

発表番号 43 (0545)

## 食塩と各種ミネラルの組み合わせによるイカ肝臓プロテアーゼの制御と機能性ペプチドの生産に関する研究

今野 久仁彦 (北海道大学大学院水産科学研究院)

イカの利用は可食部分である外套膜筋に限られ、内臓部分は殆ど産業廃棄物として処分されている。内臓の大部分を占める肝臓にはタイプの異なるプロテアーゼが存在することが明らかにされている。本研究では、肝臓に含まれるプロテアーゼ群を利用して、他の未利用水産資源あるいは水産残渣に含まれているたんぱく質に作用させ、新たな食品副原料を生産させることを目的とした。そのため、肝臓に含まれている個々のプロテアーゼが、魚肉たんぱく質、ミオシンをどのように切断するかを検討した。そして、切断に対する反応系の塩組成、反応温度の影響を調べた。そして、得られた消化物の食品機能性の一つの可能性として、油脂結合能を測定した。

特異的各種阻害剤の組み合わせ実験から、イカの肝臓にはシステインプロテアーゼ(CP)、セリンプロテアーゼ(SP)、および、金属プロテアーゼ(MP)が存在することが分かった。それらを阻害する3種の阻害剤を一緒に加えると、完全にミオシンの消化は起こらなくなった。そして、そこから1種の阻害剤を抜くことで、残りのプロテアーゼの切断パターンを知ることができた。MPの活性は最も高かった。MPはミオシンを中央で選択的に分解し、明瞭な長い生成物が得られた。CPの活性はMPより小さかった。そのミオシン切断には選択性がなく、無数の短い断片を生成させた。SPの活性はこれらに比べ非常に低かった。これら3種の酵素による消化初期の断片を硫酸分画、Western blot法を用いて解析した。いずれのプロテアーゼもミオシン分子の中心近傍(HMM/LMM)で切断することがわかった。しかし、高温(37℃)では3種のプロテ

アーゼのうち、CPの作用が顕著に増大し、ミオシンの小断片化がより顕著になった。SPの活性も高くなったが、逆にMPの作用は小さくなった。しかしながら、3種の阻害剤を全て加えると、完全に阻害されたので、3種が作用していることは変わらなかった。

3種の活性に対する塩濃度の影響を、KCl, NaClを用いて比較検討した。塩濃度が低い場合は(0.1 M)、活性は低く、0.3 M - 0.5 Mで最大の活性を示したので、ミオシンが溶解すると分解が促進されることがわかった。NaClを使用した場合は、3種の酵素のうちCP, MPの活性が高いのが特徴であった。一方、KClの場合は、MPの活性は高かったが、CPの活性はNaClに比べ、非常に低いのが特徴であった。SPの活性レベルはどちらの塩を用いた場合でも低かった。この結果は共存する塩の種類(NaCl, KCl)とその濃度を使い分けることにより、ミオシンを小断片化させるCPの活性をコントロールできることを意味している。

ミオシンの消化条件を調節することで、サイズの異なる生成物を得た。その脂質結合性を調べたところ、両者とも脂質結合能を有していた。しかし、高分子の成分の方が低分子より結合能は高かった。この結合能は卵白たんぱく質よりも優れていた。

以上のことから、イカ肝臓酵素の反応条件をうまく設定することで、いろんなサイズの生成物を得ることができ、いろんな利用が可能であることが明らかとなった。その利用形態については今後さらに検討する必要がある。



助成番号 0545

## 食塩と各種ミネラルの組み合わせによるイカ肝臓プロテアーゼの制御と機能性ペプチドの生産に関する研究

今野 久仁彦 (北海道大学大学院水産科学研究院)

### 1. 研究目的

魚介類の中でイカは私たち日本人の嗜好にあった食べ物として親しまれ、鮮魚および水産加工原料として重要な位置を占めている。しかし、イカの中でも利用されている部分は、可食部分である外套膜筋およびヒレ、足に限られており内臓部分は肝臓がイカ塩辛の製造に少量利用されるだけで、殆ど廃棄処分されているのが現状である。この廃棄物である肝臓に含まれている各種機能性物質を利用できれば、廃棄物は資源と変わる。イカ肝臓に含まれる成分は脂質、たんぱく質、その他の化合物など多岐に渡る。われわれは肝臓の酵素に注目して研究を行ってきた。これまで、他の研究者によりイカ肝臓にはカテプシン系のシステインプロテアーゼ<sup>1-4)</sup>、金属プロテアーゼ<sup>5)</sup>が存在することが明らかにされている。しかし、肝臓全体のプロテアーゼに関する研究は不十分である。また、精製などの処理をせずに、そのまま利用することができれば、現実的な利用が可能となる。そこで、本研究は、肝臓に含まれるプロテアーゼ群を未利用水産資源あるいは水産残渣に作用させることを想定し、魚肉たんぱく質を基質として、個々の酵素の特性を把握し、それぞれの酵素による筋肉たんぱく質切断を検討した。その際、分解に対する反応系の塩組成、反応温度の影響を検討した。そして、得られた消化物を食品添加物として使用する目的で、食品機能性の一つの可能性として、油脂結合能について検討した。

### 2. 研究方法および研究材料

#### 2.1 実験材料

プロテアーゼの調製に用いたスルメイカ (*Todarodes pacificus*) は当日に水揚げされたものを市場で購入し、ただちに肝臓を取り出し、肝臓を包んでいる膜を取り除いて、その内部のみを使用した。

プロテアーゼの基質として用いた筋原繊維はコイ (*Cyprinus carpio*) の背肉から調製した。コイ活魚は即殺後、直ちにその背肉を切り取り、筋原繊維を調製した。

#### 2.2 イカ肝臓からの粗酵素液の調製

スルメイカ肝臓約 5 g に対し、10 倍量の 0.1 M NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を加え、ポリロンを用い、

12,000 rpm、30 秒ずつ 4 回ホモジナイズした。これを遠心分離 (20,000 x g, 20 min) すると、上層に脂質層、沈殿に残渣が得られた。上層に浮遊した脂質はアスピレーターを用い、吸引しながら取り除いた。さらに、この透明な水溶性部分を遠心チューブに移し、もう一度遠心分離 (4°C, 13,000 rpm, 20 min) し、ここで得られた中間水層をそのまま粗酵素抽出液として使用した。

#### 2.3 プロテアーゼ基質のコイ筋原繊維の調製

筋原繊維は加藤らの方法に準じて調製した<sup>6)</sup>。すなわち、コイ背肉を細切し、0.1 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を加え、攪拌した後、遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) した。この先の洗浄により、筋肉中の ATP を除去し、その後のホモジナイズ中での筋肉の収縮を防いだ。得られた細切肉をさらに同液中で洗浄、ポリロンを用い、12,000 rpm、30 秒ずつ 4 回ホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離 (3,000 rpm, 15 min)、その後、沈殿の再懸濁を繰り返すことで洗浄し、最終的にガーゼろ過したろ液を筋原繊維として使用した。

#### 2.4 筋原繊維のプロテアーゼ消化法

詳しくは結果で述べるが、基本的な反応条件は、0.5 M NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、20°C とした。NaCl 濃度および反応温度は目的により変えた。また、反応の停止は反応液 0.2 ml に対し 0.1 ml の SDS カクテル (5% SDS, 5% 2-メルカプトエタノール, 50% グリセロール, 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.05% プロモフェノールブルー) と 0.2 ml の H<sub>2</sub>O を加え、直ちに沸騰水中で加熱することで行った。反応液と当量の H<sub>2</sub>O を加えたのは反応液に含まれる塩濃度を半分に下げ、SDS-PAGE における泳動パターンを乱れを防ぐためである。

#### 2.5 プロテアーゼ活性の測定

筋原繊維を基質としたプロテアーゼ反応速度活性はプロテアーゼによるミオシン重鎖 (MHC) の分解消失速度を SDS-PAGE により求めた。すなわち、反応停止後、サンプルを SDS-PAGE に供し、泳動図形に得られた MHC の残存量をデンストメトリー法で求め、その経時的減少を 1 次反応式に従い解析して、その速度をプロテアーゼ活性とした。

#### 2.6 消化生成物の硫安分画法による分画

消化によって得られた物に含まれるミオシン分解生成物は硫安分画によっても分画、同定した。すなわち、消化物を 0.5 M NaCl に溶解した後、そのまま(-ATP)あるいは 2 mM Mg-ATP のある条件存在下(+ATP)、ない条件で 40 %になるよう飽和硫安溶液を加え、遠心分離(20,000 x g, 20 min)した。上澄みに得られた中の成分を SDS-PAGE で解析した。

## 2. 7 Western blot 法による消化生成物の同定

消化生成断片の同定には、S-1 HC に対する抗体を用いた Western blot 法も使用した。すなわち、消化物、あるいは消化分画物を SDS-PAGE で分離し、分離したタンパク質をニトロセルロース膜に電気泳動的に転写した。たんぱく質を含まない部分はミルクカゼインでブロックした。まず、ウサギ抗コイ S-1 HC の1次抗体(1/500 希釈)で S-1 を含むバンドを認識させた。抗体を結合したバンドを可視化させるため、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG 2次抗体(1/5,000 希釈)を反応させ、3,3' ジアミノベンチジンと H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による発色反応により可視化した。

## 2. 8 消化生成物の油脂結合能

筋原繊維に異なる量の粗酵素(10, 50 μl を加え、20°C で 2 時間消化し、生成ポリペプチドの分子量が比較的大きい場合と、小さい場合の 2 種の生成物を作成した。消化物を 90°C で加熱した後、水に対して十分透析した。得られた分解物を凍結乾燥させて、粉末とした。その粉末に対して、20 倍量の大豆油を加え、ホモジナイズした。この混合物を室温で 30 分放置した後、遠心分離した。上澄みに得られた結合できなかつた脂質を捨て、たんぱく質沈殿の重量増加から、加水分解物 1 g あたりの結合量を算出した。なお、対照として、食品添加物として使用されている卵白および牛血清たんぱく質についても同条件で測定した。

## 2. 9 SDS-PAGE

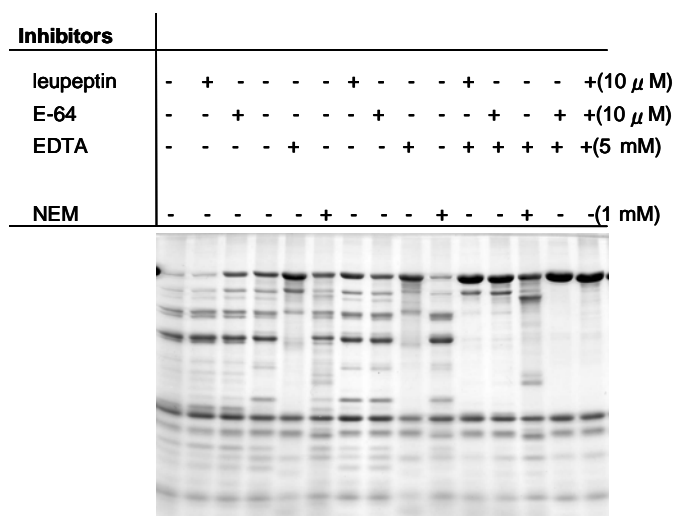
SDS-PAGE は 0.1% SDS を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて行った<sup>7)</sup>。タンパク質染色は CBB R-250 によって行い、染色強度をデンストメーターで測定することにより MHC の定量を行った。また低分子のペプチドを解析する場合は、15% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。

## 3. 実験結果と考察

### 3. 1 各種プロテアーゼによるコイ筋原繊維の分解パターン

イカの肝臓にどのような種類のプロテアーゼが含まれているか、これまでの研究報告を参考にしながら、阻害剤を組み合わせて、それらの添加による阻害の様子を調

べた(0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20°C) (Fig. 1)。



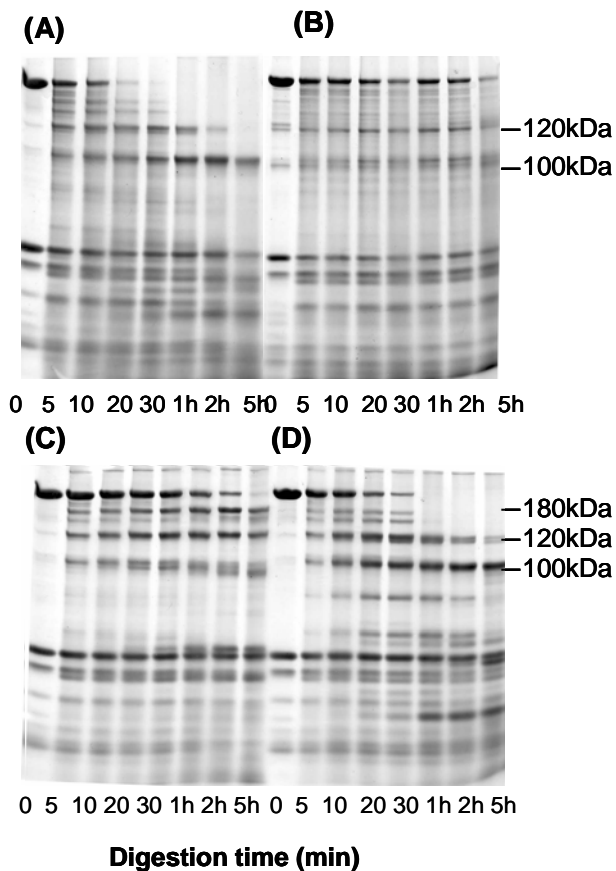
**Fig. 1 Inhibition spectra of squid liver protease.**

The inhibitory effects of various inhibitors on the digestion of myofibrils by squid liver protease were examined. The concentrations of the inhibitors used were listed in the figure. The digestion was performed at 20°C for 20 min. The added inhibitors were shown by the mark of (+) on the top of SDS PAGE patterns.

まず各阻害剤を単独で加えた場合は、Trypsin, plasmin, papain, cathepsin B を阻害する Leupeptin は全く阻害しなかつた。Calpain, cathepsin B などシステインプロテアーゼ(CP)を阻害する E-64 は弱いながらも阻害が起こった。同じくシステインの SH 基に結合する NEM によっても、同程度の阻害が起きた。Trypsin, chymotrypsin などセリンプロテアーゼ(SP)を阻害する PMSF の添加も弱いながら阻害を示した。しかし、金属プロテアーゼ(MP)を阻害する EDTA を添加すると、著しい阻害が起きた。特に、この場合、無添加で顕著に生成した 120 kDa と 100 kDa のサイズのフラグメントが生成されなかつた。しかし、MHC のすぐ下のバンドは消失しなかつた。このバンドは EDTA にさらに PMSF を加えると消失した。そして、EDTA, E-64, PMSF を加えると、完全にミオシンの消化が阻害された。このことから、この条件(20°C, 0.5 M NaCl)では肝臓の酵素のうち、MP が主体的に作用し、それに加え、CP, SP も弱いながら作用することがわかつた。

この実験から、それぞれの酵素による切断位置が異なり、異なる生成物ができることが示された。そこで、1 種の酵素のみを筋原繊維に作用させたときの、ミオシン分解パターンの違い、および消化速度(すなわちプロテアーゼ活性)について比較検討した。すなわち、反応系に EDTA, E-64, PMSF のうち二つの阻害剤を加えることで、

加えなかった阻害剤によって阻害されるべき活性のみを残した。また、阻害剤無添加の系も同時に行い、どの酵素が主体的に作用しているか、検討した。結果を Fig. 2 に示した。



**Fig. 2 Comparison of the digestion pattern by three types of proteases in squid liver.**

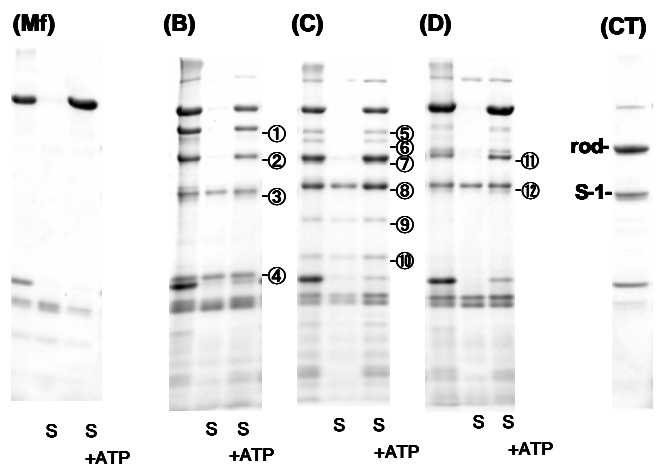
Carp myofibrils were incubated in the medium of 0.5 M NaCl at 20°C with squid liver protease together with none (A), EDTA and PMSF (B), E-64 and EDTA (C), and E-64 and PMSF (D).

阻害剤を何も加えない場合 (Fig. 2A) は初期に 120 kDa と 100 kDa が生成されたが、次第に小断片化された。CP では (Fig. 2B)、あまり明瞭なバンドが認められず、レーン全体に無数のバンドが認められるのが特徴であり、ミオシンは小断片化されているのがわかった。SP による分解 (Fig. 2C) では 180 kDa が反応初期に生成されるのが特徴であった。しかし、その分解はかなりゆっくり進行した。MP では (Fig. 2D)、120 kDa、100 kDa が主な生成物であった。しかし、消化を続けていくと、120 kDa は次第に消失し、より短い断片に変化した。また、阻害剤無添加の場合の全体の分解パターンは金属酵素によるものが一番似ていた。さらに、CP のみが作用している場合および阻害剤無添加の場合は、アクチンのバンドが消失していることから、かなり無秩序に、たんぱく質の種類に関係なく

分解させるプロテアーゼであることが明らかとなった。

### 3. 2 硫酸分画法および Western blot 法による生成フラグメントの同定

各プロテアーゼによりミオシンの切断パターンが異なることが明らかとなった。消化後半では小断片化も起こり、生成物の同定も難しいと判断されたが、消化初期では明確な生成物を確認できた。そこで、これらの条件で得られた消化初期の生成断片を硫酸分画法により同定し、ミオシンのどの部分で切断されるか調べることにした。すなわち、頭部を有する断片 (S-1, HMM 様断片) アクチンに結合しているため、アクチンとともに 40%飽和硫酸で沈殿し、ATP-Mg を添加させ解離させると上澄みに回収される。そして、アクチン結合能を持たない尾部由来の断片 (rod, LMM 様断片) は ATP-Mg の有無に関わらず上澄みに回収されると予想される。CP 作用系では、バンドとして認められるフラグメント断片⑪,⑫ (Fig. 3D, ⑪,⑫) に注目した。



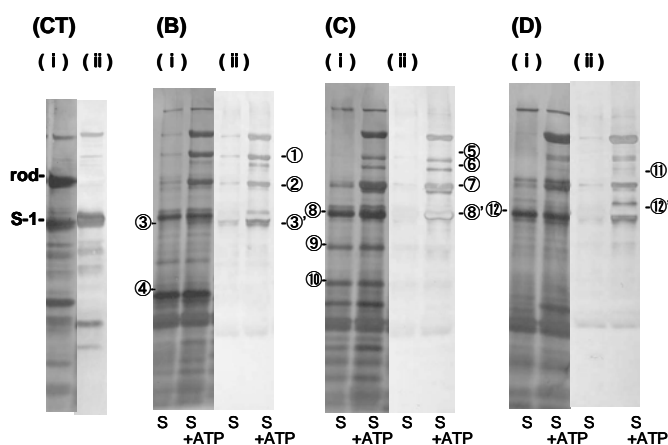
**Fig. 3 Separation of the fragments by salting-out with ammonium sulfate.**

Carp myofibrils in 0.5 M NaCl were incubated with squid liver protease together with combination of inhibitors at 20°C for 20 min. (B), (C), (D) are the incubation systems corresponding to (B), (C), and (D) in Fig. 2, respectively. The digest was separated by 40% saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . S, S+ATP denote the fractionation without ATP or with Mg-ATP, respectively. ① through ⑫ are the bands detected. S-1, rod in (CT) are Chymotrypsin S-1 and rod, respectively. (Mf) is the fractionation for the undigested myofibrils.

他の SP, MP の場合は固有のはっきりとしたバンドが検出された。すなわち、CP の消化では①、②、③、④のバンド、MP の消化では⑤、⑥、⑦、⑧、⑨、⑩のバンドである。SP で生成するフラグメント③、④は ATP なしでも上澄みに回収され、その分子量から LMM 様成分であることがわかった。そして、①、②は ATP を加えてはじめて出現

するので、それぞれ③、④の LMM の相手である HMM である可能性が高い。同様に、MP で生成するフラグメント⑧、⑨、⑩は、アクチン結合能を有しない LMM 様成分であろうと考えられた。そして、⑤、⑥、⑦はこれらの相手になる HMM 様成分と推定された (Fig. 3C)。CP による分解でもフラグメント⑫が、LMM 様成分で⑪は HMM 様成分であると推定された。これらの結果は断片が異なるので切断位置はお互い異なるが、いずれのプロテアーゼによっても、ミオシンは分子の中央付近で HMM と LMM へ切断されることがわかった。

さらに、ミオシンから生成する成分が HMM、LMM 様成分であることを確かめるため、western blot 法を用いて Fig. 3 の硫安分画法で得られたフラグメントを分析し、Fig. 4 に示した。



**Fig. 4 Identification of fragments in the digests by western blotting.**

The same samples in Fig. 3 were used. (B), (C), and (D) are also the same as in Fig. 3. (CT) is the cymotryptic digest of myofibrils. (S), (S+ATP) are also the same as in Fig. 3. Bands ① through ⑫ are the same as in Fig. 3, and ③ to ⑫ are new bands detected here. (i) and (ii) are bands visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue and immuno-staining, respectively.

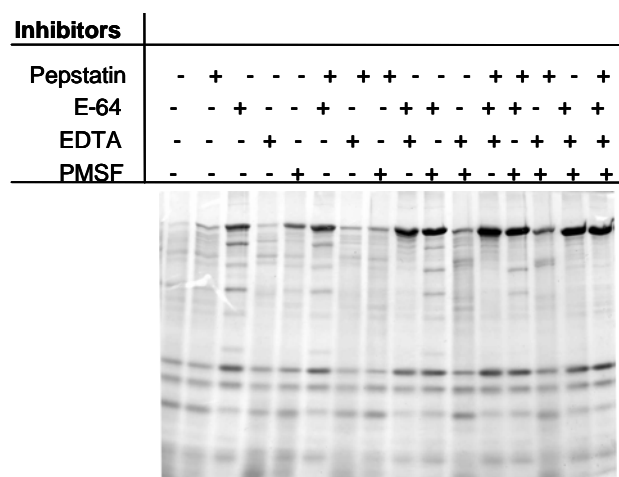
Fig. 3 の結果を支持するように、SP で生成した LMM と推定したフラグメント③、④は抗体と反応しなかった。そして、HMM と推定したフラグメント①、②は抗体と反応した (Fig. 4B)。同様に、MP でも、フラグメント⑧、⑨、⑩は抗体と反応しておらず、LMM 様断片であり、抗体と反応したフラグメント⑩、⑨、⑧がそれらの相手であるという考えは支持された。CP の系でもフラグメント⑫は反応せず、LMM 様断片であり、フラグメント⑪は HMM 様断片と考えられた。これらのことより、この消化条件では、ミオシンは主に HMM と LMM に切断されると結論した。

スルメイカ外套膜筋肉中の MP もミオシンを

HMM/LMM に切断することが知られているので<sup>5,8,9)</sup>、イカ肝臓に含まれている MP は筋肉のものと良く似ていることが分かった。

### 3. 3 高温条件でのイカ肝臓プロテアーゼ活性

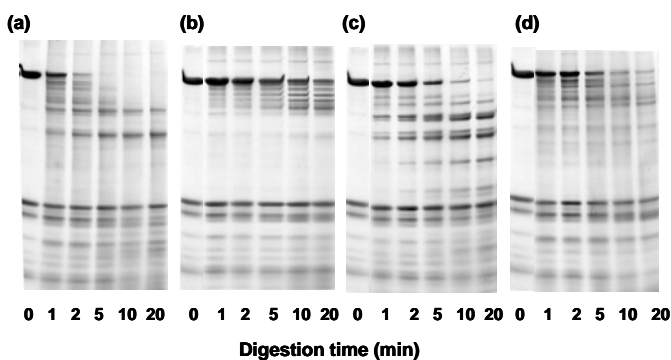
これまでの結果は、20°C で消化させた場合である。この温度では MP が中心的に作用していることが分かった。次に、より高温で消化させた場合も、同じ結果が得られるのか検討した。そこで、反応温度を 37°C に上昇させ、3 種の活性について阻害剤 (E-64, EDTA, PMSF および pepstatin) を使用して調べた。その結果を Fig. 5 に示す。



**Fig. 5 Inhibition spectra of the squid liver protease at 37°C**  
The same sets of experiment as in Fig. 1 were conducted by elevating the reaction temperature to 37°C. The inhibitors used were on the gel patterns.

37°C では、阻害剤のうち、E-64 の阻害が著しかった。一方、20°C で高い効果のあった EDTA を添加しても、阻害は非常に小さかった。また、PMSF にも EDTA より強い阻害効果が認められた。すなわち、高温では CP が主体的に作用し、さらに SP も作用するが、MP の寄与は小さいことがわかった。E-64 に EDTA を添加するとほとんど、分解が起こらなくなるほど強い阻害が認められた。これは EDTA 単独の作用が小さいことと一致しなかった。また、E-64 に PMSF を添加してもかなりの阻害の増大が認められた。しかしながら、EDTA と PMSF の組み合わせではほとんど PMSF のみの阻害と差がなかった。単純な和とはならないので、共同的作用があるのかもしれない。しかしながら、3 種の阻害剤を全て加えると、完全に阻害された。この点は低温の場合と同じであったので、高温でも 3 種の酵素のみが作用していることがわかった。そこで、高温における 3 種の酵素の分解特性を知るため、低温と同じ方法でミオシン分解の様子を追った。その結果を Fig. 6 に示す。阻害剤無添加の場合は、MHC が著しく速く消

失し、その後、明瞭なバンドも失われてしまった。単独の酵素によるMHC消失速度は、阻害剤無添加に比べ、明らかに遅くなったので、複数の酵素が作用していることがわかった。CPによるMHCの消失が3種の中で最も速く、この条件では最も活性が強いことが確認された。また、CPによる分解は、無添加のパターンに類似していた。すなわち、反応後期には、選択性の低い無数の切断が起こっているような消化パターンとなった。SPによる消化速度は小さく、MHCの下に多数のバンドが生成するパターンを示した。MPは、20°Cでの結果と同じように、選択的な2本のバンドを生成させた。高温ではミオシンを短い断片にするには適しているが、選択的な比較的長い断片を生産させるには適していないことがわかった。



**Fig. 6 Comparison of the digestion pattern by various types of squid liver protease at 37°C**

Digestion patterns at 37°C was compared. (a), (b), (c), and (d) are the patterns without inhibitor, with E-64 and EDTA, and with E-64 and PMSF, with EDTA and PMSF, respectively.

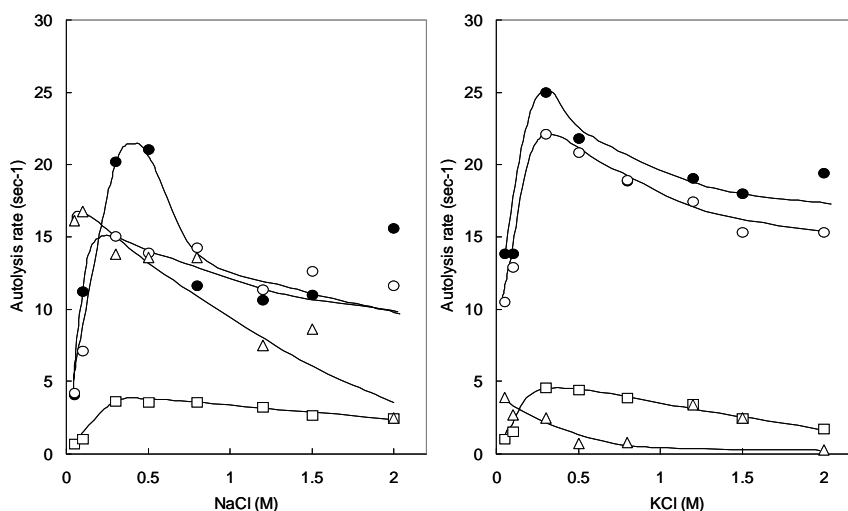
### 3.4 各種プロテアーゼの活性に及ぼす塩濃度の影響

これまでは筋原繊維中のミオシンが溶解している 0.5

M NaCl の条件で酵素の作用を検討してきた。次に、活性に対するNaCl濃度の影響、すなわち、ミオシンが不溶化している低塩濃度の場合、溶解している条件、さらに、非常に高濃度の塩を加えた場合を想定して検討した (Fig. 7)。反応は 20°Cで行った。まず、阻害剤無添加の場合は、NaCl, KCl いずれを用いた場合も 0.1 M など塩濃度が低い場合は、活性は非常に低くなった。そして、NaCl では、0.3 M で、KCl では 0.5 M で最大の活性を示した。この濃度は、筋原繊維が溶解する濃度と一致しているため、筋原繊維のミオシンが溶解すれば、ミオシンの分解が促進されることが推定された。それ以上塩濃度が上昇すると、かえって活性は多少減少した。しかし、2 M でも、0.1 M に比べれば高いレベルを維持した。NaCl を使用した場合は、3 種の酵素のうち CP, MP の活性が高く、塩濃度が高くなると低下した。一方、KCl の場合は、MP の活性は高かったが、CP の活性は NaCl に比べ、非常に低いのが特徴であった。また、SP の活性レベルはどちらの塩を用いた場合でも低かった。この結果は共存する塩の種類 (NaCl, KCl) とその濃度を使い分けることにより、ミオシンを小断片化させる CP の活性をコントロールできることを意味している。

### 3.5 筋原繊維消化物の脂質結合能

これまでの結果から、消化条件を変えると筋原繊維から長さの異なるポリペプチドが生成されることが明らかとなった。そこで、粗酵素を少量使用し、MP による生成断片が検出できる比較的消化初期と、比較的少量の粗酵素を作用させ、CP による小断片化が起きた生成物について、食品添加物としての可能性を検討した。



**Fig. 7 Effect of NaCl and KCl concentration on the three types of protease activities.**

(closed circles), (squares), (open circles), and (triangles) are the activities without inhibitor, with E-64 and EDTA, and with E-64 and PMSF, with EDTA and PMSF, respectively.

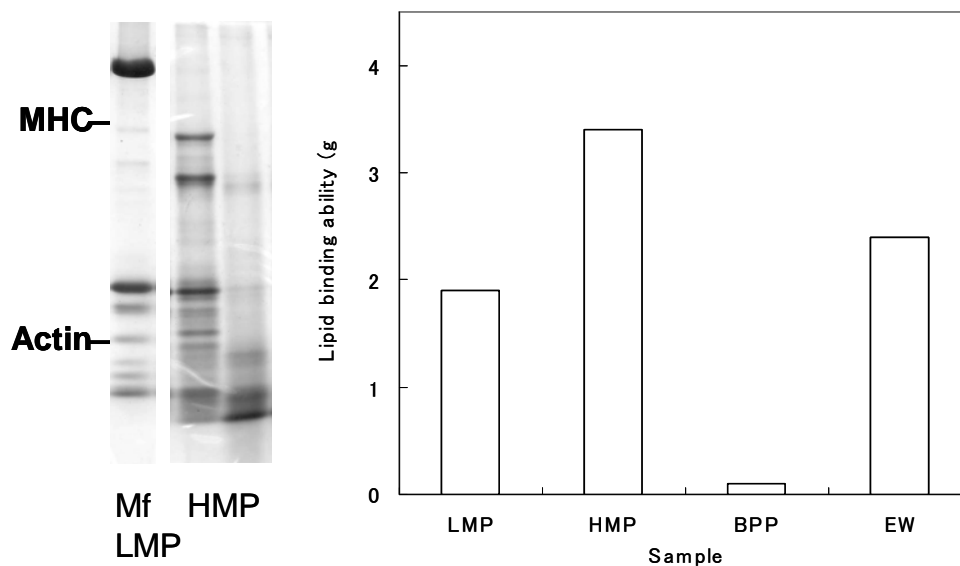
消化物は、90℃で加熱し、酵素を失活させた後、透析により、塩やその他の低分子成分を除いた。用いた消化物を Fig. 8 の SDS-PAGE として示したが、透析後のたんぱく質量を測定したところ、消化が進まない場合は 95% 以上の、進んだ場合も 80% 程度の回収率であった。すなわち、低分子といっても、アミノ酸や短いペプチドにまで達していない試料である。調製された生成物の食品添加物としてのひとつの可能性を知るため、脂質結合能を既存のたんぱく質と比較しながら調べた。塩類を除き、凍結乾燥させた断片に大豆油を加え、ホモジナイズしてから、遠心分離でたんぱく質を沈殿として回収した。そして、脂質添加前の重量からの増加量を脂質結合量とした。結果を Fig. 8 に示す。消化が進んだ短い断片も 1 g 当たり 2 g 近い結合量があった。さらに長い断片を使用した場合はさらに結合量が上昇し、3.5 g に達した。これらの値は、牛血清たんぱく質にほとんど結合能が認められなかったため、優れた結合能を保持していることが明らかとなった。さらに、長い生成物を持つ消化物は卵白たんぱく質よりも優れた脂質結合能を示した。

これ以上の機能は時間の関係で調べることができな

かったが、さらに消化物のその他の可能性を検討する必要がある。

#### 参考文献

- 1) Nara, S.: *Agric. Boil. Chem.*, 25, 473-478(1961)
- 2) 高橋 喬: *日水誌*, 26, 504 (1960)
- 3) 高橋 喬: *日水誌*, 27, 85 (1961)
- 4) Inaba, T., Shindo, N., Fujii, M.: *Agric. Boil. Chem.*, 40, 1159-1165(1976)
- 5) Tamori, J., Kanazawa, N., Tamiya, T., Tsuchiya, T.: *J. Biochem.*, 126, 969-974(1999)
- 6) 加藤登、内山均、塚本志郎、新井健一: *日水誌*, 43, 680-685 (1977)
- 7) Laemmli, U.K.: *Nature*, 227, 680-685 (1970)
- 8) Okamoto, Y., Otsuka-Fuchino, H., Horiuchi, S., Tamiya, T., Matsumoto, J.J., Tsuchiya, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1161, 97-104 (1003)
- 9) Konno, K., Fukazawa, C.: *J. Food Sci.*, 58, 1198-1202 (1993)



**Fig. 8 Lipid binding abilities of the hydrolyzed product of myofibrils.**

Myofibrils were digested with crude enzyme at different extent. SDS-PAGE for the products were shown on the left side of the figure. Mf, LMP and HMP are the myofibrils used, hydrolyzed products with high and molecular weight, respectively. BPP and EW are bovine plasma protein and egg white, respectively.



0545

## Regulation of squid liver protease by the combination of salt and minerals

Kunihiko Konno (Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

### Summary

We utilize only edible muscle part of squid as food. Viscera are discarded as an industrial waste. It is well known that squid liver contains various types of protease activity. The purpose of the research is to characterize the degrading ability of the protease in squid liver aiming to utilize them as useful bioactive enzymes. Muscle protein of fish (myosin) was used as a substrate for the enzymes. Cleavage pattern of myosin by the enzymes were studied by changing the digestion conditions. Lipid binding ability of the digestion products was measured to test the possibility as the food functional additives.

Squid liver contains three types of protease, cystein- (CP), metallo- (MP), and serine-protease (SP) as revealed by the inhibition test. A mixture of three inhibitors for the respective enzymes completely inhibited the digestion by the crude enzyme. Digestion pattern for each enzyme was studied by eliminating one out of the three inhibitors. MP showed the highest activity cleaving myosin at near center. CP was less active than MP. Digestion patter for CP was less specific producing enormous numbers of short peptides. Activity of SP was the lowest among three enzymes. Cleavage site by these three enzymes were studied by using ammonium fractionation and Western-blotting method of the products. All of enzymes preferentially cleaved roughly at the center of myosin molecule in an early phase. Elevation of the digestion temperature to 37°C promoted the digestion by CP. Contribution of MP became less at high temperature. Consequently, major products at high temperature were short peptides mainly produced by CP.

Effect of salts (KCl, NaCl) on the activity for the three enzymes was further studied. Activity at 0.1 M was low, while increased with increasing salt concentration to 0.3 M-0.5 M when crude enzyme was used. The concentration was one for dissolving myosin by salts. A further increment of salt concentration rather inhibited the activity. CP and MP both showed a high activity in the presence of NaCl. KCl inhibited the activity of CP, while the activity of MP was not. Increase in neither NaCl nor KCl concentration increased the activity of SP. These results suggested that the size of the products would be regulated by controlling the type of salts and their concentrations considering the properties of three enzymes.

Lipid binding abilities of degraded myofibril proteins with different sizes were studied to examine the possibility to use as functional food additives. Irrespective of the sizes of the products, both hydrolyzed products bind soybean oil. The product with long peptides was superior to one with short peptides. The ability was much better than that of egg white.