

S-25

佐 賀 大 学

農 学 彙 報

第 4 1 号

目 次

マウスおよび大腸菌の DNA と大腸菌の 2,3 の酵素活性とに及ぼすフロキシシン (食用赤色 104 号) の影響について ……内田 泰・宮地 治・松永俊一・榎本則行	1
ヤリイカ肝臓の Cathepsin A (F-II) の部分的精製とその酵素化学的諸性質 ……………池田栄子・稲葉 喬・藤井 実	9
果実の熟度判定に関する音波共振法の応用 I. 共振用果実支持台の検討と収穫前後におけるマスクメロンの共振曲線 ……………小島孝之・田中政信	21
有明海の高度利用に関する基礎的研究 II. 六角川および早津江川河口沖の海象調査 ……渡辺 潔・生島芳雄・加来 研・藤本昌宣・吉田 勲・中島 明・瀬口昌洋	31
人工地盤における鉛直応力分布に関する実験的研究 (英文) ……吉田 勲・加来 研	55
水田かんがい用給水栓の水理特性について ……中島 明	65
海象観測システムによる有明海の海象現象の解析 I. 海象現象の変動特性について ……渡辺 潔・藤本昌宣・瀬口昌洋	75
コンクリートの耐海水性に関する研究 I. 硫酸塩による促進試験 ……加来 研・国武昌人・吉田 勲・田淵博文	93
ドライストアによるばらもみの長期貯蔵中における温湿度の変化特性の解析 ……………田中栄三郎・藤本徳実・松尾隆明	105

佐 賀 大 学 農 学 部

昭 和 51 年 8 月

昭和51年8月20日 印刷

昭和51年8月25日 発行

編集兼
発行者 佐賀大学農学部

印刷者 増田訓清

印刷所 大学印刷株式会社
広島市十日市町2丁目3番23号
電話 広島 31-4231 (代表)

佐賀大学農学叢報投稿規程

1. 投稿原稿は佐賀大学農学部教官により行われた原著研究論文に限る。ただし、共著者として本学教官以外を含んでも差し支えない。
2. 原稿は和文または欧文とし、投稿規程および執筆要領による。
3. 原稿は所定の投稿申込書を添えて編集委員に提出する。その提出日を受理日とする。
4. 編集委員が修正を必要と認めた原稿は、意見を附して投稿者に返却し、再提出を求めることがある。この場合は、再提出の日を受理日とする。
5. 校正は著者が行う。その際文章の修正、内容の変更などは行わない。
6. 下記の場合には、投稿者の所属講座において経費の負担をする。
 - イ 研究論文については、刷上り 20 頁をこえる分の経費
 - ロ 学位論文については、刷上り 70 頁をこえる分の経費
 - ハ カラー印刷による経費増
 - ニ 別刷については、贈呈分 50 部をこえる分の経費

S-25

佐賀大学

農学彙報

第 41 号

目 次

マウスおよび大腸菌の DNA と大腸菌の 2,3 の酵素活性とに及ぼすフロキシシン (食用赤色 104 号) の影響について ……内田 泰・宮地 治・松永俊一・榎本則行	1
ヤリイカ肝臓の Cathepsin A (F-II) の部分的精製とその酵素化学的諸性質 ……………池田栄子・稲葉 喬・藤井 実	9
果実の熟度判定に関する音波共振法の応用 I. 共振用果実支持台の検討と収穫前後におけるマスクメロンの共振曲線 ……………小島孝之・田中政信	21
有明海の高度利用に関する基礎的研究 II. 六角川および早津江川河口沖の海象調査 ……渡辺 潔・生島芳雄・加来 研・藤本昌宣・吉田 勲・中島 明・瀬口昌洋	31
人工地盤における鉛直応力分布に関する実験的研究 (英文) ……吉田 勲・加来 研	55
水田かんがい用給水栓の水理特性について ……中島 明	65
海象観測システムによる有明海の海象現象の解析 I. 海象現象の変動特性について ……渡辺 潔・藤本昌宣・瀬口昌洋	75
コンクリートの耐海水性に関する研究 I. 硫酸塩による促進試験 ……加来 研・国武昌人・吉田 勲・田淵博文	93
ドライストアによるばらもみの長期貯蔵中における温湿度の変化特性の解析 ……………田中栄三郎・藤本徳実・松尾隆明	105

佐賀大学農学部

昭和 51 年 8 月

AGRICULTURAL BULLETIN

OF

SAGA UNIVERSITY

Contents

Effect of Phloxine (Food Dye Red No. 104) on DNAs of Mouse Liver and <i>E. coli</i> and on Some Enzyme Activities of <i>E. coli</i>	Yasushi UCHIDA, Osamu MIYACHI, Shun-ichi MATSUNAGA and Noriyuki ENOMOTO	1
Partial Purification and Some Enzymatic Properties of Cathepsin A (F-II) from Squid Liver	Eiko IKEDA, Takashi INABA and Minoru FUJII	9
The Application of Sonic Techniques to Evaluating Maturity of Fruits		
I. A model of a fruit-holder and the resonant curves of musk-melon (<i>Cucumis melo</i> L.) in pre- and post-harvest	Takayuki KOJIMA and Masanobu TANAKA	21
A Fundamental Study on the Advanced Utilization of the Ariake Sea		
II. An investigation of the oceanic phenomena along the guts of the Rokkakū and the Hayatsue rivers.....	Kiyoshi WATANABE, Yoshio IKUSHIMA, Ken KAKU, Masanobu FUJIMOTO, Isao YOSHIDA, Akira NAKAJIMA and Masahiro SEGUCHI	31
An Experimental Study on the Vertical Stress Distributions in Artificial Soil Grounds	Isao YOSHIDA and Ken KAKU	55
On the Hydraulic Characteristic of the Hydrants Used in Paddy-Field Irrigations.....	Akira NAKAJIMA	65
Analysis of Oceanic Phenomena in the Ariake Sea by Observation System of the Ocean		
I. On the characteristics of the fluctuations with time in the oceanic phenomena	Kiyoshi WATANABE, Masanobu FUJIMOTO and Masahiro SEGUCHI	75
Studies on the Durability of Concrete in Sea Water		
I. Accelerated test by the sodium sulphate method	Ken KAKU, Masato KUNITAKE, Isao YOSHIDA and Hirofumi TABUCHI	93
Temperature and Humidity Changes in a Dry-Store Bin Which Stored Rough Rice for a Long Period	Eisaburō TANAKA, Tokumi FUJIKI and Takaaki MATSUO	105

Published
by
FACULTY OF AGRICULTURE
SAGA UNIVERSITY
SAGA, JAPAN

マウスおよび大腸菌の DNA と大腸菌の 2, 3 の酵素活性とに 及ぼすフロキシシン (食用赤色104号) の影響について

内田 泰・宮地 治*・松永俊一**・榎本則行***

(食品製造学教室・***食糧管理化学教室)

昭和 51 年 4 月 30 日 受理

Effect of Phloxine (Food Dye Red No. 104) on DNAs of Mouse Liver
and *E. coli* and on Some Enzyme Activities of *E. coli*

Yasushi UCHIDA, Osamu MIYACHI*, Shun-ichi MATUNAGA**

and Noriyuki ENOMOTO***

(Laboratory of Food Technology, *** Laboratory of Food Hygienic Chemistry)

Received April 30, 1976

Summary

The action of phloxine, which is used as a food additive at present in Japan, on catalase and nuclease activities and on DNA was investigated *in vivo* by using mouse and *E. coli*.

Remarkable differences of appearance were observed between phloxine-fed and non-fed mice. Phloxine remarkably depressed *E. coli* catalase activity *in vivo*. Deoxyribonuclease activity of *E. coli* was strongly enhanced but ribonuclease was inhibited by the action of the food dye.

To clarify the influence of phloxine on the physico-chemical nature of DNA *in vivo*, the ratio of enzymic decomposition of mouse and *E. coli* DNAs treated with phloxine was compared with that of untreated ones. The result of base analysis indicated that the DNA obtained from phloxine-treated organisms was similar to that from normal ones. Through the sucrose density gradient centrifugation of DNA from mouse fed with phloxine, it was confirmed that the DNA was depolymerized and that its components, particularly the very large molecules, were considerably split.

緒 言

先にわれわれは食用タール色素が, *in vitro* でタンパク質分解酵素^{1,2)}および核酸分解酵素³⁾の活性を低下させることを報告した。特にデオキシリボヌクレアーゼ (DNase) およびリボヌクレアーゼ (RNase) に対する活性阻害は, キサンテン系色素の場合が著しく高く, その際色素の構造中にハロゲン分子を含むものは阻害度が大きであった⁴⁾。一般にキサンテン系色素が光化学的作用を有することはよく知られており⁵⁾, これら色素類の光化学反応はいろいろな方向から研究されている^{6,7)}。

本研究の一部は昭和 46 年度日本農芸化学会 (東京) で発表した。

* 現勤務先: エーザイ株式会社 Present address: Eizai Co., Ltd.

** 現勤務先: フナイ薬品工業株式会社 Present address: Funai Yakuhin Kogyo Co., Ltd.

食品添加物の安全性については種々の論議が行なわれており、特に食用タール色素によって着色された食品を長年にわたって摂取した場合の催腫瘍性、催変異原性などを含めた安全性への危惧の念は、なお根強く残っているのが現状であろう。

これらの観点から、キサントレン系色素の一つであるフロキシシン（赤色104号）をマウスならびに大腸菌に投与して、生体内の2, 3の酵素活性および核酸に及ぼす影響を検討したのでその結果を報告する。

実験方法

1. 供試色素および生物

1-1. マウスおよび飼料の調製法

用いたマウスは ddN 系で飼料および水は不断給与、給水とし、飼育は自然温度の舎内で行なった。最初の親 (P) から産れた子 (F₁) は離乳後親からはなして親と同じ飼料を与えた。このようにして第2世代目 (F₂) まで飼育した。1群の実験に用いたマウスは5匹で、各代の飼育期間は3~4カ月であった。

飼料は前報⁸⁾と同様に市販の短桿状のマウス固型飼料（オリエンタル酵母（株）製）を粉碎し、これに重量比で0.5, 1.0, 2.0% になるようにフロキシシン（熊谷染料（株）製、国立衛生試験所検査合格品）を混合し、適量の水を加えてふたたび短桿状に整形した後、60°C 以下で乾燥して調製した。

1-2. 大腸菌および培養液

大腸菌 B 株 (*Escherichia coli* B strain) を用い、上記フロキシシンを 100ppm になるように加えたグルコース添加ブイヨン培地（肉エキス0.5%, ポリペプトン1%, 塩化ナトリウム0.5%, グルコース1%）で 37°C, 24時間培養した。

2. 大腸菌の抽出液の調製

大腸菌をフロキシシン 100ppm を含む培地で培養後、冷却下で遠心分離（6,000rpm, 15分間）によって菌体を集め、0.01M トリスー塩酸緩衝液（pH 7.5）にけん濁して、2回洗浄した。菌体に10倍容量のトリスー塩酸緩衝液（pH 7.5）を加え氷冷下で超音波処理（15Kc, 10分間）を行ない、次いでその処理液を遠心分離（10,000rpm, 15分間）して上澄液を得た。この上澄液には赤色色素（フロキシシン）が極くわずかではあるが含まれているので、セファデックス G-25 を用いてゲルろ過し色素を完全に除いた画分を抽出液としてその酵素活性を測定した。

3. 酵素活性測定法

3-1. カタラーゼ活性の測定

前報⁸⁾に記載したマウス肝カタラーゼ活性の測定法に従った。すなわち、0.01M 過酸化水素 0.5ml と 0.1M リン酸塩緩衝液（pH 6.8）2.0ml を含む混液に前記抽出液 1ml を添加し、氷水中で5分間反応させた。2N 硫酸 1ml を加えて反応を止め、遠心分離（0°C, 10,000rpm, 15分間）後の上澄液から 2ml をとって 0.005N 過マンガン酸カリウム溶液で滴定し、酵素液無添加の対照との差から分解された過酸化水素量を求め、抽出液 1ml 中に含まれるタンパク質量（mg）で除した値を酵素活性として示した。なおタンパク質含量は銅-Folin 法⁹⁾によって定量した。

3-2. DNase 活性の測定

子牛胸腺より調製した0.4% DNA 溶液 0.3ml, 0.1M 塩化マグネシウム 0.1ml, 1M トリスー塩酸緩衝液（pH 7.5）0.15ml, 脱イオン水0.20ml からなる混液を 37°C で5分間保温した後、これに大腸菌の抽出液 0.25ml を加えた。37°C で30分間反応させた後、carrier DNA（0.2%）溶

液 0.25ml, 1N 冷過塩素酸 1.0ml を加えて反応を停止させた。0°C で10分間放置し、遠心分離 (3,000rpm, 15分間) した後上澄液 1ml をとり、脱イオン水で 5ml に希釈した。続いてその希釈液の 260nm における吸光度を測定し、ブランクの吸光度との差を酵素活性とした。

3-3. RNase 活性の測定

RNase の反応液組成は 0.3M トリシュー塩酸緩衝液 (pH7.5) 0.2ml, 酵素液 0.25ml, 脱イオン水 0.3ml, 1.2% 酵母 RNA 溶液 0.25ml で全容量は 1.0ml であった。反応条件は DNase の場合と同様であるが、反応の停止には 0.75% 酢酸ウラニウムを含む 25% 過塩素酸 0.2ml を用いた。

4. DNA の調製

マウス肝臓 DNA はと殺直後の肝臓より SDS 法¹⁰⁾によって、また大腸菌 DNA は集菌後直ちに Marmur 法¹¹⁾に準じて調製した。なおマウス肝臓 DNA は、いずれの実験も、フロキシシンを所定の濃度含む飼料で 3 ヶ月飼育した親 (P) のマウスより調製したものをを用いた。いずれも純度 95% 以上の高重合 DNA 標品であった。

5. DNA の塩基分析

DNA の塩基分析は Hershey らの塩酸分解法¹²⁾を用いた Uchida らの改良法¹³⁾によって行なった。

6. ショ糖密度勾配遠心法

0.1M 塩化ナトリウム-0.05M リン酸塩緩衝液 (pH7.0) を含む 5% および 20% のショ糖溶液¹⁴⁾ 2.4ml ずつを用いて、5ml 容のニトロセルロースチューブに 5% から 20% にいたる直線的なショ糖密度勾配液を作った。その上に流動パラフィンを重ねさせ、試料 0.2ml をさらにその上に静かにのせ、超遠心分離機 (日立, 55P-2 型, ローター SW-RP40A) で 30,000rpm, 4 時間遠心分離した。遠心分離後チューブの底に穴をあけ、内液を試験管に 3 滴ずつ分取し、それぞれに 1ml の水を加えて、分光光度計 (日立, 139 型) でマイクロセル (光路 50mm) を使用して 260nm の吸光度を測定した。

沈降定数 $S_{20,w}^0$ は Burgi ら¹⁵⁾により提出された次式より求めた。

$$S_{20,w}^0 = \frac{6.45 \times 10^{10} D}{\omega^2 t}$$

D: チューブ表面からの距離 (cm)

w: 回転数 (rpm)

t: 回転時間

試料のマウス DNA は 260nm における吸光度が 0.80 (DNA として 40 μ g/ml) となるように¹⁶⁾希釈して超遠心分離に供した。

実験結果および考察

1. フロキシシン投与マウスの外観的所見

フロキシシン無添加飼料の対照群は正常な毛なみを示したが、フロキシシン添加飼料の試験群は全体的に体毛が抜けやすく、毛なみが荒れていた。この現象は親の代 (P) の 1.0% フロキシシン区にとくにはっきり認められた。これらの中で一部のものは、下あごから胸にかけて皮膚がやぶれ、出血してただれたような症状を示した。

また、歩行運動がぎこちなくなったものが親の代の 1.0% 区、第 2 世代目 (F₂) の 0.5% 区、2.0% 区などに見られた。

肝臓採取のために解剖した際、皮下（乳腺上）に小円形（径5mm位）の肉腫様の固まりのあるものがあつた。このような症状は2.0%区の第1世代目（F₁）の雌1匹、第2世代目（F₂）の雌3匹に見られた。

2. 大腸菌の増殖度に及ぼすフロキシンの影響

フロキシンの大腸菌の増殖に及ぼす影響について検討するために、培養液の660nmにおける吸光度を測定して増殖率を求めた。その結果はTable 1のようであつた。

Table 1. Effect of phloxine on growth of *E. coli*.

	Growth	
	OD, 660 nm	Ratio (%)
Phloxine, 100 ppm	0.899	94.3
Control	0.953	100

E. coli was stationarily cultured in the medium containing glucose 1, peptone 1, meat extract 0.5, NaCl 0.5% and phloxine 100 ppm for 20 hrs at 37°C.

フロキシンの100ppm添加培地での大腸菌の増殖は対照区と比較してほとんど差はなく、この程度のフロキシンの濃度では大腸菌は外観上ほぼ正常な値にまで増殖することが示された。

3. フロキシンの添加培地で培養した大腸菌のカタラーゼ活性

フロキシンの添加培地で培養した大腸菌のカタラーゼ活性を測定して、フロキシンの菌体内カタラーゼに及ぼす影響を検討した。

Table 2. Effect of phloxine on catalase activity of *E. coli*.

	Catalase activity	
	Decomposed H ₂ O ₂ g/mg protein	Ratio (%)
Phloxine, 100 ppm	3.24×10^{-4}	47.0
Control	6.84×10^{-4}	100

Bacterium was cultured under the condition described in Table 1.

Table 2に示したように、菌体内カタラーゼ活性は、フロキシンの添加培地のものはフロキシンの無添加のものにくらべると47%となり著しく低い値を示した。マウスにフロキシンを投与した場合の肝臓カタラーゼの活性低下はすでに報告した⁸⁾が、大腸菌においても同様の現象が認められた。

過酸化水素のウイルス誘発能や突然変異誘起能は山藤らにより詳細に研究されており^{17,18)}、また担癌動物のカタラーゼ活性は強く阻害されていることも早くから知られている^{19,20,21)}。過酸化水素が生体内に蓄積されるのは主としてカタラーゼの活性が阻害されるためであると考えられるから、フロキシンの生体のカタラーゼ活性を阻害するという事は軽視できない現象であろう。

4. フロキシンの添加培地で培養した大腸菌のDNaseおよびRNase活性

フロキシンの大腸菌の核酸代謝に影響を与えるかどうかを調べるために、色素添加培地で培養した大腸菌のDNaseとRNase活性を検討した。それらの結果はTable 3に示した。

Table 3. DNase and RNase activities in *E. coli* cultured in the medium containing phloxine.

	DNase activity		RNase activity	
	OD, 260 nm	Ratio (%)	OD, 260 nm	Ratio (%)
Phloxine, 100 ppm	0.490	274	0.243	48.0
Control	0.179	100	0.510	100

DNase 活性は試験区の方が強く、対照区のそれよりも 2.7 倍となり、DNA の分解が活発に起こっているものと推定される。これに対し、RNase 活性は試験区の方が低く、対照区の約 50% の活性しか示さなかった。この結果は DNase の場合とは全く逆の現象である。色素添加の大腸菌では DNA および RNA の代謝異常が生じていたと考えられる。

5. 色素投与マウス肝臓 DNA および色素添加大腸菌 DNA に対する DNase の作用

フロキシシが生体の DNA 代謝に何らかの影響を与えたとすれば、その DNA は物理化学的な性質が変化し DNase に対する感受性が異なるはずである。それらのことを調べ、結果を Table 4 に示した。

Table 4. Action of DNase on DNAs treated with phloxine.

	Action of DNase	
	OD, 260 nm	Ratio (%)
Mouse liver DNA		
Phloxine, 1.0%	0.417	95.4
Phloxine, 2.0%	0.331	76.0
Control	0.437	100
<i>E. coli</i>		
Phloxine, 100 ppm	0.110	61.5
Control	0.179	100

マウスでは色素投与の肝 DNA（試験区）が DNase 作用を受けにくくなっており、フロキシシの投与濃度が増加するにつれて被分解度が低下していた。大腸菌から抽出した DNA では、試験区が対照区の 60% しか DNase 作用を受けないという結果がえられ、これはマウスの肝 DNA と同じ傾向であった。

これらの結果から、フロキシシが DNA の塩基と反応したのか、立体構造（二本鎖構造）に変化を与えたのか、あるいは DNA の主鎖を切断して低分子化したのか、その他のことが考えられるが、そのいずれであるかは定かではない。しかし、色素の *in vivo* での処理（投与）が、DNA の物理化学的性質に若干の変化を与えたことは明らかである。

6. マウス肝臓および大腸菌の塩基組成

フロキシシが DNA の塩基にまで影響を及ぼすかどうかについて調べるために、フロキシシ投与マウスの肝 DNA および色素添加培地で培養した大腸菌 DNA の塩基分析を行ない、それぞれの対照区の DNA の塩基と比較検討した。

Table 5. Base composition of DNA preparations treated with phloxine *in vivo*.

Preparation	Adenine	Guanine	Cytosine	Thymine
Mouse liver DNA				
Test, 2 %	29.4	21.3	19.4	29.9
Control	29.6	21.6	19.7	29.0
<i>E. coli</i> DNA				
Test, 100 ppm	23.1	26.6	26.7	23.6
Control	23.8	26.0	26.8	23.3

Table 5 から明らかなように、マウス肝臓も大腸菌もそれぞれ対照区と試験区の DNA の塩基

組成には差異が見られなかった。このことは、フロキシンは DNA の塩基そのものの変換というような作用はしていないことを示している。

7. マウス肝臓 DNA のシヨ糖密度勾配遠心

フロキシンの投与のマウス肝 DNA が正常か、あるいは物理化学的变化を受けているかを調べるために、DNA のシヨ糖密度勾配遠心を行ない、DNA の各成分の比較を行なった。シヨ糖密度勾配遠心図を Fig. 1 に示した。

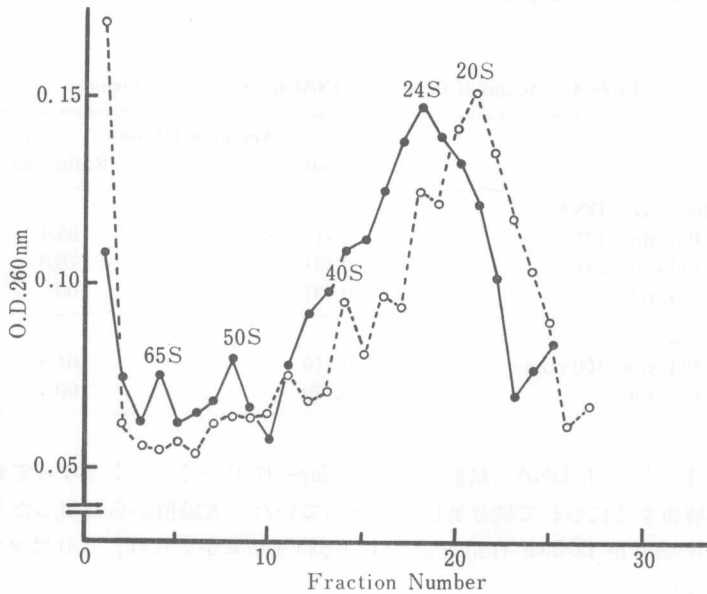


Fig. 1. Sedimentation patterns of liver DNA from phloxine-fed mouse and normal one.

DNA solution was subjected to sedimentation analysis through 5 to 20% sucrose gradient containing 0.1 M sodium chloride-0.05 M phosphate buffer, pH 7.0, for 4 hrs at 30,000 rpm at 10 °C.

●—● Control, ○---○ 2.0% phloxine administration

対照区のマウス肝 DNA の沈降定数は 24S が主体をなしているが、65S, 50S と大きい値の成分のものも含んでいた。試験区の DNA の沈降定数は対照区のような大きい成分 (65S, 50S) はなく、20S の小さい値の成分が主体であった。

沈降定数が大きければ分子量は大きく、したがって上記の結果は DNA の大きな分子がフロキシンの投与によって低分子化したと考えられ、生体内で DNA 分子の切断すなわち染色体の切断がこの色素によって誘起されたと推定される。これはウイルス誘発剤ならびに発癌剤が DNA を切断するという内田ら^{16,22)}の報告とも類似した結果である。このようにフロキシンは DNA 切断能を有し、また大腸菌に対して突然変異誘起性を示すことが賀田ら²³⁾によって証明されており、これらの事実からフロキシンの安全性についてはとくに注意を払うべきであると考えられる。

摘 要

フロキシンをマウスおよび大腸菌に投与して、マウスの外観、大腸菌の 2, 3 の酵素活性、お

よびマウス、大腸菌の DNA に及ぼす影響を検討した。

1. フロキシシンを投与されたマウスは粗毛、脱毛症状、皮膚の炎症などが見られ、歩行運動も異常で、明らかに対照区との間に差異が認められた。
2. フロキシシン添加培地で培養した大腸菌のカタラーゼ活性は著しく低い値を示した。
3. フロキシシン添加培地で培養した大腸菌の DNase 活性は対照区よりも著しく高く、逆に RNase 活性は低い値を示し、色素添加の大腸菌では核酸代謝に異常が生じていた。
4. フロキシシンは *in vivo* で DNA の物理化学的性質に若干の変化を与え、色素投与の供試生物の DNA は DNase に対する感受性が対照の DNA と異なっていた。
5. 供試生物の DNA の塩基組成は色素投与の有無にかかわらず、その間には差異が見られず、フロキシシンは DNA の塩基それ自体には影響を与えなかった。
6. フロキシシン投与のマウス肝 DNA のショ糖密度勾配遠心図は、色素無投与の DNA に見られたような沈降定数の大きい値の成分はなく小さい値の成分が主体であった。

引用文献

- 1) 榎本則行, 園田博正: 佐賀大農彙, **27**, 55 (1969).
- 2) 榎本則行, 井上芳昌, 内田 泰: 佐賀大農彙, **29**, 9 (1970).
- 3) 内田 泰, 楠本忠夫, 榎本則行: 日農化大会講演要旨集, p. 235 (1969).
- 4) 榎本則行, 内田 泰: シンポジウム「食品と公害」福岡市, p. 24 (1970).
- 5) 稲田邦子, 宮沢文雄: 食衛誌, **10**, 344 (1969).
- 6) 村上浩紀, 坂田幸平, 波多野昌二, 渡辺忠雄: 食衛誌, **13**, 12 (1972).
- 7) 村上浩紀, 坂田幸平, 波多野昌二, 渡辺忠雄: 食衛誌, **13**, 19 (1972).
- 8) 榎本則行, 田口継喜, 内田 泰: 佐賀大農彙, **33**, 27 (1972).
- 9) 赤堀四郎編: 酵素研究法 (第1巻), 朝倉書店, 東京, 1961, p. 166.
- 10) E. R. M. Kay, N. S. Simmons and A. L. Dounce: J. Am. Chem. Soc., **74**, 1724 (1953).
- 11) J. Marmur: J. Mol. Biol. **3**, 208 (1961).
- 12) A. D. Hershey, J. Dixon and M. Stacey: J. Gen. Microbiol., **14**, 160 (1956).
- 13) Y. Uchida, H. Shigematu and K. Yamafuji: Enzymol., **29**, 369 (1965).
- 14) R. J. Britten and R. B. Roberts: Science, **131**, 32 (1960).
- 15) E. Burgi and A. D. Hershey: Biophys. J., **3**, 309 (1963).
- 16) 内田 泰: 九大農学部農産製造学 (食糧化学) 研究室報告, 第5号, 1967, p. 16.
- 17) K. Yamafuji: Enzymol., **27**, 217 (1964).
- 18) K. Yamafuji: Nutritional Factor in Virus Formation, Crosby Lockwood & Son Ltd., London, 1964, p. 70.
- 19) V. E. Price and R. E. Greenfield: J. Biol. Chem., **209**, 363 (1954).
- 20) H. V. Euller and L. Heller: Z. Krebsforsch., **56**, 393 (1949).
- 21) F. Fukuoka and W. Nakahara: Gann, **42**, 55 (1951).
- 22) K. Yamafuji and Y. Uchida: Enzymol., **35**, 131 (1968).
- 23) T. Kada, K. Tutikawa and Y. Sadaie: Mutation Research, **16**, 165 (1972).

ヤリイカ肝臓の Cathepsin A (F-II) の部分的精製と その酵素化学的諸性質

池田 栄子・稲葉 喬・藤井 実

(生物化学教室)

昭和 51 年 4 月 30 日 受理

Partial Purification and Some Enzymatic Properties of Cathepsin A (F-II) from Squid Liver

Eiko IKEDA, Takashi INABA and Minoru FUJII

(Laboratory of Biochemical Chemistry)

Received April 30, 1976

Summary

Cathepsin A from the liver of squid, *Dorytheuthis bleekeri*, was separated into two active fractions (F-I and F-II) on CM-cellulose (CM-23) column chromatography. Cathepsin A (F-II) was partially purified about 100-fold by procedures including homogenation, ammonium sulfate fractionation, chromatography on CM-cellulose and gel chromatography on Sephadex G-100. The molecular weights of cathepsin A (F-I) and cathepsin A (F-II) were estimated to be approximately 107,000 and 58,000, respectively, by gel filtration on Sephadex G-200. Isoelectric focusing of cathepsin A (F-II) gave the isoelectric point of 5.1. The enzyme was stable in the pH 4.9 to 5.6 region. The optimum pH for the hydrolysis of Z-glu-tyr was 4.6 to 5.2. The enzyme catalyzed the hydrolysis of dipeptide derivatives such as Z-glu-tyr, Z-glu-phe, Z-gly-phe. Z-gly-leu and Z-gly-pro were hardly hydrolyzed. The values of K_m for Z-glu-tyr and Z-glu-phe were 1.5 mM and 3.2 mM, respectively, in 0.1 M acetate buffer, pH 5.0, at 37°C. The enzyme was strongly inactivated by monoiodoacetic acid, $HgCl_2$ and diisopropylphosphorofluoridate (DFP) at pH 5.0. No inhibition of the enzyme was observed in the presence of EDTA·2Na and 1,10-phenanthroline.

緒 言

1946年に Fruton ら¹⁾は牛ひ臓から合成ペプチド誘導体である N-carbobenzoxy- α -L-glutamyl-L-tyrosine (Z-glu-tyr) を特異的に加水分解する酵素を見出し、それを cathepsin A と呼んだ。1967年に、Iodice ら²⁾によって glucagon に対する鶏ひ臓の cathepsin A の作用について報告されたが、その報告の中で cathepsin A は牛すい臓の carboxypeptidase A (Cpase A) と類似の基質特異性を有することが示唆された。最近、ネズミ肝臓に分子量を異にする3種類の cathepsin A が存在することが報告された³⁾。また、豚じん臓から分子量を異にする2種類の cathepsin A が均一な標品として得られた⁴⁾。このように、陸せい動物の組織の cathepsin A については、かなり詳しく研究されてきたが、水せい動物の cathepsin A に関する研究はほとんどない。水せい動物の組織の cathepsin A の本態並びにその酵素化学的性質に関する知見を得ることは、比較生

化学的見地から有意義であると考えられた。

本報告では、ヤリイカの肝臓から部分的に精製した cathepsin A (F-II) の酵素化学的性質について調べた結果を記載する。

実験方法

1. 実験材料及び試薬

ヤリイカ (*Dorytheuthis bleekeri*) の肝臓は鮮魚店 (佐賀市) から得て、使用するまでディー・プ・フリーザー中に凍結保存した。

CM-cellulose (CM-23) は Whatman 社から得た。Sephadex G-25, G-100 と G-200 は Pharmacia 社から得た。N-carbobenzoxy- α -L-glutamyl-L-tyrosine (Z-glu-tyr), N-carbobenzoxy- α -L-glutamyl-L-phenylalanine (Z-glu-phe), N-carbobenzoxy- α -glycyl-L-phenylalanine (Z-gly-phe), N-carbobenzoxy- α -glycyl-L-leucine (Z-gly-leu) と N-carbobenzoxy- α -glycyl-L-proline (Z-gly-pro) は蛋白質研究奨励会 (大阪市) の製品を使用した。p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethane hydrochloride (TPCK) は半井化学薬品 (株) から得た。Diisopropyl phosphofluoridate (DFP) は Koch-Light Laboratories の製品を使用した。結晶 bovine serum albumin は Sigma 社から、また ovalbumin, human γ -globulin は Schwarz-Mann 社から得た。Ampholine carrier ampholyte (#8141, pH 3.5-10) は LKB Far East 社から購入した。他のすべての試薬は市販の特級ないし1級品を、精製せずに使用した。

2. 酵素活性測定

cathepsin A の活性は、Z-glu-tyr の酵素加水分解によって生成した L-tyrosine を、Moore らの方法⁵⁾によって調製した ninhydrin 試薬を用いる Iodice らの方法³⁾に従って定量された。反応混合液は、200 μ l の酵素溶液、4 mM Z-glu-tyr と 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) からなり、その全容量は 1.0 ml であった。反応混合液を 37°C で 60 分間 インキュベートした後、1.0 ml の 0.5 M trichloroacetic acid (TCA) を添加することによって、酵素反応を停止させた。この混合液を 37°C で 15 分間静置することによって、酵素を沈でんさせた。沈でんを除去するために、この混合液を 3,000 $\times$ g で 20 分間遠心分離した。その上澄液から 200 μ l 分取して、上記の緩衝液を用いて全容量が 1.0 ml になるように希釈した後、ninhydrin 発色させ、発色した混合液の 570 nm における吸光度を測定した。あらかじめ L-tyrosine を用いて作製しておいた検量曲線に基づいて、酵素反応によって遊離した L-tyrosine の定量を行った。1 分間に生成する L-tyrosine の μ mole 数をもって活性を表示した。なお、Z-gly-pro 以外の dipeptide の N-carbobenzoxy 誘導体を基質として用いた場合は、すべて上記と同じ方法に従った。Z-gly-pro を基質として用いた場合には、ninhydrin 発色させた後、440 nm における吸光度を測定した。各基質から酵素反応によって遊離する各アミノ酸は、あらかじめ求めておいた検量曲線に基づいて定量された。

3. タンパク質の定量

タンパク質の濃度は 280 nm における吸光度を測定することによって定量した。

4. 焦点電気泳動

焦点電気泳動は Vesterberg の方法⁶⁾に従って行った。本研究においては、pH 勾配が 3.5-10 の carrier ampholyte を選んだ。あらかじめ酵素溶液を Visking tube (#36/32) 中で、1.0%

glycine に対して透析した。平衡化された酵素液を焦点電気泳動用カラム (110 ml) のほぼ中央部に注入し、最初は 200 V で、そして最終的には 400 V の電圧で 4°C において 48 時間焦点泳動させた。泳動終了後、カラム中の内容物を 2.5 ml ずつ分取した。

5. Cathepsin A (F-II) の部分的精製

すべての操作は 4~5°C で行った。

第1段階. 抽出 ヤリイカ肝臓に 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0, 0.9% NaCl) を肝臓重量当り 2 倍容加え、Waring blender を用いてホモジナイズした。自己消化をおこさせるために、そのホモジネートを 4°C で 1 夜放置した後、比較的大きな細胞断片を除去するためガーゼを用いてろ過した。このろ液をろ過補助剤として Celite 535 と Standard super-cel を用いて吸引ろ過することにより、黄褐色のほぼ透明な抽出液を得た。これを粗酵素溶液とした。

第2段階. 硫酸分画 粗酵素溶液に結晶硫酸を機械的に攪拌しながら加えて 0.3 飽和とした。この混合液の pH を 1N NaOH を用いて 5.0 に調整した。4°C で 1 夜静置後、生成した沈殿を除去するために 6,000×g, 20 分間遠心分離を行った。得られた上澄液に、さらに結晶硫酸を加えて 0.8 飽和とした。一夜静置後、同様に 6,000×g, 20 分間遠心分離を行い、生じた沈殿を集めて必要最少容量の 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解した。この溶液を、あらかじめ上記の緩衝液で平衡化しておいた Sephadex G-25 のカラムを用いてろ過することによって脱塩と緩衝化を行った。

第3段階. CM-cellulose (CM-23) カラムクロマトグラフィー 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) であらかじめ平衡化しておいた CM-cellulose カラム (2.6×21cm) に第2段階で脱塩及び緩衝化

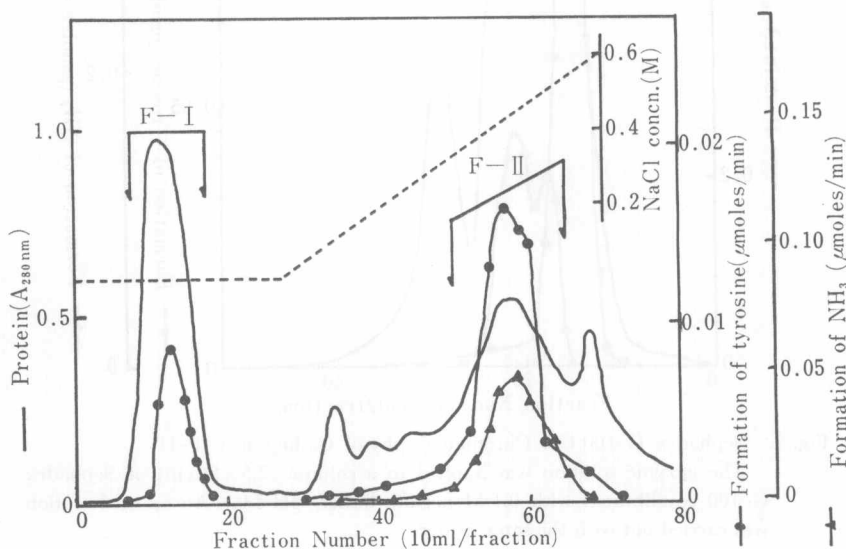


Fig. 1. CM-cellulose Chromatography of Cathepsin A (F-II).

The crude enzyme solution was applied to a column (2.6×21 cm) of CM-23 cellulose equilibrated with 0.01 M acetate buffer, pH 5.2. Elution was performed with a linear gradient from 0 to 0.6 M NaCl in the same buffer. The activity assay was made by measuring the absorbance at 570 nm due to the reaction of L-tyrosine and ninhydrin according to the methods of Iodice *et al.*²⁾ and Moore *et al.*³⁾.

した酵素溶液を吸着させた後、同じ緩衝液を用いてカラムを洗浄した。引き続いて、gradient 溶出を行った。mixing chamber に 250 ml の 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5.0), そして reservoir には 0.6 M NaCl を含む 250 ml の 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加えた。その溶出パターンは Fig. 1 に示した。活性のピークが2カ所あり、素通り部分の活性ピークを F-I, 0.4 M NaCl 濃度部分の活性ピークを F-II として、それらを別々に集めた。まず最初に F-II について以後精製を行うこととした。

活性画分 (F-II) を集めて硫酸塩析によって沈でんさせ、生じた沈でんを遠心分離により集めて、その沈でんを必要最少容量の 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いて再溶解させることによって活性画分 (F-II) を濃縮した。

第4段階. Sephadex G-100 ゲルクロマトグラフィー 第3段階で得られた酵素溶液を、あらかじめ 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2.5×90 cm) に添加

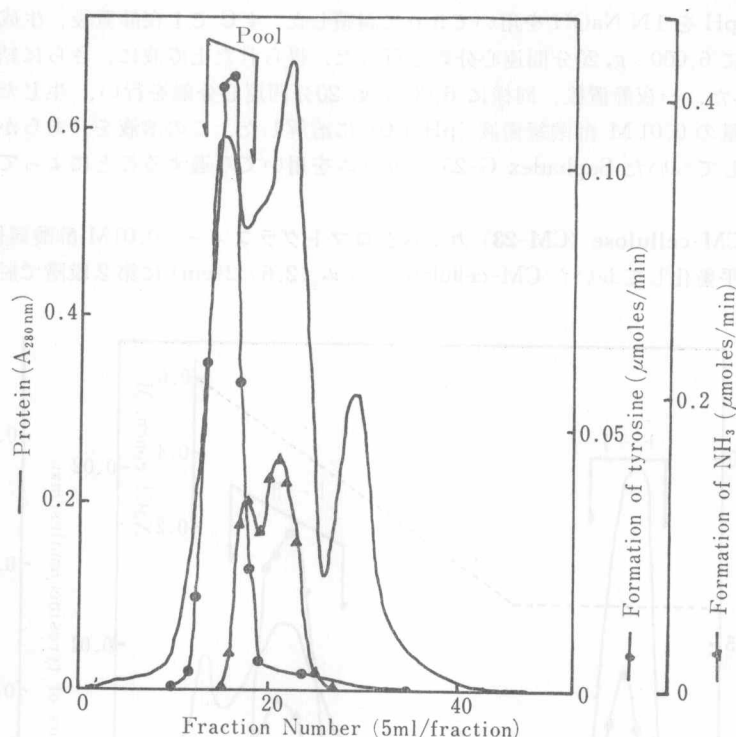


Fig. 2. Sephadex G-100 Gel Chromatography of Cathepsin A (F-II).

The enzyme solution was applied to a column (2.5×90 cm) of Sephadex G-100 equilibrated with 0.1 M acetate buffer, pH 5.0. An upward elution was carried out with the same buffer.

し、同じ緩衝液を用いて上昇法により溶出を行った。その溶出パターンは Fig. 2 に示した。cathepsin A (F-II) の活性画分を集めて、硫酸塩析により濃縮を行った。得られた沈でんを必要最少容量の 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解した。イオン強度を下げるため、この酵素溶液を、あらかじめ 0.3% NaHCO_3 で前処理をしておいた Visking tube (#36/32) 中で、同じ緩衝液に対して透析を行った。ここで得られた酵素溶液を部分的に精製された cathepsin A (F-II)