

蛋白分解酵素

アクチナーゼ®

ACTINASE

(プロナーゼ、PRONASE)

# 目 次

I. アクチナーゼ製品 .....	1
II. アクチナーゼの性質 .....	1
1. 性 状 .....	1
2. 安定性 .....	1
(1) Caイオンの保護効果 .....	1
(2) 水溶液中での安定性 .....	2
(3) pHに対する安定性 .....	2
(4) 温度に対する安定性 .....	3
3. 至適pH .....	4
4. 至適温度 .....	4
5. 基質特異性 .....	5
6. 蛋白加水分解度 .....	6
7. 酵素活性阻害因子 .....	6
8. 酵素力価の測定方法 .....	6
9. アクチナーゼの貯法 .....	8
10. アクチナーゼの脱Ca法 .....	8
11. アクチナーゼの無菌化法 .....	8
III. アクチナーゼの用途（試薬） .....	9
1. 蛋白質の構造研究 .....	9
2. 赤血球の構造、機能研究 .....	9
3. 各種糖蛋白からの糖ペプチドの分画の精製、分離 .....	9
4. 生体組織中の非蛋白質の抽出 .....	9
5. 細胞培養 .....	9
6. 抗原の分離、解析 .....	9
7. 高蛋白食品中のビタミンB <sub>1</sub> 、B <sub>2</sub> 、油性天然色素の定量 .....	9
8. ウイルスからの核酸の分離 .....	10
9. 百日咳菌の感染防御抗原の抽出、精製 .....	10
10. 細菌細胞壁の溶解 .....	10
11. 薬剤の吸収促進および透過性亢進 .....	10
12. 特異免疫反応の増強 .....	10
13. その他 .....	10
文 献 .....	11

IV. アクチナーゼの用途（食品加工用・工業用）	15
1. 混合アミノ酸の製造	15
2. フィッシュ・ソリューブル、魚醤油の製造	15
3. 食肉の液化および軟化	15
4. パン製造	16
5. クラッカー、ビスケット製造	16
6. 味噌、醤油製造	16
7. 皮革の良質化	16
8. コラーゲン、ゼラチンの良質化	16
文 献	17

---

## I. アクチナーゼ製品

---

アクチナーゼは、放線菌 *Streptomyces griseus* の培養ろ液から得られる蛋白分解酵素プロテナーゼの製品で、用途に応じて各力価の製品があります。

アクチナーゼの蛋白分解作用は、極めて強力かつ広範で、基質蛋白の有するペプチド結合をほとんど無差別に分解し、その分解度は75～90%に達します。また、酸分解と比較して、生成したトリプトファンやメチオニン等が分解されないこと、反応条件が温和なこと、反応操作が容易なこと等の特徴があります。

アクチナーゼの応用分野としては、学術基礎研究をはじめとして食品加工、各種工業など多方面で広く使用されています。

---

## II. アクチナーゼの性質

---

### 1. 性 状

アクチナーゼは、白色～淡褐色のわずかに特異な臭いのある粉末で、水に溶けやすく、アセトン、メタノールにほとんど溶けません。

### 2. 安定性

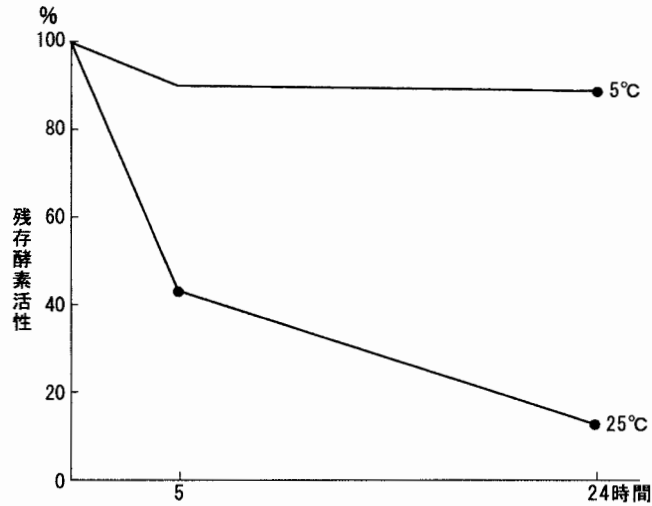
#### (1) Caイオンの保護効果<sup>1)</sup>

Caイオンはアクチナーゼの活性保持に重要な役割を果たしています。製品中には安定化に必要なCaイオンが含まれていますが、EDTA処理、透析、硫酸塩析、イオン交換樹脂処理等によりCaイオンが欠如した場合には速やかに失活します。

(2) 水溶液中での安定性<sup>2)</sup>

アクチナーゼを蒸留水に溶解後、5℃もしくは25℃で保存した場合の残存酵素活性をみると図1に示すように、5℃であれば24時間後でもかなりの活性が保持されますが、25℃では速やかな活性低下がみられます。

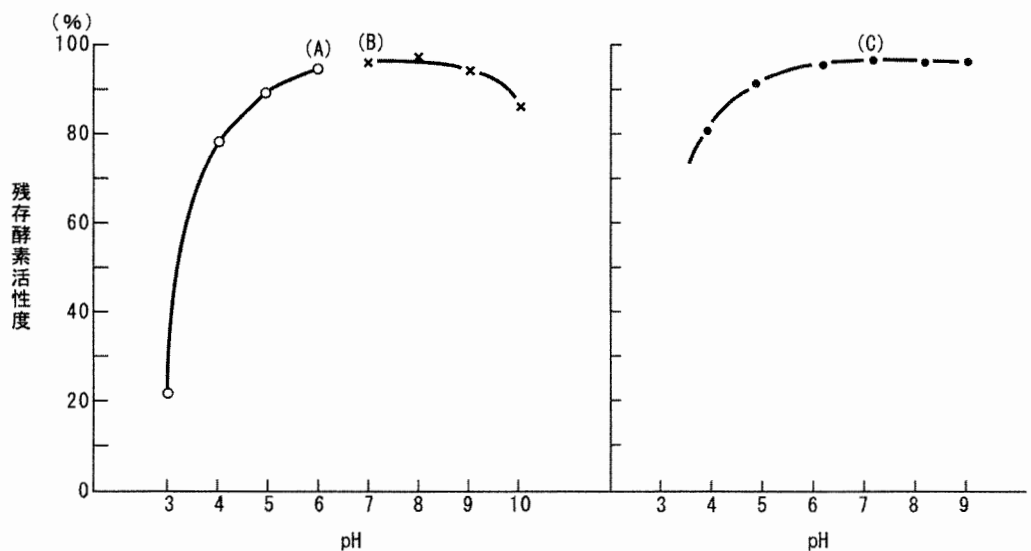
図1 水溶液中での残存酵素活性



(3) pHに対する安定性<sup>3)</sup>

アクチナーゼを種々のpHの溶液に溶解し、室温に5時間放置した後、溶液中の残存酵素活性を測定すると、アクチナーゼはpH6～9では安定ですが、pH4以下およびpH10以上では不安定になります(図2)。

図2 pHに対する安定性



(A) McIlvaine 緩衝液 (1/2希釈) 中5時間放置

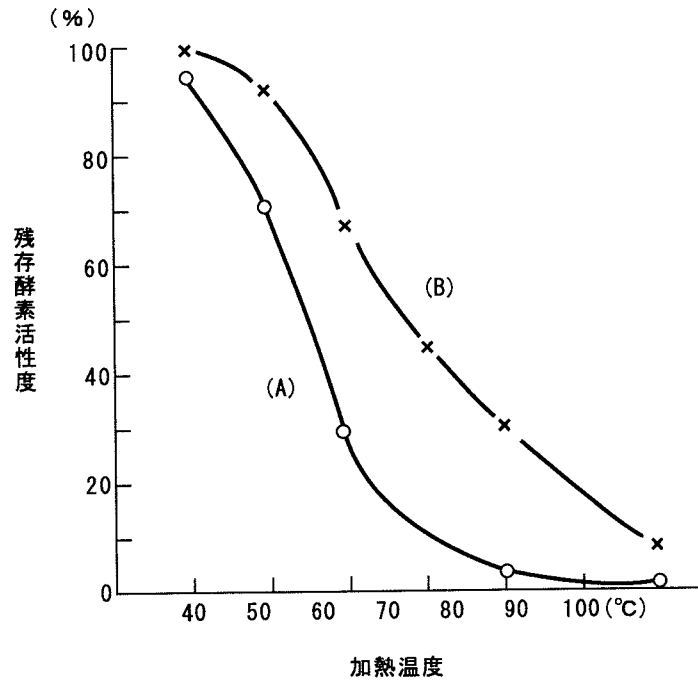
(C) 0.02モル酢酸カルシウム溶液中5時間放置

(B) ホウ酸緩衝液 (1/2希釈) 中5時間放置

(4) 温度に対する安定性<sup>3)</sup>

アクチナーゼを蒸留水に溶解し、40～100℃の各温度に10分間放置した後、残存酵素力価を測定すると、アクチナーゼは温度の上昇により残存酵素活性が低下しますが、基質が存在する場合には、熱に対する安定性が増加します (図3)。

図3 温度に対する安定性

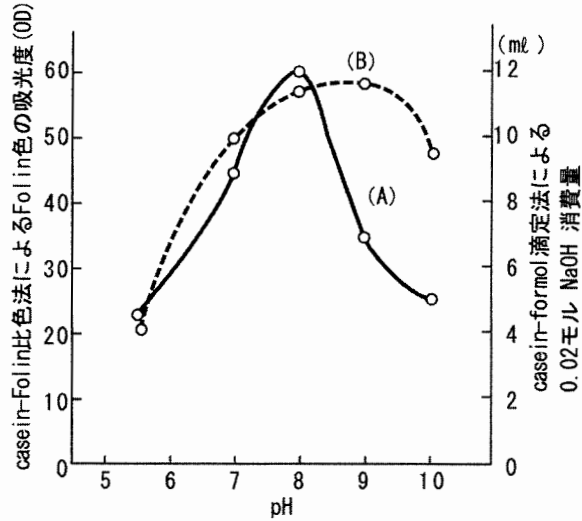


- (A) 基質の存在しない場合
- (B) 基質の共存する場合 (1%ガゼイン存在)

### 3. 至適pH<sup>3)</sup>

アクチナーゼの酵素作用と至適pHの関係は酵素活性の測定法によってやや異なりますが、概ねpH7～9の範囲で高い酵素活性を示します（図4）。

図4 酵素活性とpH

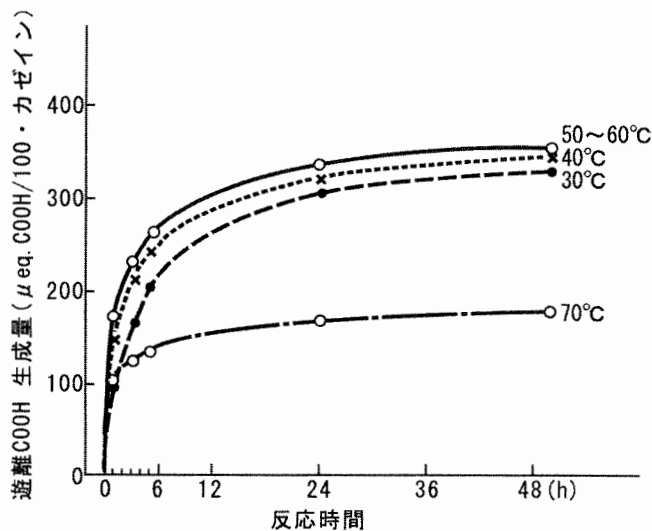


- (A) casein-Folin 比色法による pH-活性度曲線  
 (B) casein-formol 滴定法によるpH-活性度曲線

### 4. 至適温度<sup>4)</sup>

カゼインを基質とした場合のアクチナーゼの酵素活性と反応温度との関係は図5に示すように、40～60℃の範囲で高い酵素活性を示します。

図5 酵素活性と反応温度

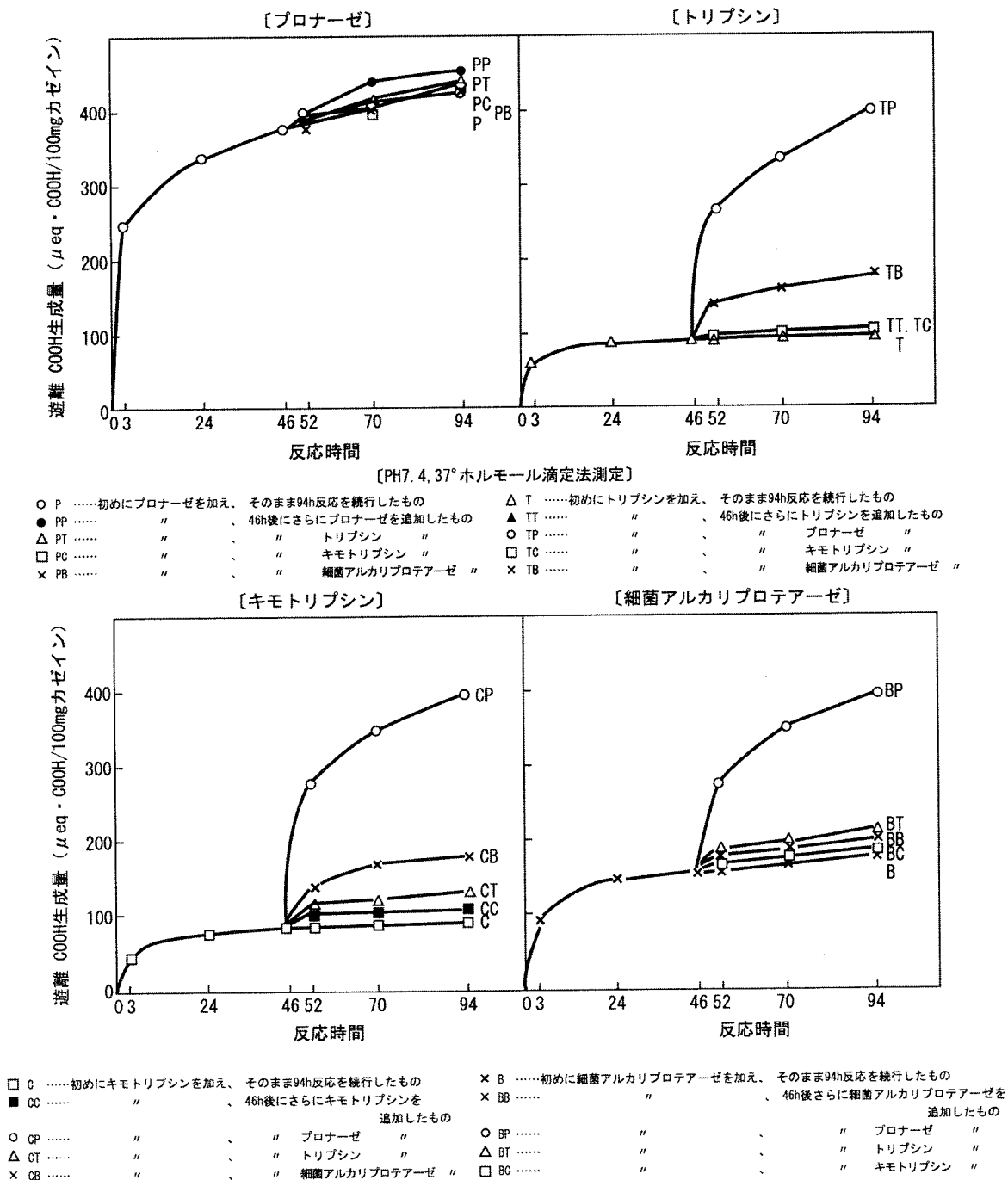


基質：5%カゼイン溶液 (pH7.4)。  
 酵素添加量：170,000 PU/100g カゼイン。  
 測定：casein-formol 滴定法。

## 5. 基質特異性<sup>5)</sup>

トリプシン、キモトリプシン等の蛋白分解酵素は、それぞれ特有の基質特異性を有し、特定のペプチド結合のみ加水分解しますが、アクチナーゼは各種基質に対し極めて広範な加水分解力を有しているため、蛋白質の各種ペプチド結合に作用し、蛋白分解産物は各種のペプチド類にとどまらず、多量の各種アミノ酸が遊離してきます。アクチナーゼとトリプシン、キモトリプシンおよび細菌アルカリプロテアーゼとの交叉試験の結果は図6に示すとおりです。

図6 各種蛋白分解酵素との交叉試験





## 6. 蛋白加水分解度<sup>4)</sup>

アクチナーゼは広範な基質特異性を有しているため、各種蛋白質を効率よく加水分解します。カゼインに対する各種蛋白分解酵素の加水分解度を比較すると、アクチナーゼは強力な蛋白分解力を有することがわかります (表 2)。

表 2 カゼインに対する各種蛋白分解酵素の加水分解度の比較\*

蛋白分解酵素の種類	酵素添加量 (mg酵素/gカゼイン)	遊離COOH生成量** ( $\mu$ eq. COOH/100mgカゼイン)	相対的加水 分解度比
アクチナーゼ	7	360.0	100
トリプシン (結晶)	7	112.0	31
キモトリプシン (結晶)	7	76.0	21
ペプシン (粗製)	14	151.2	42
パパイン (粗製)	70	136.0	38
"	140	144.0	40
タカジアスターゼ	70	138.0	38
枯草菌プロテアーゼ (結晶)	7	196.0	54

\* 反応条件：5%カゼイン溶液基質、pH7.4、40℃、72時間分解。

\*\* 測定：casein-formol滴定法。

## 7. 酵素活性阻害因子

アクチナーゼは次のような因子によって酵素活性の阻害を受けます。

熱、酸、アルカリ、血清、じゃがいも及び豆類の抽出液、濃厚な塩

塩化ナトリウムの影響については、9%食塩水で14%、18%食塩水で36%程度の活性阻害がみられますが、生理食塩水 (0.9%) の使用はほとんど問題ありません。

## 8. 酵素力価の測定法 (Anson-荻原氏変法)

### (1) 原理

1. ミルクカゼイン溶液にアクチナーゼを作用させると、加水分解されてアミノ酸を生成する。
2. 一定時間作用後、トリクロル酢酸を加えて、未分解の蛋白質を沈殿させる。
3. ろ液にフォリン試薬を加えると、チロジンなどが発色する。
4. 発色液の660nmにおける吸光度はアクチナーゼの力価に比例するので、チロジン 1  $\mu$ gのフォリン試薬による発色の吸光度と対比して力価を算出する。

### (2) 定義

カゼイン基質にpH7.4、40℃で酵素を作用させた時、1分間にチロジン 1  $\mu$ gに相当する分解生成物を生ずる酵素量を1チロジン単位 (PU) とする。

### (3) 測定操作

酵素試料をpH7.4の1/15Mリン酸緩衝液に $6 \pm 3$  PU/ml (推定) となるように溶かし、この酵素液1 mlを40°Cで5分間予温後、pH7.4の2%ミルクカゼイン溶液1 mlを加えてよく振り混ぜ、正確に40°Cにて10分間反応させた後、0.1Mトリクロル酢酸溶液(0.2M酢酸ナトリウムと0.2M氷酢酸を含む) 2 mlを加えてよく振り混ぜ、40°Cにて20分間放置後ろ過する。(試料反応ろ液)

盲検として、酵素液1 mlに0.1Mトリクロル酢酸溶液2 mlを加えてから、2%ミルクカゼイン溶液1 mlを加えてよく振り混ぜ、40°Cで20分間放置後ろ過する。(盲検ろ液)

試料反応ろ液、盲検ろ液およびチロジン標準溶液を別の試験管に各1 mlをとり、それぞれに0.4M炭酸ナトリウム溶液5 mlを加えて振り混ぜ、更にフォリン試薬1 mlを加えてよく振り混ぜ、40°Cで20分間放置して発色させる。冷却後、発色液の660nmにおける吸光度を分光光度計で測定する。

(対照：蒸留水)

### (4) 力価表示法

$$\text{酵素液力価 (PU/ml)} = \frac{(\text{試料反応ろ液吸光度}) - (\text{盲検ろ液吸光度})}{(\text{チロジン標準液の吸光度}) \times 1/25} \times \frac{4}{10}$$

### (5) 試薬調製法

#### ・1/15Mリン酸緩衝液 (pH7.4)

リン酸-カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1.80g、リン酸二ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 7.57gおよび酢酸カルシウム ( $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 0.035gを蒸留水に溶かし1 lとし、pHを7.4に補正する。

#### ・2%ミルクカゼイン溶液

ミルクカゼイン (Hammersten) 2 gをpH7.4の1/15Mリン酸緩衝液70mlに大体溶かし、更に湯浴上で完全に溶かす。室温で放冷し0.1N水酸化ナトリウム溶液または0.1Nリン酸溶液を用いてpHを7.4に補正した後、pH7.4のリン酸緩衝液を加えて全量を100mlとする。

#### ・0.1Mトリクロル酢酸溶液

トリクロル酢酸 ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) 16.3g、酢酸ナトリウム ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 27.2g、氷酢酸 ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 12.0gを蒸留水に溶かし1 lとする。

#### ・0.4M炭酸ナトリウム溶液

炭酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 42.4gを蒸留水に溶かし1 lとする。

#### ・フォリン試薬

タングステン酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 100g、モリブデン酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 25gにリン酸 ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 50ml、塩酸 (HCl) 100ml、蒸留水700mlを加えて溶かし、還流冷却器をつけておだやかに10時間煮沸する。冷却器をはずし直ちに硫酸リチウム ( $\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 150gおよび蒸留水50mlを加え、溶液が黄色の透明液になるまで臭素を加える。脱色後15分間煮沸して臭素を除き、18時間放冷後ガラスフィルターで吸引ろ過し、ろ液に蒸留水を加えて5 lとする。

#### ・チロジン標準溶液 (25 $\mu$ g/ml)

L-チロジン125mgを0.2N塩酸溶液で100mlに溶かし、更にその2 mlを0.2N塩酸溶液で100mlに希釈する。

## 9. アクチナーゼの貯法

アクチナーゼは乾燥した冷所に保存して下さい。特に開封後は吸湿しないよう注意して下さい。

## 10. アクチナーゼの脱Ca法

アクチナーゼには安定剤として酢酸カルシウムが添加されていますので、これを除去する必要がある場合には、Sephadex G-25で脱塩透析して下さい。また、アクチナーゼをリン酸緩衝液に溶解するとリン酸カルシウムの白色沈殿を生じますので、ろ過して除去することができます。ただし、アクチナーゼが不安定になりますのでなるべく低温下で迅速に処理して下さい。

## 11. アクチナーゼの無菌化法

アクチナーゼはアルコールに対してかなり安定ですので、70%アルコール水で10分間処理すると無菌酵素が得られます。

---

## Ⅲ. アクチナーゼの用途（試薬）

---

### 1. 蛋白質の構造研究<sup>6~19)</sup>

ヘモグロビン、タカアミラーゼ、仔牛胸腺ヒストン、リボヌクレアーゼ、馬および仔牛心筋チトクロームC、オボアルブミン、オボムコイド等の構造研究において、その構成アミノ酸の分離のために使用されています。また、核内封入体、チュブリン重合体、ヒト免疫グロブリン等の構造解析や、ヒトアルブミン上のペニシリン結合部位の同定にも使用されています。

### 2. 赤血球の構造、機能研究<sup>20~27)</sup>

ヒト赤血球にアクチナーゼを作用させて起こる変化から、赤血球膜の蛋白構造と透過性に関する部位の位置関係を解析したり、ヒト赤血球のNAD（NADP）ヌクレオシターゼの不活化、ヒト赤血球のゴーストの誘導、赤血球凝集活性、人血の証明等に使用されています。

### 3. 各種糖蛋白からの糖ペプチド分画の精製、分離<sup>28~31)</sup>

婦人の成熟乳から得た人乳カゼインの糖蛋白成分（P-1分画）をアクチナーゼで分解することにより、ビフィズス菌増殖能を持つ3つの糖ペプチド分画が得られます。この分解能は、パパイン、ブロメラインよりも優れています。また、レクチン、魚類表皮粘質物、ハプトグロビン等から得られた糖ペプチドの構造解析等にも利用されています。

### 4. 生体組織中の非蛋白質の抽出<sup>32~41)</sup>

生体組織中に存在しているムチン、ムコ蛋白、ムコ多糖類などのように酵素分解が困難と考えられていた物質にもアクチナーゼはかなり作用しますので、生体成分抽出時の前処理にアクチナーゼを使用することができます。

### 5. 細胞培養<sup>42~50)</sup>

組織培養のための細胞分散の目的に0.001~1.0%のアクチナーゼを使用するとトリプシンと同等もしくはより良好な結果が得られます。また、胃や脾臓のように粘液物質がある場合にはコラゲナーゼやパンクレアチンを併用すると効果的です。さらに、細胞融合を行う際、電場にさらす前に細胞をアクチナーゼ処理すると融合収率が高まります。この他、減数分裂を中断させたマガキ卵母細胞をアクチナーゼと共に培養すると減数分裂の続行がみられます。マウスの非腫瘍性3T3線維芽細胞では、細胞分裂、成長の続行がみられます。

### 6. 抗原の分離、解析<sup>51~57)</sup>

CEA分子中の3種類の抗原性部分は、ペプシン処理では破壊されてしまいますが、アクチナーゼ処理では、NFA、NCAを破壊することなく分離することが可能です。

イネ白葉枯病菌多糖体の抗原分離、細胞膜上の受容体やイオンチャンネル等の機能、活性、分布を調べるために、細胞のアクチナーゼ処理が行われています。

### 7. 高蛋白食品中のビタミンB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、油性天然色素の定量<sup>58~60)</sup>

大豆、納豆、豚肝臓、豚肉、牛乳や粉乳等の高蛋白食品中のビタミンB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>の定量の際、アク

チナーゼとタカジアスターゼとの前処理により、10～30%の検出量増加が期待できます。また、油性天然色素（ $\beta$ カロテン等）の定量もアクチナーゼの前処理により可能になります。

#### 8. ウイルスからの核酸の分離<sup>61～64</sup>

ウイルスから核酸を分離する際に、アクチナーゼと2-メルカプトエタノールおよび硫酸化ポリビニルあるいはドデシル硫酸ナトリウムで処理すると、核酸を変性させずに定量的に抽出できます。

#### 9. 百日咳菌の感染防御抗原の抽出精製<sup>65</sup>

百日咳菌に含まれる感染防御抗原を含む成分を抽出する際に、アクチナーゼ処理を行うことにより、有効成分を減弱することなしにヒスタミン感受性増強物質が除去され、感染防御抗原の抽出精製率が向上します。

#### 10. 細菌細胞壁の溶解<sup>66</sup>

A群連鎖球菌細胞壁をアクチナーゼで溶解することにより、温和な条件下でも細胞壁から群特異性多糖が分離できます。

#### 11. 薬剤の吸収促進および透過性亢進<sup>67～69</sup>

ラット小腸ループにビタミンB<sub>12</sub>-<sup>57</sup>Coと共にアクチナーゼを注入するとビタミンB<sub>12</sub>の吸収が促進されます。

また、ヒメダカ胚心臓による強心配糖体の微量定量の際、アクチナーゼ前処理により、卵膜および胚表膜の透過性亢進がみられます。

#### 12. 特異免疫反応の増強<sup>70、71</sup>

抗免疫グロブリン無反応性の未熟B細胞をアクチナーゼで処理した後、抗体と培養すると増殖促進がみられます。また、細胞診の酵素抗体法を応用するにあたり、アクチナーゼ処理により特異免疫反応の増強がみられます。

#### 13. その他<sup>72、73</sup>

アクチナーゼで消化し、粘度の低下あるいは除去することによって、喀痰中の細胞分離、卵白中の残留抗生物質の定量、リンパ球計数等が容易になります。

## 文 献

- 1) 野本正雄ほか：放線菌プロテアーゼの研究（第五報），理化学研究所報告，35：90，1959.
- 2) 杉山幸雄ほか：科研製薬㈱社内資料.
- 3) 野本正雄ほか：放線菌プロテアーゼの研究（第四報），理化学研究所報告，35：84，1959.
- 4) 野本正雄ほか：放線菌プロテアーゼの研究（第六報），理化学研究所報告，35：154，1959.
- 5) 荘司知志ほか：科研製薬㈱社内資料.
- 6) Sasakawa, S., et al : Studies on hemoglobin; II. Arginine containing peptides from the hydrolysate by *Streptomyces griseus* protease, *J. Biochem.*, 45 : 867, 1958.
- 7) Ikenaka, T.: Chemical modification of Taka-amylase A; II. Phenylazobenzoylation of Taka-amylase A, *J. Biochem.*, 46 : 297, 1959.
- 8) Tsugita, A., et al : The structure of glycopeptides obtained from Taka-amylase A. *J. Biochem.*, 46 : 695, 1959.
- 9) Satake, K., et al : Arginine peptides obtained from thymus histone fractions after partial hydrolysis with *Streptomyces griseus* proteinase, *J. Biol. Chem.*, 235 : 2801, 1960.
- 10) Takahashi, K.: The structure and function of ribonuclease T<sub>1</sub>; III. Amino- and carboxyl-terminal sequences of ribonuclease T<sub>1</sub>. *J. Biochem.*, 52 : 72, 1962.
- 11) Titani, K., et al : N-terminal sequence in beef- and horse-heart cytochrome C, *J. Biochem.*, 51 : 350, 1962.
- 12) Satake, K., et al : Several types of limited proteolysis of native ovalbumin catalyzed by a protease from *Streptomyces griseus*, *J. Biochem.*, 55 : 466, 1964.
- 13) Nomoto, H., et al : Preparation and characterization of fragment glycoasparagines from ovalbumin glycopeptides, *Carbohydr. Res.*, 107 : 91, 1982.
- 14) Kanamori, M., et al : *Agr. Biol. Chem.*, 33 : 220, 1969.
- 15) Conchie, J., et al : The carbohydrate units of asialo-ovomucoid : Their heterogeneity and enzymic degradation. *Carbohydr. Res.*, 112 : 261, 1983.
- 16) 重村克己ほか：核内封入体の組織化学的性状について，岐阜県立下呂温泉病院・温泉医学研究所年報 No. 14 : 35, 1987.
- 17) Serrano, L., et al : Effect of specific proteolytic cleavages on tubulin polymer formation, *Biochem. J.*, 252 : 683, 1988.
- 18) Jehanli, A., et al : Pronase and proteinase K digestion of human immunoglobulin M, *Mol. Immunol.*, 22 : 557, 1985.
- 19) Lafaye, P., et al : Location of penicilloyl groups on CNBr fragments of the albumin from penicillin-treated patients, *FEBS Lett.*, 220 : 206, 1987.
- 20) 竹下正純：プロナーゼ処理による人赤血球膜の構造と機能の変化について，日本血液学会雑誌，35 : 285, 1972.
- 21) Kirikae, T., et al : Identification of Re lipopolysaccharide-binding protein on murine erythrocyte membrane, *Microbiol. Immunol.*, 32 : 33, 1988.
- 22) 木村邦彦ほか：ヒト赤血球の各種レクチンレセプターに対するプロナーゼの作用，医学と生物学，108 : 35, 1984.
- 23) Viitala, J., et al : Blood group A and H determinants in polyglycosylated peptides of A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> erythrocytes, *Eur. J. Biochem.*, 126 : 401, 1982.
- 24) Laster, Y., et al : Viral and non-viral induced fusion of pronase-digested human erythrocyte ghosts, *Biochim. Biophys. Acta (NLD)*, 551 : 282, 1979.
- 25) Sugii, S., et al : Hemagglutinating activity of the heatlabile enterotoxin isolated from porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 49 : 183, 1988.
- 26) Marx, A., et al : Pronase treated erythrocytes in passive hemagglutination, *Rev. Roum. Biochim.* 17 : 193, 1980.
- 27) 壺岐裕志ほか：抗ヒト $\alpha$ 1-AT血清ならびに抗ヒト赤血球膜血清を用いた腐敗血痕からの人血証明 人・獣鑑別に関する法医免疫学的研究，日本法医学雑誌，42 : 311, 1988.
- 28) 柏井洋臣：人乳カゼイン糖蛋白分画のプロナーゼ水解で得られる糖ペプチドとそのビフィズス菌増殖能について，日本小児科学会，83:403, 1979.
- 29) Kimura, Y., et al : Isolation of glycopeptides from *Ricinus communis* lectins., *Agric. Biol. Chem.* 52 : 1771, 1988.
- 30) Nakagawa, H., et al : 各種魚類粘液糖タンパク質の糖鎖の多様性，日本水産学会誌，54:1653, 1988.
- 31) Delers, F., et al : Glycosylation of chicken haptoglobin., *Biochem. Cell Biol.*, 66 : 208, 1988.
- 32) Hashimoto, T., et al : Action of proteolytic enzymes on purified bovine submaxillary mucin, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 106 : 233, 1963.

- 33) Cook, G. M. W., et al : Separation of the M and N blood group antigens of the human erythrocyte., *Biochim. Biophys. Acta.*, 101 : 57, 1965.
- 34) Ohkuma, S., et al : Action of Pronase on M and N Antigens on Human Erythrocytes, *Proc. Japan Acad.*, 42 : 661, 1966.
- 35) Ohkuma, S., : MN Blood-group active sialoglycopeptides released from human erythrocytes by pronase treatment, *Biochim. Biophys. Acta.*, 147 : 169, 1967.
- 36) Yamauchi, T., et al : The amino acid sequences, the peptide-carbohydrate linkages, and the composition and size of the polysaccharide unit of the glycopeptides from  $\alpha$ 1-acid glycoprotein of human plasma, *J. Biochem.*, 64 : 683, 1968.
- 37) Mintz, B. : Experimental study of the developing mammalian egg ; removal of the zona pellucida, *Science*, 138 : 594, 1962.
- 38) Gwatkin, R. B. L., et al : Synthesis of a Ribonucleic acid virus by the mammalian ovum., *Nature*, 209 : 993, 1966.
- 39) 橋本かず : ムコ多糖体性血液型物質の生化学的研究 (XIX), *生化学*, 39 : 79, 1967.
- 40) 今井清勝 : 培養軟骨細胞におよぼすパパインおよび他の酵素の影響, *横浜医学*, 19 : 99, 1968.
- 41) Jibril, A. O. : Proteolytic degradation of ossifying cartilage matrix and the removal of acid mucopolysaccharides prior to bone formation, *Biochim. Biophys. Acta.*, 136 : 162, 1967.
- 42) 新津泰孝ほか : 組織培養に用いた *Streptomyces griseus* プロテアーゼ, *医学と生物学*, 66 : 174, 1963.
- 43) 新津泰孝ほか : 組織培養における *Streptomyces griseus* プロテアーゼの使用, *抗酸菌病研誌*, 16 : 323, 1963.
- 44) 山根 績ほか : 組織培養のための種々臓器内細胞遊離法の検討, *医学と生物学*, 68 : 104, 1964.
- 45) Gwatkin, R. B. L., et al : A new method for dispersing the cells of mammalian tissues, *Nature*, 201 : 1242, 1964.
- 46) Niitu Y., et al : Use of a protease of *Streptomyces griseus* in tissue culture, *Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ.-C*, 12 : 90, 1965.
- 47) 田中啓二ほか : 細胞単離 肝細胞単離法, *生体の科学*, 37 : 382, 1986.
- 48) Zimmermann, U., et al : Electric-field-stimulated fusion : Increased field stability of cells induced by pronase, *Naturwissenschaften*, 68 : 577, 1981.
- 49) Osanai, K., et al : Pronase P induces the resumption of meiosis in oyster oocytes, *Bull. Mar. Biol. Stn. A-samushi Tohoku Univ.*, 18 : 37, 1988.
- 50) Burger, M., : Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth., *Nature*, 227 : 170, 1970.
- 51) Matsuoka, Y., et al : Proteolytic release of antigenic fragments corresponding to normal fecal antigen and non-specific crossreacting antigen from carcinoembryonic antigen, *Int. J. Cancer*, 21 : 604, 1978.
- 52) Choi, J. E., et al : イネ白葉枯病菌多糖質の抗原分析, *日本植物病理学会報*, 47 : 199, 1981.
- 53) Molner, J., et al : Evidence for the recycling nature of the fibronectin receptor of macrophages, *J. Cell Physiol.*, 131 : 374, 1987.
- 54) Gordon, IR., et al : Mouse interferon receptors : A difference in their response to  $\alpha$  and  $\beta$  interferons, *J. Gen. Virol.*, 64 : 2777, 1983.
- 55) Cosio, F. G., et al : The human FcR III. Effects of pronase on soluble immune complex binding by polymorphonuclear leucocytes, monocytes and pulmonary macrophages, *Immunology*, 46 : 395, 1982.
- 56) West, N. B., et al : A specific estrogen receptor in the mouse spleen, Characterization and evidence of physiological regulation, *J. Steroid Biochem.*, 16 : 557, 1982.
- 57) Starkus, J. G., et al : Kinetic analysis of sodium channel block by internal methylene blue in pronased crayfish giant axons, *Biophys. J.*, 46 : 205, 1984.
- 58) 佐野久子ほか : 食品中ビタミン含有量の検討 ; II. 数種動物 植物食品中のビタミンB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>量, *家政学雑誌*, 18 : 357, 1967.
- 59) 伊藤長生ほか : 調整粉乳のビタミンB<sub>1</sub>定量について I. 蛋白消化酵素で前処理する定量法, *ビタミン*, 36 : 142, 1967.
- 60) 天川映子ほか : 高速液体クロマトグラフィーによる食品中の油溶性天然色素の定量, *分析化学*, 33 : 586, 1984.
- 61) Pfau, C. J., et al : Release of deoxyribonucleic acid from vaccinia virus by 2-mercaptoethanol and pronase, *Nature*, 194 : 894, 1962.
- 62) Rathlev, T., et al : The nucleic acid from Reiter's Treponemes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 106 : 343, 1964.
- 63) Shepherd, R. J., et al : DNA in Cauliflower mosaic virus, *Virology*, 36 : 150, 1968.

- 64) Shepherd, R. J., et al : Double-stranded DNA from Cauliflower mosaic virus., *Virology*, 41 : 339, 1970.
- 65) 春日忠義ほか: 百日咳菌の感染防御抗原の抽出精製法, 公開特許公報, 昭43-10866.
- 66) *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 14 : 38, 1978.
- 67) Okuda, K.: Enhanced Vitamin B<sub>12</sub> absorption from rat intestine by proteases, in the absence of intrinsic factor, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124 : 79, 1967.
- 68) 山鹿健次: プロナーゼのビタミンB<sub>12</sub>吸収におよぼす影響に関する研究, *ビタミン*, 39 : 77, 1969.
- 69) Ito, R., et al : Micro-determination of cardiac glycosides by means of the embryonic heart of Japanese Killfish, *Oryzias latipes* VIII) Pre-treatment with a new type protease, pronase., *東邦医学会雑誌*, 7 : 1201, 1961.
- 70) 椎名義雄ほか: 細胞診への酵素抗体法の応用 酵素抗体間接法における pronase 消化効果, *日本臨床細胞学会雑誌*, 22 : 218, 1983.
- 71) Gollapudi, S. V. S., et al : Nonresponsiveness of immature B lymphocytes to antiimmunoglobulin is reversed by pronase, *Biophys. Res. Commun.*, 119 : 1, 1984.
- 72) 赤沼克也: Pronase消化法による喀痰中腫瘍細胞診, *抗酸菌病研誌*, 19 : 460, 1967.
- 73) Stewart, C., et al : A method for counting phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes., *Blood*, 29 : 628, 1967.





## IV. アクチナーゼの用途（食品加工用・工業用）

アクチナーゼは、放線菌 *Streptomyces griseus* の培養ろ液から得られる蛋白分解酵素で、食品加工用と工業用の製品があります。

製品名	力価（チロジン単位/g）	用途	包装単位
アクチナーゼAS	250,000	食品加工用	100g、500g
アクチナーゼAF	250,000	工業用	100g、500g

アクチナーゼは、各種基質蛋白に対して強力な加水分解力を示し、蛋白のペプチド結合を高率に加水分解します。また、酸分解と比較して反応条件が温和なため、アクチナーゼの応用分野は広く、いろいろな方面で使用されています。

### 1. 混合アミノ酸の製造<sup>1, 2)</sup>

アクチナーゼは蛋白質を遊離アミノ酸にまで分解しますので、混合アミノ酸の製造に有効です。しかも、酸分解では分解されやすいトリプトファンやメチオニン等が完全に保持されますので、栄養的に優れた製品が得られます。大豆カゼインや乳カゼイン、魚肉等の原料蛋白質に対しては、1%のアクチナーゼを添加してpH 6～8、35～50℃で24～48時間分解します。防腐のためには3%エタノールを添加します。

魚肉液化蛋白質等のように、アミノ酸にまで分解する必要のない場合には、50～60℃、4～6時間の分解で液化することができます。

### 2. フィッシュ・ソリューブル、魚醤油の製造<sup>3, 4)</sup>

内臓を含む全魚体にアクチナーゼを添加して分解すると、アミノ態窒素含量の多いフィッシュ・ソリューブルが短時間で得られます。

また、「しょつつる」のような魚醤油の速醸にも使用できます。この場合には、初期の酵素分解期間中は食塩を10%とし、熟成期に食塩を増量して腐敗を防止します。

### 3. 食肉の液化および軟化<sup>5, 6)</sup>

アクチナーゼは食肉のpH（約pH 6）でもよく作用しますので、肉エキスの製造に使用できます。分解産物のうち、ある種のペプチドが苦味を発現する場合がありますので、分解率を抑えて液化のみにとどめるか、またはパンクレアチン等と併用してアミノ態窒素含量を高めるか、いずれかの方法をとります。

軟化を目的とする場合には、先ず低温でアクチナーゼ液を肉組織中に浸透させ、その後に加温します。この際、針などで小さな穴を多数あけるなどして酵素の浸透を助長することは有効です。

#### 4. パン製造<sup>7)</sup>

アクチナーゼを原料小麦粉に対して10～15ppm添加し、アーカデイタイプのイーストフードと併用すると、ミキシング時間と発酵時間を短縮し、製品の仕上がりをソフトにして、表面の焼き上がりも良好になります。

アクチナーゼは耐熱性が強いいため窯伸びが良好ですから、窯入れをやや早めにする必要があります。通常の窯入れでは窯落ちする場合があります、また、アクチナーゼの使用量が多すぎるとドウがだれる原因となります。

#### 5. クラッカー、ビスケット製造<sup>8, 9)</sup>

アクチナーゼを原料小麦粉に対して15～30ppm添加することにより、ミキシング時間と発酵時間を短縮し、製品の歯ざわりを良好にします。なお、添加量が多すぎたり、発酵時間が長いとドウがだれるおそれがあります。

#### 6. 味噌、醤油製造<sup>10, 11)</sup>

蒸煮大豆を放冷する工程でアクチナーゼを添加し、効率良く蛋白分解を行ったのちに麴、食塩と混合して熟成工程に移します。2～3時間温醸することにより熟成が促進して、濃厚な旨味を有し、品質の優れた製品が短時間で得られます。

#### 7. 皮革の良質化<sup>12, 13)</sup>

アクチナーゼで皮革を処理するとエラスチンは急速に消化されますが、コラーゲンの消化は比較的穏やかですから、皮革の脱灰工程で添加すると良質の皮革が得られます。

#### 8. コラーゲン、ゼラチンの良質化<sup>14, 15)</sup>

弱アルカリ性下で皮革にアクチナーゼを作用させると可溶化コラーゲンが得られます。しかもテロペプチドと呼ばれる抗原性の主要因子は切断されているために、医療材料として優れたコラーゲンが得られます。

また、アクチナーゼで可溶化したコラーゲンを加熱すると分子量のそろった良質のゼラチンが得られます。

## 文 献

- 1) 後藤富雄ほか: 混合アミノ酸の製造方法, 公開特許公報. 昭57-16695.
- 野本正雄ほか: 放線菌蛋白分解酵素によるアミノ酸の製造法. 特許公報, 昭33-9964.
- 2) 三宅義章: 魚類加工残滓の酵素処理による可溶化. 日本食品工業学会誌, 29: 117, 1982.
- 3) 村山繁雄ほか: 魚醤油の製造に関する研究-I; 魚醤油製造時における酵素剤添加の影響. 東海水研報, 32: 155, 1962.
- 4) 浅野元一ほか: 秋田県特産食品の研究II; しょっつる連醸条件の検討. 秋田大教研紀, 19: 85, 1969.
- 5) 大高文男ほか: 二, 三の蛋白分解酵素剤による牛肉の人工消化. 日本食品工業会誌, 12: 101, 1965.
- 6) 中川禎人: 酵素処理による蓄肉の軟化について. 広島食品工試研究報告, 11: 54, 1970.
- 7) 佐藤友太郎ほか: 農産加工技術研究会第7回大会(昭和35. 4)講演.
- 8) 木咲 弘ほか: 酵素剤によるドウの軟化とビスケットの性質. 同志社女子大年報, 14: 414, 1963.
- 9) 木咲 弘ほか: 性状および香気におよぼすプロテアーゼの添加の影響-ビスケットの香気成分-(その4). 同志社家政, 11: 32, 1977.
- 10) 野本正雄ほか: 放線菌プロテアーゼの利用に関する研究(第1報); 味噌醸造への利用について. 日本農芸化学会誌, 34: 430, 1960.
- 11) 好井久男ほか: プロテアーゼ製剤の食塩耐性について. 醸造協会誌, 62: 881, 1967.
- 12) 佐藤 泰: 脱灰剤として放線菌プロテアーゼの利用について. 日本皮革技術協会誌, 5: 48, 1959.
- 13) 豊田春和ほか: 皮コラーゲンに対する放線菌プロテアーゼの作用(第一報); 皮コラーゲンの消化に及ぼす処理条件の影響. 皮革化学, 15: 45, 1969.
- 14) 加藤侃明: 止血用コラーゲン粉末の製造法. 公開特許公報, 昭56-25113.
- 15) Fujii, T., An enzymatic method of producing gelatin., Bull. Sco. Sci. Photo. Japan, No.16: 30, 1966.



—アクチナーゼに関する問い合わせ先—

〒113-0021 東京都文京区本駒込2丁目28番8号

## 科研ファルマ株式会社

電 話 03-5977-5095 (代表)

FAX 03-5977-5136