ ， $\text{M}/15\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ， $\text{pH } 7.5$ ）4 ml を10分間 35°C にプレインキュベイトした後，酵素液 2 mlを加え 35°C で60分間攪拌しながら放置後，TCA溶液（ $0.1\text{MCCl}_3\text{COOH}$ ， $0.2\text{MCH}_3\text{COONa}$ ， $0.3\text{MCH}_3\text{COOH}$ ）6 mlを添加して反応を止める。これを30分間放置後濾過し濾液の一定量を取り，その中に含まれるチロシンを銅フォーリン法⁶⁾によって発色させ $660\text{m}\mu$ の吸光度を測定し蛋白質の分解量を比較した。盲試験は酵素液にTCA溶液添加後直ちに同量の基質を加えて発色させた。なお酵素の比活性はマイクロセルダール法による酵素溶液のN量，またはその $280\text{m}\mu$ の吸光度をもとにして表わした。

I 酵素の精製方法

1. 硫酸アンモニウムによる塩析

粗酵素液を5°C に保ち硫酸アンモニウムで塩析を行ない、各分画の遠心沈澱にて得た不溶物を冷水に溶解し、蒸留水を外液としセルロースチューブを用いて24時間流水透析後、所定の条件で反応させ、その結果硫酸アンモニウム飽和度0.3~0.6分画にコンキオリンを分解する酵素が存在した。一方1%カゼインを基質とした場合には0.5飽和に多量の分解酵素が沈澱して来た。結果をFig. 2 に示す。

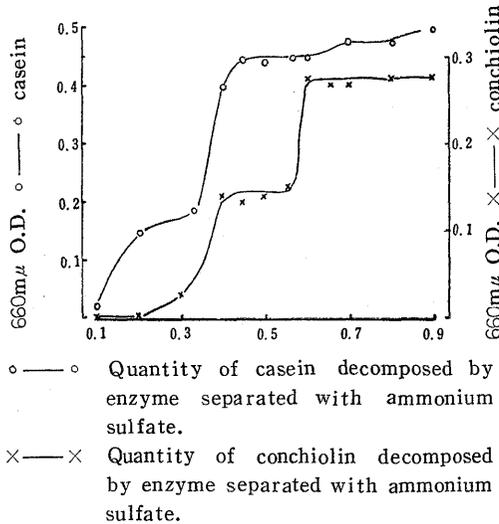


Fig. 2. The separation of the crude enzyme by salting out with ammonium sulfate.

2. セルロースカラムによる精製,

硫酸アンモニウム飽和度0.3~0.6で得た酵素液を次に冷アセトンによる沈澱で精製を試みたところ、40~90%アセトン飽和で目的とする酵素の沈澱をみたが活性が著しく低下し精製手段として好ましくはなかった。ついでDEAEセルロースカラムによる精製を行なった。操作は硫酸アンモニウム0.3~0.6飽和で生じた沈澱酵素を前処理として0.002M トリスリン酸緩衝液のpH7.0に溶解し同緩衝液を外液とし5°Cで24時間透析をしながら緩衝化したものを分画した。分画には0.002M トリスリン酸緩衝液で緩衝化した DEAEセルロースを1.7×20cmにし、これに酵素

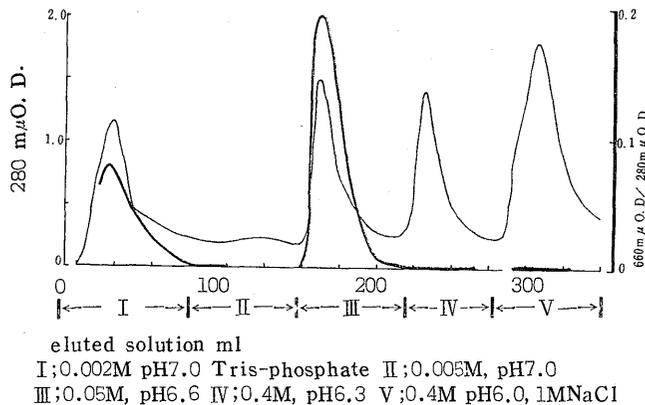


Fig. 3. Elution pattern resulting from the DEAE cellulose column chromatography of the salted out enzyme which decompose conchiolin.

液を流入しステップワイズ法で溶出を行なった。蛋白質の流出曲線は280mμの吸光度で表わし結果をFig. 3に示す。コンキオリン分解の活性は最初の流出部にも若干存在するが0.05M溶出部が最も強く認められた。さらに0.4M緩衝液、ついで同緩衝液に1M塩化ナトリウムを添加しpH6.0にて溶出を行なうといずれも多量の蛋白質を見たが、これには活性を認めなかつ

た。またCMセルロースによる精製では溶出蛋白部のどこにも活性は認められなかった。

II 酵素の二、三の性質

前記実験でCMセルロースを用いた場合不活性となったことは酵素反応に必要な金属イオンがカラム担体に吸着されたためと考えられるので金属イオンの酵素作用に対する影響を調べて見た。数種の金属塩化物の溶液 ($1 \times 10^{-2}M$) を外液として塩析酵素を24時間透

Table 1. Activity after dialysis in several metal salt solution of conchiolin-decomposing enzyme.

Dialysis solution ($1 \times 10^{-2}M$)	pH at the dialysis	Immediately		After 3 days ($5^{\circ}C$)		Decrease of activity after 3 days
		660m μ O.D	Ratio	660m μ O.D	Ratio	
Control (aq. dist)	5.2	0.106	100	0	0	1
ZnCl ₂	5.0	0.080	75			
CaCl ₂	5.2	0.084	79			
BaCl ₂	5.2	0.096	91			
MgCl ₂	5.2	0.100	94			
CoCl ₂	5.2	0.124	132	0.120	130	2
MnCl ₂	5.2	0.158	150	0.080	87	45

析したところ Table 1 の結果を得た。Co⁺では活性化および保護作用を、Mn⁺は活性化作用のみを持っているが、その他のZn⁺, Ca⁺, Ba⁺, Mg⁺では逆に若干の活性低下が見られた。

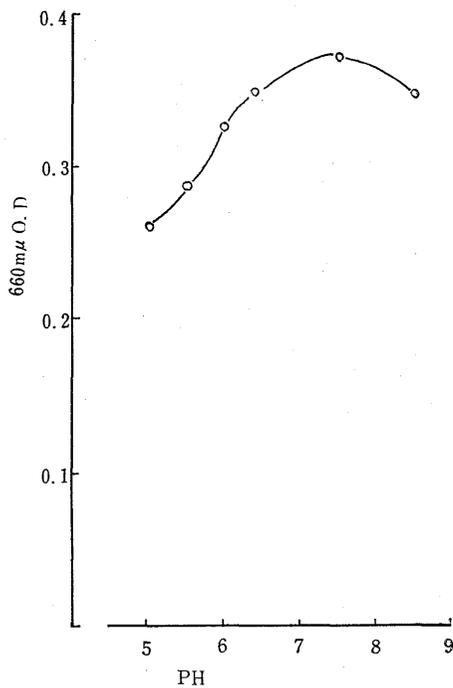


Fig. 4. Effect of pH on the activity of purified enzyme.

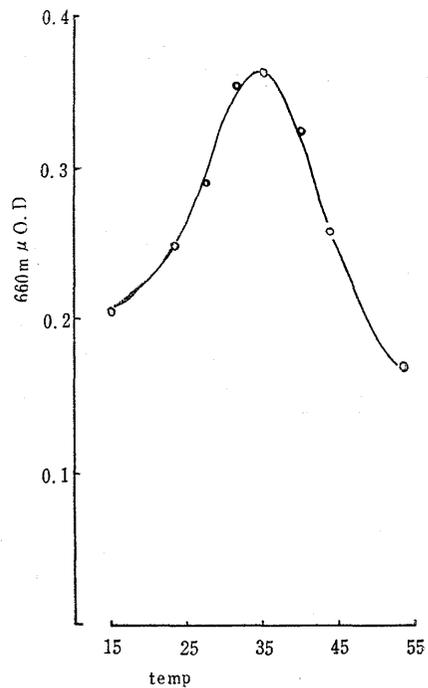


Fig. 5. Effect of temperature on the activity of purified enzyme.

次にDEAEセルロースによる0.05M緩衝液溶出部の酵素を用い、反応最適温度、および最適pHを検討した結果、温度影響は35°C前後を最適とし20°C、40°Cではかなりの低下が見られた。pHは7.0~8.0が最適と思われる。結果をFig.4,5に示す。

III 精製による酵素活性比の上昇

上記の酵素精製による活性比の上昇をみるとTable 2 のようになった。反応条件は前記同様である。活性比は酵素中のN量を測定し、それに対する銅フォーリン法による吸光度

Table 2. The increase of activity of enzyme through the steps of its purification.

Enzyme	Nmg/ml-enz	660m μ O.D	660m μ O.D/mgN	Increase of activity
Crude enzyme	2.10	0.098	0.041	100
dialyzed with water	1.05	0.078	0.074	180
dialyzed with CoCl ₂ solution	1.03	0.124	0.120	292
precipitated with 40~90% acetone	0.53	0.038	0.072	173
purified enzyme	0.09	0.060	0.660	1624

をもって表わした。アセトン処理酵素は塩析酵素に -10°C のアセトンを少量づつ加えアセトン40~90%飽和で沈澱した酵素である。

IV ペプシン、トリプシンとの比較

Table 3. Comparision of the activity of the conchiolin-decomposing purified enzyme with that of trypsin and pepsin.

Enzyme	Nmg/ml-enz	Conchiolin			Casein		
		660m μ O.D	660m μ O.D/ mgN	Ratio to trypsin	660m μ O.D	660m μ O.D/ mgN	Ratio to trypsin
trypsin	0.055	0.017	0.31	1	0.630	11.8	1
pepsin	0.038	0.030	0.51	1.7	0.565	9.7	0.82
conchiolin-decomposing purified enzyme	0.064	0.245	3.90	12.5	0.035	3.8	0.33

次に本酵素と一般に使用される蛋白消化酵素のペプシン(250nu)、トリプシン(3000nu)との比較を行なった。基質にコンキオリンと1%カゼインを用いペプシンによる分解はpH2.5のクエン酸緩衝液を用い、トリプシンはpH7.8のリン酸緩衝液を用いた。カゼイン分解は基質緩衝液3mlに酵素液として0.05%ペプシン、0.05%トリプシンおよび本酵素液の1mlを加え37°C、40分間反応で行なった。活性の比較は各酵素液中のN量をもとに行なった。その結果コンキオリンに対してはペプシン、トリプシンに較べ本酵素は大きな活性を持つことがわかった。カゼインに対しては前記の結果とは逆に小さくなっている

ことより本酵素はかなり特異的なものであると思われる。

要 約

イトマキヒトデ消化系中にアサリ貝殻コンキオリンを分解する酵素の存在することを見いだしたので、その酵素の精製を硫酸アンモニウムによる塩析、およびDEAEセルロースカラムによって実施し、反応最適のpH、温度および金属イオンによる活性への影響について検討し、さらにペプシン・トリプシンとの比較を行なった結果、特異な酵素であることを知った。

1. アサリ貝殻コンキオリンに対する分解の最適pHは7.0~7.5である。
2. 同じく最適温度は30~35°Cの間にある。
3. 金属イオン中 Co^{+2} または Mn^{+2} は本酵素に対し活性化作用を持ち、前者には保護作用も認めた。
4. 本酵素はペプシン、トリプシンよりもコンキオリン分解作用は大きく、カゼイン分解作用は小さい。

本研究は昭和39年度科学研究費によるものの一部であり、試料採集に御協力下さいました長崎水族館本川氏および館員諸氏に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) TANAKA, S. HATANO, H. and ITASAKA, O.: *Bull. Chem. Soc. Japan.* 33, 4, 543(1960)
- 2) 田中・波多野：日本化学雑誌, 74, 3, 193(1953).
- 3) TANAKA, S. HATANO, H. and SUZUE, G.: *J. Biochem.* 47, 1, 117(1960).
- 4) 田中・波多野：日本化学雑誌, 76, 6, 602(1955).
- 5) TANAKA, S. and HATANO, H.: *Bull. of the Nippon Institute for Scientific Research on Pearls.* No. 73(1963).
- 6) 赤堀四郎編：酵素研究法I, 朝倉書店 p.166(1955).