

ショウガ・プロテアーゼの精製と安定化

大槻耕三・河端 信・田口邦子

Purification and Stabilization of Ginger Protease

KOZO OHTSUKI, MAKOTO KAWABATA and KUNIKO TAGUCHI

Ginger protease which exists in the rhizome (*Zingiber officinale roscoe*) was purified by chromatography on CM-cellulose and gel filtration on Bio-Gel P-100. In the course of the purification, HgCl_2 or *p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB) was used as a stabilizing agent for the protease. It was shown that the protease stabilized with HgCl_2 formed a dimer complex which could not be separated from the higher molecular contaminant. The protease activity of the preparation stabilized with PCMB and purified by the chromatography was as high as 6-fold of that without PCMB. From the result of gel filtration on Bio-Gel P-100, the molecular weight of this purified protease was estimated to be about 29,000, which is the same as the value obtained previously by SDS slab-polyacrylamide gel electrophoresis.

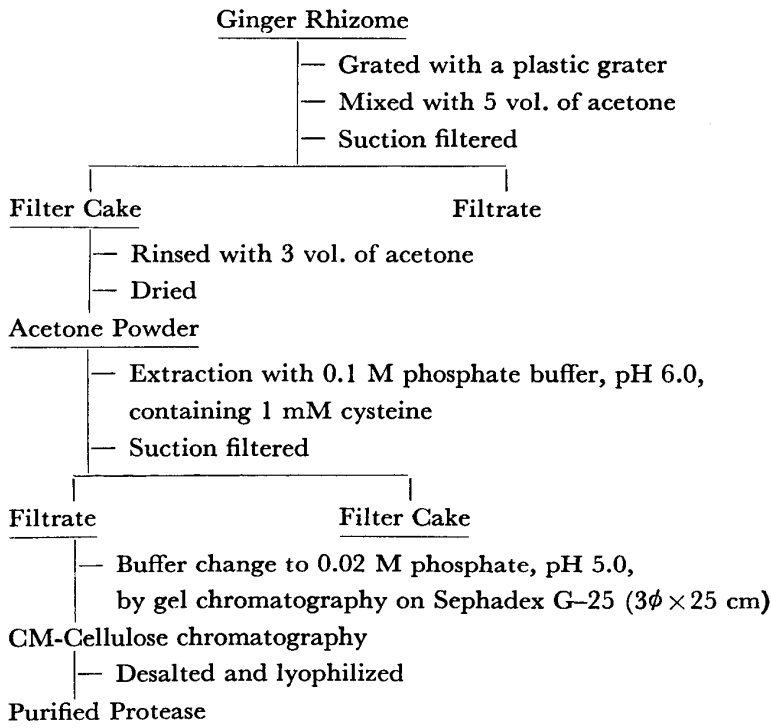
I 緒 言

ショウガの原産は熱帯地方であって、日本へは古代にすでに伝えられているとされており¹⁾、それ以来、日本でも栽培やその利用は盛んである。ショウガの食品成分は 100 g あたり水分が最も多く 86.6 g であり他の成分として蛋白質 2.1 g, 脂質 0.9 g, 糖質 8.2 g, 繊維 1.7 g, 灰分 0.5 g であって、いわゆる五大栄養素的な価値は低いが、香辛料としての利用や、ショウガの整腸作用、駆風作用²⁾、健胃作用、風邪薬など医薬的な利用については、日本のみならず広く中国、インドから欧州に於てさえも比較的古くから経験的に行なわれてきた。このように歴史的にかなり古くから食生活に利用されてきたから香辛料としての有効成分(ショウガオールやジンゲロンなど)についての研究は多くあるが、ショウガに含まれる各種加水分解酵素についての研究は少ない。ここではショウガ中の各種加水分解酵素のうち特に食肉軟化作用などに関係の深いプロテアーゼについて新しい二三の知見が得られたのでまとめた。

植物起源の蛋白質加水分解酵素はパパイヤから得られるパパインや、パイナップルから得られるブロメリン、いちじくから得られるファイシンなどがあるが、現在これら酵素の利用や酵素化学的諸性質、蛋白

質化学的の微細構造に至るまでかなり詳しく研究されてきている³⁾。ショウガのプロテアーゼの存在は比較的近年⁴⁾になってから知られたので、これについての研究報告も数少ないが⁽⁴⁻⁶⁾、基本的にはこのプロテアーゼは前記のパパインやブロメリンなどと同じ傾向のものであって、パラクロロマーキュリー安息香酸(PCMB)や塩化水銀などの水銀剤で可逆的に失活させられるSH-酵素である。しかしショウガプロテアーゼの蛋白質構造および酵素化学的性質などについては上記の代表的な蛋白質加水分解酵素と趣をかなり異にすると考えられる。またこのようなプロテアーゼの蛋白質構造や酵素化学的性質を明らかにするには、高純度に精製した酵素標品が不可欠なのであるが、蛋白質加水分解酵素の常として精製度合を高めれば高めるほど酵素分子同志の加水分解すなわち自己消化が起こり、得られる標品中に高い割合で消化産物を含み従って有効な酵素の収率も大変悪いものである。この様な現象を最も簡単にしかも確実に防ぐ方法としては酵素を可逆的阻害剤で失活させ、この失活酵素を各種の方法で精製しその処理中に自己消化を起せしめないことである。この種の阻害剤としてSH-酵素の場合良く用いられるのはPCMBや塩化水銀などの試薬である。さらにこれら水銀剤は多くの場合SH-酵素の活性中心に酵素1モルに対し試薬1モルの割合で反応し、また

Scheme 1. Purification Procedure of Ginger Protease



比較的強く結合し酵素の自己消化を防ぎ酵素の安定化に役立つものである。また酵素の精製終了後、酵素活性をとりもどしたい時はシステインやジチオスレイトール、メルカプトエタノールなどの還元剤を少し過剰に加えるだけで水銀剤が酵素からはずれ容易にプロテアーゼ活性が得られる。本研究ではショウガ・プロテアーゼの高純度の標品を得るために上記の水銀剤を用いて酵素を安定化し各種の精製を試みたので、それらの結果を報告する。

II 実験材料および方法

(1) ショウガ・プロテアーゼの精製法

市販のショウガの根を陶器製またはプラスチック製のおろし金を使用して細かくし、Scheme 1 に示したような順序で処理し、アセトンパウダーを得る。ここで得られるアセトンパウダーにはショウガの辛味成分や香気成分、脂質分、水分は殆んど取り除かれており、無臭の粉末状と繊維状のものである。アセトンパウダーから酵素活性部を抽出するために、1 mM システインを含む 0.1 M リン酸緩衝液 pH 6.0 をアセトンパウダーの 10~20 倍量加え、乳鉢で 5~10 分間磨碎する。ここで得られるスラリーを吸引濾過するが、濾液が濁っている時には 8,000 G の冷却遠心分離に 5~10 分間かける。沈澱部の 80% 近くはデンプンであり、上澄液にプロテアーゼ活性が存在する。この上澄液はリン酸緩衝液の濃度が 0.1 M でプロテアーゼ活性蛋白

質を CM-セルロース・イオン交換樹脂に吸着させるにはあまりにもイオン強度が強いため、CM-セルロースに吸着させられる様な緩衝液に交換するために、Sephadex G-25 (フェルマシア社製, 3φ × 25 cm のカラム) でゲル濾過を行なった。ここでは 1mM EDTA を含む 0.02 M リン酸緩衝液, pH 5.0 で平衡化したセファデックス G-25 であるが、この時最初に溶出してくる蛋白質画分にプロテアーゼ活性が存在する。この画分を 1 mM EDTA を含む 0.02 M リン酸緩衝液, pH 5.0 で平衡化した CM-セルロース (ブラウン社製, 1.5φ × 15 cm のカラム) に加え、東洋紙社製流動紫外吸光モニター・ユビコン UV-540 を溶出液流路に接続して溶出液の蛋白質 (280 nm の紫外吸光による。) をモニターする。

上記条件下で CM-セルロースカラムにサンプリング中、このカラムに吸着されない蛋白質は Fig. 1 の第 1 ピークとして表われる。サンプリング終了後、さらに 1 mM EDTA を含む 0.02 M リン酸緩衝液, pH 5.0, をカラムに加え吸着されないものをよく洗い出す。その後上記緩衝液と 1 mM EDTA を含む 0.02 M リン酸緩衝液, pH 7.0, それぞれ 100 ml ずつからなるリニヤーグラジェント溶出法によりカラムから酵素活性部を溶離する。ここで得られる酵素活性部は蒸留水で平衡化したセファデックス G-25 (3φ ×

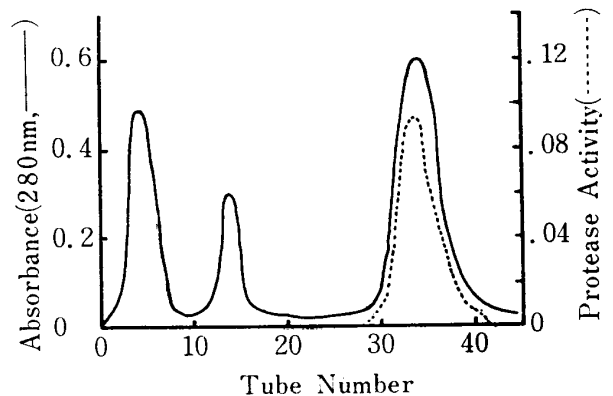


Fig. 1. CM-cellulose chromatography of ginger protease. CM-cellulose column (1.5φ × 15 cm) equilibrated with 0.02 M phosphate buffer, pH 5.0, was eluted with the same buffer. When the first peak was eluted out, a pH-gradient elution from pH 5.0 to pH 7.0 in 0.02 M phosphate buffer was applied.

30 cm) のカラムに加え、脱塩し、凍結乾燥する。

(2) 酵素活性測定法

プロテアーゼ活性は1%牛乳カゼイン(メルク社製, ハマースタイン)を基質とする蛋白質消化法で測定した。りん酸緩衝液, 0.1 M, pH 6.0, に溶かしたカゼイン 2.0 ml に 10 mM システイン 0.1~0.25 ml, 酵素液 0.4~0.25 ml を加え, 50℃で15~30分間インキュベート後5%トリクロロ酢酸(TCA)溶液 3 ml を加えて反応を停止させる。室温に1~2時間放置した後, 反応液を 3,000 r. p. m. の遠心分離に15分間かけ上澄液の TCA 可溶性ペプチドの量を181型日立分光光度計を用いて 280 nm に於る吸光度でもって測定し酵素活性とする。ブランクはカゼイン溶液 2.0 ml に3% TCA 3 ml を加えた後 10 mM システインおよび酵素液を加え上記と同様に処理したものをを用いた。

(3) Cellogel による電気泳動

セルロース・アセテート膜(chemetron 社製, 6×6 cm)の湿潤型を pH 8.6 バルピタール緩衝液($\mu=0.06$)で平衡化し 2 mA/cm 中の定電流で10分間電気泳動した後, エタノール 45 ml, 水 45 ml, 氷酢酸 10 ml を含む液に 0.5 g Amido Black 10B を溶かした液で染色する。脱色は5%酢酸50%エタノール溶液で行なった。

(4) Bio-Gel P-100 によるゲルクロマトグラフィー

Bio-Gel P-100 (Bio-Rad 社製, 1.5φ×70 cm カラムベッド)を 0.05 M りん酸緩衝液, pH 6.0, で平衡化し室温にてゲルクロマトグラフィーを行なった。分子量のマーカースとしてブルーデキストラン(フェルマシア社製, MW=2,000,000), オボアルブミン(NBC 社製, MW=43,000), ペプシン(シグマ社製, MW=35,000)牛カーボニックアンヒドラーゼ(シグマ社製, MW=31,000)キモトリプシノーゲン(シグマ社製, MW=25,700), チトクローム C (シグマ社製, MW=11,700), リゾチーム(シグマ社製, MW=14,300)などを使用した。

(5) 水銀の定量法

酵素の活性中心部にとり込まれた無機および有機水銀量の測定は硝酸および過マンガン酸カリを用いて加水分解してから行なう。密栓できるガラス容器に試料 1 ml (蛋白質で 0.3 mg) および水 2 ml, 濃硝酸 1 ml, 6% KMnO₄ 1 ml を入れ 100℃ 2時間分解したものを冷却, 20%ヒドロキシルアミンを KMnO₄ の色が消えるまで加える。この試料中の水銀を Hatch

ら⁸⁾のフレイムレス原子吸光法に従って分析する。

無機水銀は過剰の第一塩化錫のために還元され金属水銀となり, $\text{HgX}_2 + \text{SnCl}_2 \longrightarrow \text{Hg} + \text{SnCl}_2 \text{X}_2$

これに空気を吹き込むと Hg は気化する。これを気体セルを取付けた原子吸光分析機に導びけば水銀量を測定することができる。予備実験では上記より緩やかな加水分解では塩化水銀などの無機水銀はほぼ 100% 回収されるが, PCMB などの有機水銀は回収率が悪かった。しかしこれらの有機水銀も上記の加水分解条件ではほぼ 100% 回収されるようになった。

III 結果および考察

市販ショウガを使用してプロテアーゼを得る場合, 収率の良い時期を選ばなければならないが, 現在までの経験からすると, 新ショウガはひねショウガに比べ水分が多く, 従ってアセトンパウダーの収率も低い。新ショウガからはアセトンパウダーが約3%, 精製酵素は0.03%程度であるが, ひねショウガからはアセトンパウダーが約10%, 精製酵素が0.3%得られた。これらの収率は塩化水銀や PCMB を使用しないで得られた値であって, Scheme 1 の CM-セルロースクロマトグラフィーの直前に於て安定化剤としていずれかの水銀試薬を用いれば最終的に得られる精製酵素の収率が2~3割増加した。CM-セルロースクロマトグラフィーの結果を Fig. 1 に示すが, Tube No. 2~8 のピークは CM-セルロースに吸着されないで素通りした蛋白質であって, 顕著なプロテアーゼ活性は見られなかった。このピークが溶出し終ってから pH グラジエント溶出を行なうと, まず Tube No. 12~16に小さいピークが得られ, 次に No. 29~40 にプロテアーゼ活性の大部分を含む蛋白質画分を得る。CM-セルロースクロマトグラフィーの直前に塩化水銀や PCMB を加えたもののクロマトグラムもほぼ Fig. 1 のパターンと同傾向であった。精製の程度を知るために, これらプロテアーゼの各種標品について Cellogel による電気泳動を行なった。Fig. 2 の A はアセトンパウダーから 0.1 M りん酸緩衝液, pH 6.0, で抽出した蛋白質で, B, C, D のプロテアーゼ相当位置にスポットが見られるほか, それよりさらに陽極側にも, また原点および原点とプロテアーゼ相当位置の間にもスポットが見られ, プロテアーゼ以外にも多種の蛋白質がかなり含まれていることがわかる。B は Thompson ら⁴⁾の方法によって得られた酵素抽出物のアセトン沈澱物であるが, A に比べ原点に残る蛋白質および A に見られる最も陽極よりのスポットがかなり弱くなっており, B は A よりも幾分か精製されている

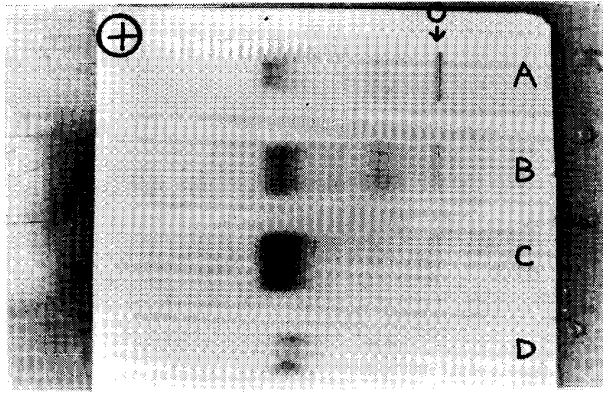
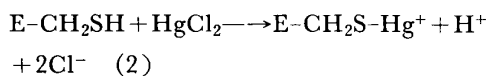
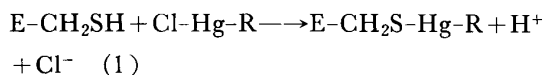


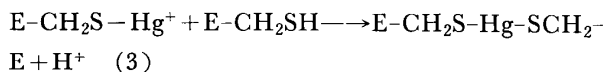
Fig. 2. Cellogel electrophoresis of ginger protease preparations. Cellogel (Chemetron Inc., Milano, gelatinized cellulose acetate film) electrophoresis was carried out in barbital buffer, pH 8.6, $\mu=0.06$, at 2 mA/cm width for 10 min. Stained with 0.5% Amido Black 10B and rinsed with 50% ethanol solution containing 5% acetic acid. A: Acetone powder extract, B: acetone precipitate sample, C: CM-cellulose chromatographed sample, D: PCMB-reacted ginger protease.

ことがわかる。CはScheme 1およびFig. 1の結果に示した方法による標品でほとんど単一のスポットとしてCellogel上に検出された。DはScheme 1のCM-セルロースクロマトグラフィー直前に安定化剤としてPCMBを反応させた後精製した標品であってCと同じように単一のスポットとして検出されている。ここでCとDを比較するとCの方が幾分スポットに拡がりがあり、これは活性プロテアーゼを含んだまま精製すると、その処理中にやはりある程度自己消化を起しているものと考えられる。PCMBで失活させたDの方についてはスポットの拡がりも少なくA~Dのうちでも最も良い結果が得られた。

水銀剤を使わないで精製した標品Cについて、水銀試薬量とプロテアーゼ活性との関係をFig. 3に示した。水銀剤は一般にSH酵素の活性中心のシステイン残基と次式に従って選択的に反応し活性を失活させる。



また、高濃度の状態では(2)はさらに⁹⁾



となり、Dimerが形成されると考えられている。

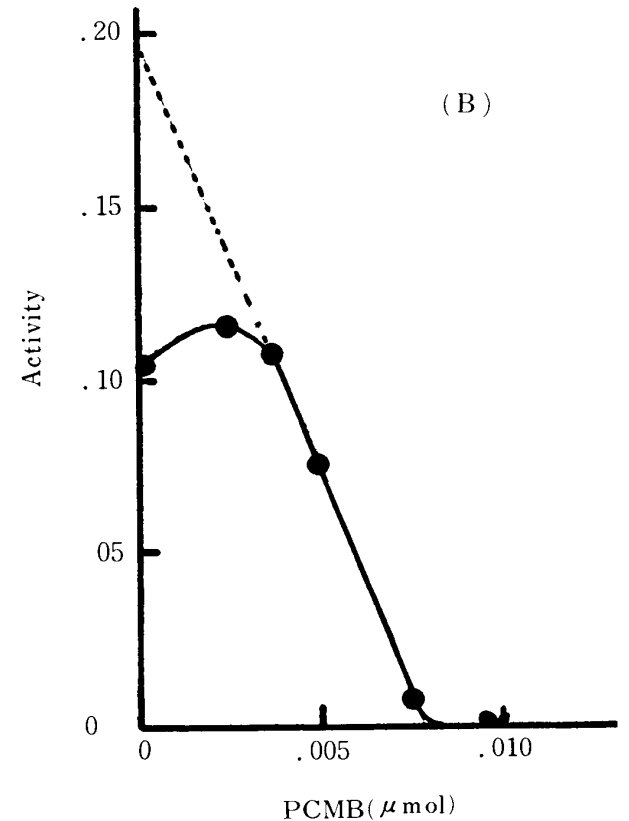
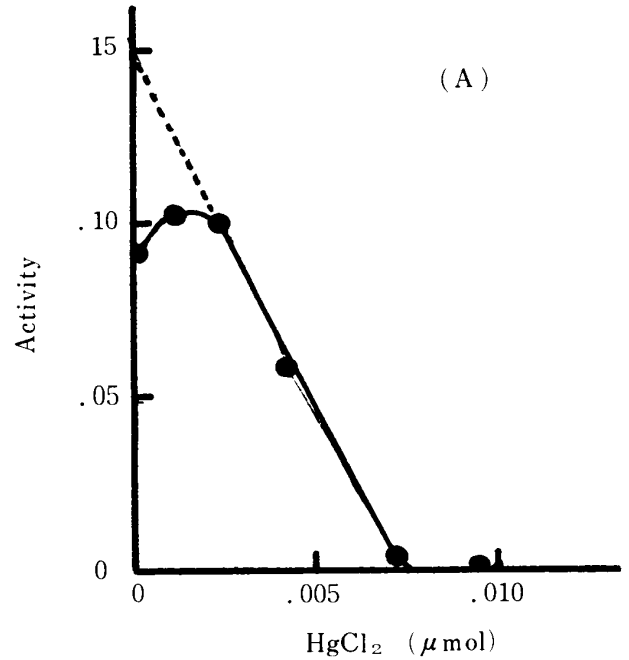


Fig. 3. Inhibition of ginger protease by HgCl₂ and PCMB. (A): Enzyme (0.0093 μmol) was reacted with HgCl₂, (B): enzyme (0.0124 μmol) was reacted with PCMB in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0.

Fig. 3では二価の水銀試薬として塩化水銀を、一価水銀試薬としてPCMBを用いた。反応の方法は、プロテアーゼ9mgを3mlの0.1Mりん酸緩衝液PH 6.0に溶かし、20mMのシステイン1mlを加え30分

間放置して酵素を活性化する。これを同緩衝液で平衡化したセフデックス G-25 のカラム (3.3×5 cm) に通しシステインを除く。その溶出液の 280 nm に於る紫外部吸収と容量とを測定して蛋白量を測り、この溶液 0.2 ml ずつを反应用試験管にとり、適当量の HgCl_2 又は PCMB を加え数分反応後 1% カゼインを加えて 50℃ で酵素反応させ常法のようにして酵素活性を測定する。塩化水銀を阻害剤として使用した時の結果は Fig. 3 の (A) に示されているが、阻害剤の濃度の低い範囲に於てはプロテアーゼ活性の失活が阻害剤の添加量に比例していない。また HgCl_2 を 0.0025 μmol 以上添加すると、その増加量に従って失活する。この傾向は阻害剤として PCMB を用いた Fig. 3 (B) の結果においても見られる。これら (A), (B) の阻害剤 0~0.0025 μmol 間のプラトー現象の原因として (i) 阻害剤の 0.0025 μmol までは活性中心以外に存在すると考えられる、またはコンタミとして存在する -SH 基によって消費される、(ii) 抽出以後の各種操作によって変性失活したプロテアーゼが依然として -SH 基をもっているためそれによる、(iii) Fig. 3 の条件下の実験では、酵素活性測定中には還元剤が全く含まれていない (なぜならシステインなどを共存させると、このシステインによって阻害剤は消費されてしまうから。) ので、このプロテアーゼが充分賦活されないから (A), (B) のような現象が見られる、などが考えられる。いいかえれば (i) は酵素の不純物による阻害剤の消費 (ii) は測定されるプロテアーゼ活性に反映されることのない変性失活プロテアーゼ中の -SH 基による阻害剤の消費 (iii) は -SH 酵素は賦溶剤としてシステインなどが共存しない場合、活性中心の -SH 基はある割合で酵素分子間または分子内で他の残基と何らかの化学結合を形成して活性が休止状態となっていると考えられ (このためもしシステインで賦活すると活性は約 50~100% 上昇することがこのプロテアーゼでも見られる。), Fig. 3 の (A), (B) の結果で阻害剤が 0~0.0025 μmol の範囲に於ては上記化学結合を壊すのに阻害剤が消費される、ということである。もしこのプラト、が (iii) のことのみによれば、Fig. 3 の (A) に於て外挿点からして、上記の化学結合は全酵素の約 30% 存在することになり、また Fig. 3 の (B) では約 40% である。また (i) の場合は後の Fig. 5 (A) の結果によって起っていることが証明されており、さらに (ii) の場合はプロテアーゼが自己消化を起すことを考えれば、充分あり得ることである。ここでは (i)(ii)(iii) の事が何% ずつの割合で起っているのかはいえないが、仮に

100% (iii) の事が起っているとすると Fig. 3 の (B) の場合 PCMB は一価の阻害剤であるから上式 (1) に従って反応しており、また後の Fig. 6 の結果や SDS-スラブ電気泳動の結果¹⁰⁾ からこのプロテアーゼの分子量を約 29,000 として計算すると、プロテアーゼ 0.0124 μmol の量に対し PCMB が 0.008 μmol 反応したとすると、このプロテアーゼには有効酵素が 64.5% 含まれることになる。Fig. 3 の (A) の場合も (B) の場合と同様な失活曲線が得られており二価の阻害剤である HgCl_2 も上式 (2) に従って反応したと考えられ、酵素 0.0093 μmol に対し HgCl_2 が 0.0075 μmol したことになりこの場合は有効酵素が 80.6% 含まれることになる。一方 (i) 又は (ii) あるいは (i)(ii) が同時に起っていて、かつ (iii) が全然起っていないとするとこのプロテアーゼの有効酵素は (A) からは 0.005 μmol (53.8%) となり (B) からは 0.0055 μmol (44.4%) と計算される。

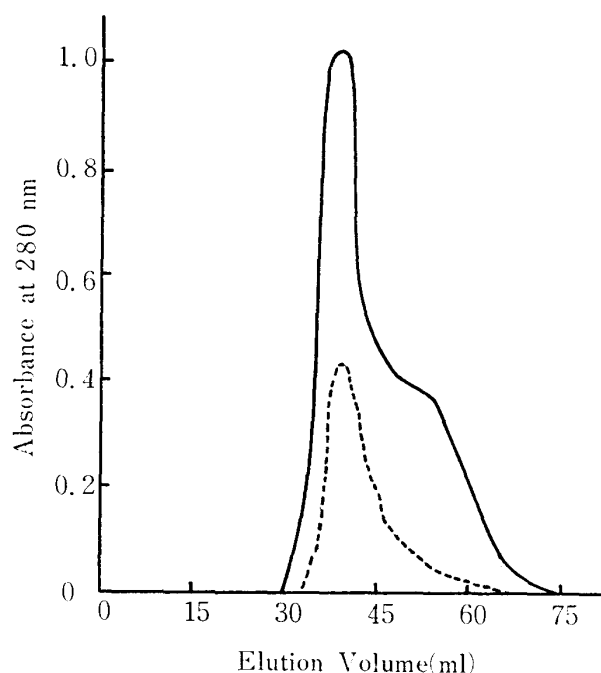


Fig. 4. Gel chromatography of the ginger protease reacted with HgCl_2 on Bio-Gel P-100. The column (1.5 ϕ ×70 cm) was equilibrated and eluted with 0.05 M phosphate buffer, pH 6.0; (—) absorbance at 280 nm; (-----) protease activity.

精製の途中で HgCl_2 で阻害したプロテアーゼを CM-セルロースクロマトにかけた後分子量的に均一にするために Bio-Gel P-100 でゲルクロマトグラフィした結果を Fig. 4 に示す。酵素活性は溶出容量 31~45 ml に出てくる主ピークに大部分が存在することが解るが、その後の肩ピークの部分にも一部存在す

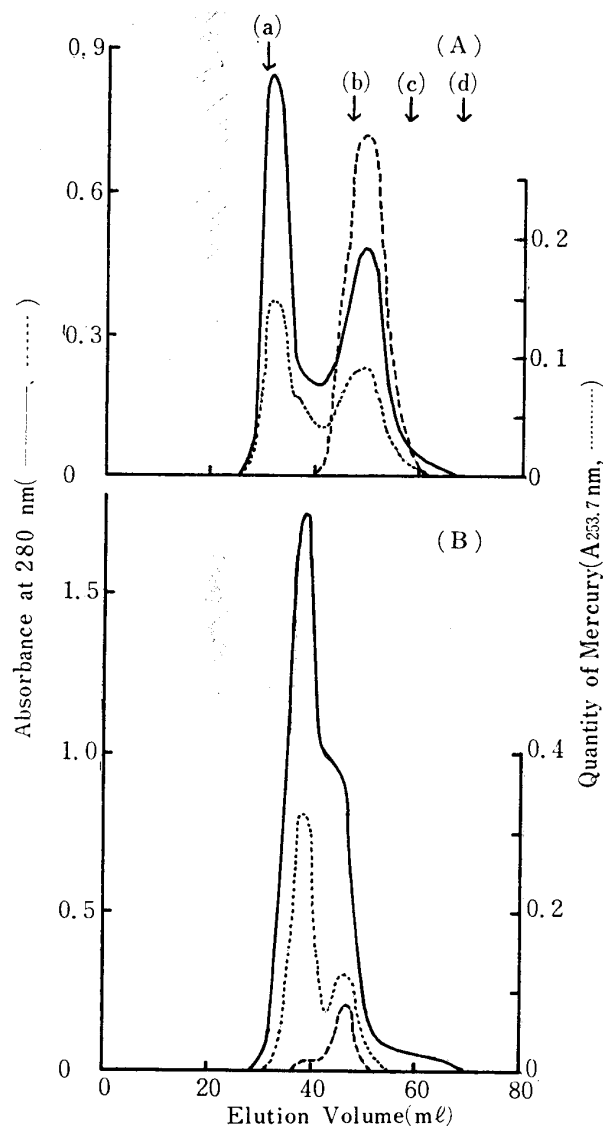


Fig. 5. Gel chromatography of the ginger protease reacted with PCMB on Bio-Gel P-100 column (1.5 ϕ \times 70 cm); the column was eluted with (A) 0.05 M phosphate buffer, pH 6.0, (B) deionized water; (-----) protease activity; (—) absorbance at 280 nm; (.....) incorporated mercury determined by the flameless atomic absorption method after the HNO₃-KMnO₄ digestion. Arrows indicate, (a) void volume, (b) elution volume of bovine carbonic anhydrase, (c) chymotrypsinogen A, (d) cytochrome C.

る。溶出容量 31~45 ml の画分は次の Fig. 5 (A) および Fig. 6 の実験から推定できる様に分子量が10万~3万2千の所であり、この Fig. 4 の結果は前々頁の式 (3) に従って二量体の形成を示している。このように二価である阻害剤 HgCl₂ は分子量的に均一にするためには後にのべる Fig. 5 (A) の結果と比べると適当でないことが明らかとなった。ここで一価である阻

害剤 PCMB を用いて同様のゲルクロマトグラフィーを行なった結果が Fig. 5 (A) である。この結果を見ると、第1ピークは水銀のとり込みはあるが、酵素活性はなく、第2ピークにはプロテアーゼと考えられるものが溶出する。すなわち PCMB を反応させプロテアーゼを安定化したものを Scheme 1 に従って精製した酵素には10万~4万の分子量のプロテアーゼ活性を持たないけれども PCMB と反応する能力のある蛋白質が不純物として存在するという事である。このクロマトグラムの 280 nm の蛋白質吸収量から推定すると大分子量の不純物が約50%含まれていたことになる。重量当りの 280 nm に於る吸収がこれら蛋白質間で同じと仮定すると、この Bio-Gel P-100 のゲルクロマトグラフィーによって PCMB-プロテアーゼは約2倍精製されたことになる。

このように Bio-Gel P-100 によるゲルクロマトグラフィーは精製に大変有効であることが明らかとなったが、もしこのクロマトグラフィーを Fig. 5 (A) のようなりん酸緩衝液を使わずに蒸留水を使ったら、後の脱塩操作が省略され有利と思われる。その結果が Fig. 5 (B) であり、溶出液に蒸留水を使う以外は全く Fig. 5 (A) と同じ条件である。Fig. 5 (A) と (B) を比較するとわかるように、(A) で第1ピークに相当するものが幾分遅れて溶出されている。また (A) の第二ピークに相当するものが少し早く溶出され、第一の不純物ピークと第二の酵素蛋白質ピークとの分離が悪くなっている。このことは (B) の蛋白質による吸収線 (—) から明らかに、酵素部は不純物ピークの肩として表われているから、この部分を採取しても (A) に比べ精製度の悪い標品しか得られないことがわかる。第一ピークが遅れて溶出されたのは、幾分イオン交換または吸着などの力が分子篩の作用に加わったためと考えられる。

分子篩的作用以外の影響が少ないと思われる Fig. 5 (A) の条件下で、ブルーデキストラン2000、卵アルブミン、ペプシン、牛赤血球カーボニックアンヒドラーゼ、キモトリプシノーゲン A、リゾチーム、チトクローム C を使用し、ショウガ・プロテアーゼの分子量を測定した。Fig. 6 のプロットからも明らかのように、最大29,000から最小26,500と推定できる。ふつう分子量測定の際は、溶出液に SDS や 6 M 塩酸グアニジンなどの変性剤を加えさらにジチオスレイトールなどの還元剤を加えて蛋白質中の S-S 架橋をはずし、分子的に棒状として測定される¹¹⁾。上記 Fig. 5 (A) の条件下では蛋白質は Native な状態にあり、正確に分子量を反映しない場合があるかもしれないが、

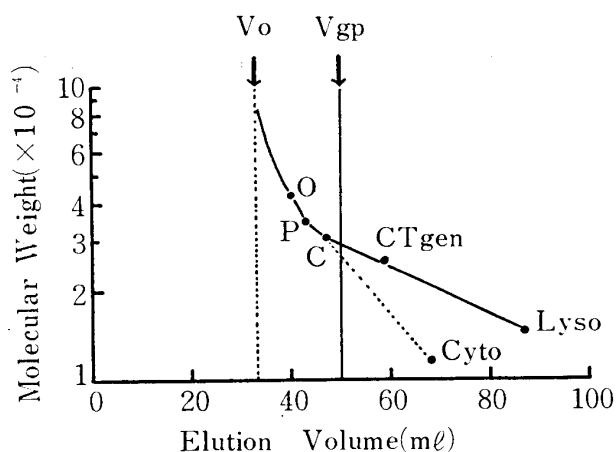


Fig. 6. Gel chromatography of proteins of known molecular weight and ginger protease on Bio-Gel P-100 in 0.05 M phosphate buffer, pH 6.0. The elution volume of each protein was plotted against the log of the molecular weight value; V_0 , void volume; V_{gp} , elution volume of ginger protease reacted with PCMB; O, ovalbumin; P, pepsin; C, bovine carbonic anhydrase; CTgen, chymotrypsinogen A; Lyso, egg white lysozyme; Cyto, cytochrome C.

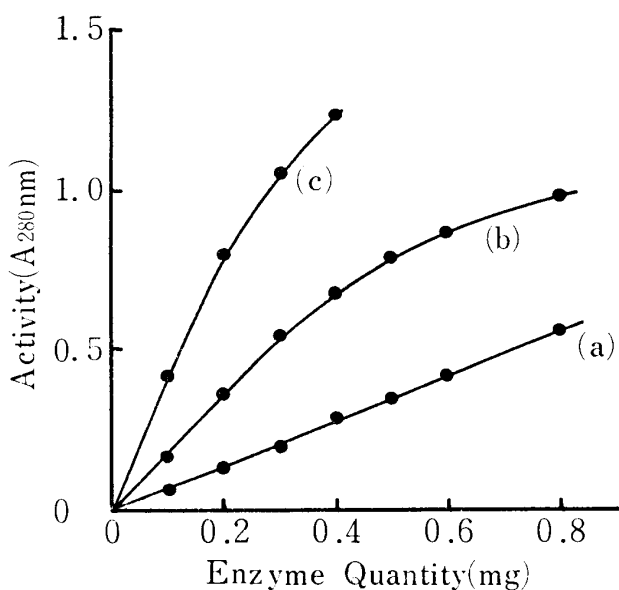


Fig. 7. Activity of the ginger proteases purified by the various methods; purified according to the method of Scheme 1, (a) without PCMB or $HgCl_2$, (b) with $HgCl_2$, (c) with PCMB and gel chromatographed on Bio-Gel P-100.

Fig. 6 で求めた値の29,000は SDS-スラブ電気泳動法¹²⁾で求めた前回の値¹⁰⁾とよく一致した。市川ら⁵⁾の報告では変性剤を用いない方法で Sephadex G-100 を用いてゲルクロマトグラフィーし、22,500という分

子量を得ているが、マーカー蛋白質として分子量 43,000の卵アルブミンと分子量11,700のチトクローム C の間をプロット上で直線と仮定して求めたため、6500という誤差を生じたものと思われる。

以上いろいろ試みた精製法の結果のうち、代表的な三種の標品についてプロテアーゼ活性を測定したのが Fig. 7 である。(a) は水銀剤を全く使用せずに Scheme 1 に従って精製した標品である。(b) は塩化水銀を Scheme 1 の CM-セルロースクロマトグラフィー前に加えプロテアーゼを安定化して精製した標品である。(c) は PCMB を Scheme 1 の CM-クロマトグラフィー前に加え安定化して CM-セルロースおよび Fig. 5 (A) に示した方法で精製した標品である。これら三者を比較すると (b) は (a) の約3倍に比活性が大きくなっていることがわかり、また (c) は (a) より約6倍上昇している。(c) は (b) の精製法に比べクロマトグラフィーの操作が一回多いが、Fig. 5 (A) に示されたように明らかに不純物を多量に除かれているのでまた Fig. 7 から比活性も最大であるので現在までのところ、この標品が最も純度の高いものである。

IV 要 約

ショウガの根に含まれる蛋白質加水分解酵素をアセトン処理、りん酸緩衝液抽出、CM-セルロースクロマトグラフィー、Bio-Gel P-100 によるゲルクロマトグラフィーなどの処理により高純度に精製した。この際プロテアーゼの自己消化防止剤(安定化剤)として、 $HgCl_2$ と PCMB の水銀剤を使用しその効果を比較検討したが、 $HgCl_2$ を反応させ Scheme 1 の方法で精製した酵素は、二量体の酵素が生成していて、Bio-Gel P-100 のクロマトグラム上で高分子の不純物と重り合った。PCMB で安定化した酵素を CM-セルロースクロマトグラフィーおよび Bio-Gel P-100 のゲルクロマトグラフィーにかけて得た標品は最も比活性も大きく純度の高いものであった。この標品は安定化剤を使用しないで精製し得られた標品の約6倍活性の強いものであった。またこの精製プロテアーゼの Bio-Gel P-100 による分子量の測定によると、2万9千であって、この値は SDS-スラブ-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって求めた前回の実験値¹⁰⁾とよく一致した。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(一般研究)の援助によった。また本研究中御協力戴きました伊藤禎子氏、印藤優子氏、藤井浩海氏に感謝致します。

す。

(1978年7月28日受理)

文 献

- 1) 井上吉之, 小野誠志, 杉田浩一, 森 雅央; 日本食品事典, 医歯薬出版, p. 281 (1968)
- 2) T.N. Ramachandra Rao, 食品工業, **7**, 114 (1964)
- 3) G.E. Perlmann, L. Lorand ed., "Methods in Enzymology" **XIX** p. 226 (1970)
- 4) E.H. Thompson, I.D. Wolf, C.E. Allen, J. Food Science, **38**, 652 (1973)
- 5) 市川芳江, 佐々初世, 道 喜美代; 栄養と食糧 **26**, 377 (1973)
- 6) 大槻耕三, 河端 信, 田口邦子; 生化学, **47** 470 (1975)
- 7) M.L. Anson, J. Gen. Physiol., **22**, 79 (1938)
- 8) W.R. Hatch, W.L. Ott, Anal. Chem., **40**, 2085 (1968)
- 9) A.A. Kortt, S. Hamilton, E.C. Webb, B. Zerner, Biochemistry, **13**, 2023 (1974)
- 10) 大槻耕三, 田口邦子, 河端 信; 生化学会近畿支部例会, 神戸, 5月26日 (1978)
- 11) 高木俊夫; 蛋白質 核酸 酵素, **18**, 367(1973)
- 12) K. Weber, M. Osborn, J. Biol. Chem., **244**, 4406 (1969)