

Alisma Canaliculatum에서分離한 Protein의 一種이 α -chymotrypsin의 失活에 對한 保護作用에 關한 研究

禹 斗 理 · 徐 正 墳

慶北大學校 農科大學 農化學科

(1970. 1. 31, 수리)

The protective effect on the denaturation of α -chymotrypsin
by the protein isolated from Alisma Canaliculatum.

By

Doo-Lee Woo, Jung-Hwn Seu

Department of Agricultral Chemistry, College of Agriculture, Kyung-Pook
National University

(Recieved Jan. 31, 1970)

Summary

In this studies, we isolated a kind of protein from Alisma Canaliculatum by the saline extraction. This protein was found to have a strong protective effects on the denaturation of α -chymotrypsin in the solution state. The obtained important results during the studies were as follows,

1. This protein was never hydrolyzed by the α -chymotrypsin.
2. The denaturation of α -chymotrypsin was strongly protected by this sample protein.
3. Isoelectric point of this sample was about 4.7.
4. This sample protein was determined as an antigen but very weak antigenicity was indicated on rabbit.

I. 緒 論

動物의 臍臟에서 分離된 chymotrypsinogen A는 그 活性化 過程에서 5種의 서로 다른 chymotrypsin으로 活性化 된다는 것은 잘 알려져 있는 事實⁽¹⁻³⁾이다. 이 中 特히 研究가 많이 行해진 것은 α -chymotrypsin으로서 이 酵素에 對해서는 이미 그 一次構造가 Hertley⁽⁴⁾ 및 Neurath⁽⁵⁾에 의해서 決定되었고 또 이 酵素에 對한 酵素學의 性質에 關한 研究는 一般 成書에 잘 紹介되어 있고 potato inhibitor, β -phenyl propionic acid, β -z-phenylalanine, D.F.P., diethy-p- NO_2 -phenylphosphate, 重金屬類等에 對한 阻害現象 亦是 잘 研究되어 있다. 이들 結果를 綜合해 보면 本 α -chymotrypsin은 最適作用 pH인 中性附近에서 매우 不安定하여 急激한 失活이 일어난다는 것을 알 수 있다. 本人은 Alisma Canaliculatum 中의 protein의 一種이 α -chymotrypsin의 失活을 強하게 保護한다는 事實을 發見하였으므로 그 結果를 여기에 報告하는 바이다. 끝

으로 本 實驗을 도와주신 室內 여러 學生들에게 感謝를 드립니다.

II. 實驗方法 및 材料

1) 試料의 調製

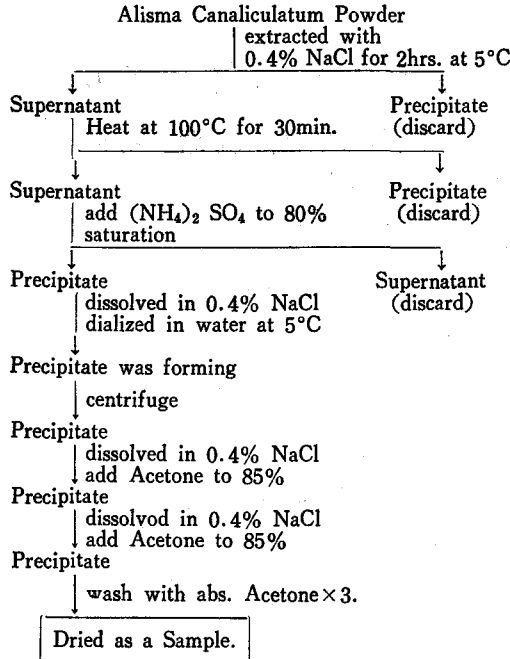
本 研究에서 使用한 試料는 Alisma Canaliculatum 中에 含有되어 있는 protein의 一種이다. 이 Alisma canaliculatum 中에는 두가지의 protein이 含有되어 있고 이 兩種의 protein은 그 溶解性에 큰 差異가 있으며, 한 種은 蒸溜水에는 아주 잘 溶解하나 NaCl 溶液에서는 거의 不溶性이며 다른 한 種은 이와 正反對의 溶解性을 가지고 있음을 알았으며 本 研究의 對象이된 것은 後者로써 蒸溜水에는 非溶性, NaCl 溶液엔 可溶性인 protein이며 그 調製 方法은 다음과 같다.

即 以上과 같은 方法으로 單一의 protein性 物質로 精製할 수 있었다.

2) 試供酵素 標品

日本 持田製藥 製品의 소(牛)의 臍臟에서 얻은

Fig. 1. Preparation of Sample.



結晶 α -chymotrypsin 이었다.

6) 酵素活性度 測定方法

α -chymotrypsin의 活性度 測定은 casein Folin 比色法을 使用하여 그 結果를 Tyrosine의 量으로 表示하였으며 使用한 Buffer는 pH 8.0의 phosphate Buffer 이었고 作用溫度는 35°C, 作用時間은 10分間이었다. 또 使用한 Casein은 E, Merck社製의 Hammarsten Milk casein이며 活性測定中 control 區로는 常法으로 取하는 對照外에 酵素와 Sample 과의 關係 또 Sample과 Sample 과의 關係等 設定이 可能한 모든 境遇를 考慮한 對照를 取하여 比較 檢討하였다. 即 試料溶液 1ml와 酵素液 1ml를 取하여 35°C의 水槽에서 30分間 preincubation 한 後 0.5% casein (in pH 8.0 phosphate Buffer) 5ml를 加하여 35°C에서 正確히 10分間 反應시킨 後 5ml의 沈澱試藥을 加하여 35°C에서 30分間 放置한 後 濾過하여 이 濾液 2ml를 取하여 Na₂CO₃液 5ml 및 Folin試藥 1ml를 加하여 30°C에서 30分間 發色시켜 660 m μ 에서 그 Optical Density를 測定하여 tyrosine 標準曲線과 比較하였다.

III. 結果 및 考察

1) Sample의 濃도가 α -Chymotrypsin의 作用에 미치는 影響

Alisma Canaliculatum에서 얻은 試料의 各濃도가

α -chymotrypsin의 作用에 미치는 影響을 調査하였으며 使用한 酵素의 濃도는 5 μ g/ml 이었고 使用한 試料의 濃도는 1~5 mg/ml 이었다. 作用方法은 Sample 溶液 1ml와 Enzyme 溶液 1ml를 混合하여 35°C에서 30分間 preincubation 한 後 여기에 基質로서 0.5% casein 溶液 5ml를 加하여 35°C에서 10分間 作用시킨 後 常法에 依하여 處理하였으며 그 結果는 다음 圖 2와 같다.

2) Sample과 α -chymotrypsin 과의 關係

本 試料는 一種의 protein 이므로 이 試料가 酵素에 依하여 分解되는가의 與否를 試料 0.5~10mg/ml의 濃도로 하여 35°C에서 10分間 作用시켜 調査하였다.

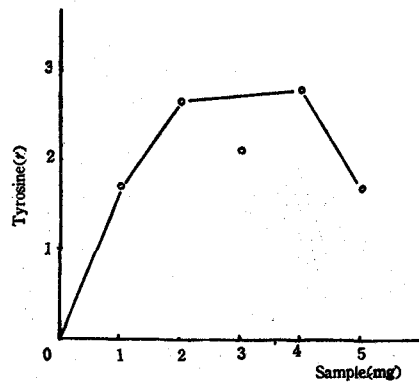


Fig. 2. The effect of sample concentration

Table 1. The Effect of Enzyme on the Sample.

Sample mg	Tyrosine r	
	Sample	Control
0.5	6.0	5.5
1	7.0	6.5
5	8.0	8.0
10	11.0	11.0

위 表 1에서 보는 바와 같이 本 試料는 α -chymotrypsin에 對하여 全然 作用을 받지 않음을 알수 있었다.

3) Sample과 基質과의 關係

本 Sample은 Alisma canaliculatum 으로부터 調製하였으며 그 調製方法에서 萬一 材料中의 Enzyme가 存在한다면 이 Enzyme protein도 調製된 Sample에 混在할 수 있는 可能性이 있으므로 Sample 中에 或時 Casein에 作用하는 proteolytic Enzyme가 混

在하여 있는가를 다음과 같이 確認하였다. 即 Sample 溶液 1 ml (2 mg/ml)와 0.5% Casein 5 ml 를 35°C 에서 作用시켜 그 結果를 經時的으로 調査하였으 며 그 結果는 다음 表 2와 같다.

Table 2. The Effect of Sample on the Casein

min.	Tyrosin γ	
	Sample	Control
10	6.5	6.5
20	6.5	6.2
30	6.8	6.5
40	6.5	6.5

위 表 2에서와 같이 本 Sample 은 그 自體가 casein 에 作用하여 分解하지 못함을 確認하였다.

4) α -chymotrypsin 의 熱安定性

本 實驗에서 作用하는 α -chymotrypsin 의 熱安定性을 다음과 같은 方法으로 調査하였다. 即 酵素 溶液 1 ml (5 μ g/ml) 씩을 取하여 35°C 의 水槽에 經時的으로 所定時間 熱處理를 시킨 後 여기에 0.5% casein 5 ml 를 加하여 同一 溫度에서 10 分間 作用시켰으며 酵素는 pH 8.0 의 phosphate Buffer 에 溶解시켰다.

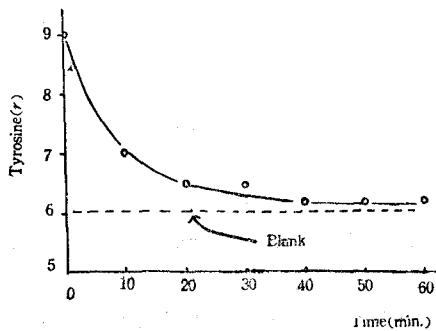


Fig. 3. Heat Stability of α -Chymotrypsin

위 圖 3와 같이 本 α -chymotrypsin 은 熱에 對해 서 대단히 容易하게 失活됨을 알 수 있었다.

5) Sample 이 α -Chymotrypsin 의 熱安定性 에 미치는 影響

熱失活이 강한 α -Chymotrypsin 의 失活에 미치는 sample 의 影響을 調査하였다. 即 Enzyme 溶液 1 ml 와 Sample 溶液 1 ml (2 mg/ml) 를 混合하여 35°C 에서 0~30 分까지 經時的으로 各各 熱處理시

킨 後 基質을 加하여 10 分間(Fig. 4)과 30 分間 (Fig. 5) 作用시켜 그 結果를 各各 調査하였다.

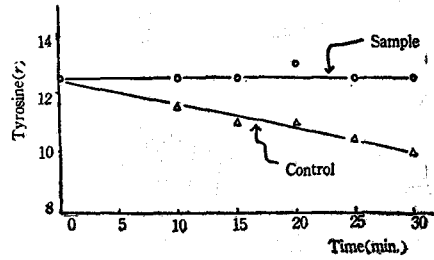


Fig. 4. The effect of Sample on the Heat stability of Enzyme (I)

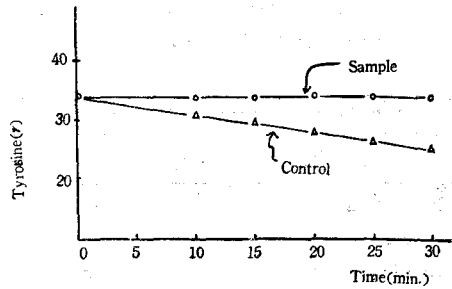


Fig. 5. The effect of Sample on the Heat stability of Enzyme (II)

위 圖 4. 5에서 보는 바와 같이 本 *Alisma canaliculatum* 에서 얻은 Sample 은 α -Chymotrypsin 의 熱失活을 強力히 保護함을 알 수 있었다.

6) 酵素 失活에 미치는 Sample 의 保護作用

α -Chymotrypsin 은 溶液狀態에서 대단히 容易하게 失活되므로 本 *Alisma* 의 Sample 이 그 失活에 對한 保護作用을 하는가에 對해서 調査하였다. 이

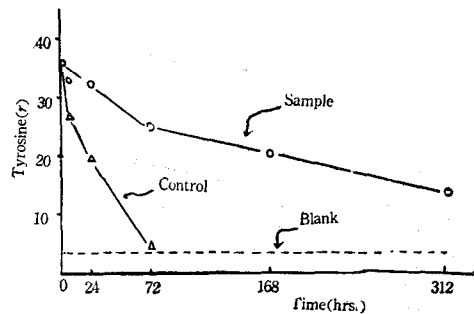


Fig. 6. Protective effect of Sample on the denaturing of α -chymotrypsin

때의 條件은 α -Chymotrypsin 10 μ g/ml의 Buffer (pH 8.0) 溶液에 Sample 2 mg/ml 를 加하여 26.5°C 에 保存하면서 經時的으로 酵素 溶液을 取하여 그 殘存하는 活性를 測定하였을 때의 結果는 다음 圖 6와 같다.

위 圖 6에서 보는바와 같이 α -Chymotrypsin 은 溶液狀態에서는 72 時間에서 100% 失活되었으나 Alisma Sample 을 共存시켰을 경우에는 168 hrs 後에도 約 50%의 活性를 維持하며 312 時間 後에도 約 25%의 活性를 維持하였다. 이 結果로써 本 Alisma sample 은 α -Chymotrypsin 의 失活을 強하게 保護함을 알 수 있다.

7) Sample 蛋白質의 反應에 對해서

本 Sample 은 Alisma Canaliculatum 中에 含有되어 있는 一種의 protein 으로 推測되므로 다음과 같이 各各定性反應을 하여 그 結果 本 Sample 은 protein 의 一種임을 確認하였다.

Table. 3. Qualitative Detection of the Sample.

Reaction	Results
Ninhydrin	+
Biuret	+
Xanthoprotein	+
Folins Reagent	+
Tannic Acid treatment	+
T.C.A treatment	+
Heat	-
Molish Test	-
Picric Acid	-
Benedict's solution	-
Barfoed	-
Seliwanoff	-

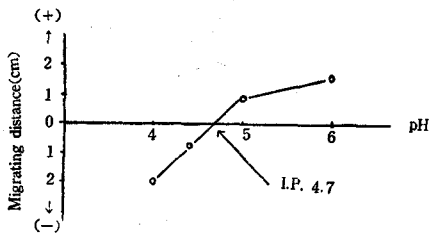


Fig. 7. Isoelectric point of the Sample

8) Sample 의 濾紙電氣泳動性에 對해서

本 sample 은 protein 의 一種이므로 이 Sample 을 電氣泳動法으로 調査하였다. 이때 使用한 Buffer 의 pH는 各各 4.0, 4.4, 5.0, 6.0, 7.5로 하였으며 그 結果 本 Sample 은 各各의 pH에서 單一 Spot 로 나타났으며 그 移動相을 調査한 바 本 Sample 의 I.P는 約 4.7에 位置함을 알 수 있었다.

亦是 本 Sample 은 n-BuOH 4; Aceton 1; water 2의 Solvent system에서 paper chromatography 한 結果 單一 Spot (Rf 3, 1)을 나타내었다.

9) Sample 의 酸 加水分解에 對해서

本 Sample 은 protein 의 一種으로서 α -Chymotrypsin 에 依해서는 全然 分解되지 않음을 Folin's 測定法에서 確認하였으나 Folin 比色法의 發色機構 등을 勘案하여 酸分解에 依한 結果를 再次 檢討하였으며 分解條件은 6 N-HCl 50 ml 에 sample 250 mg 을 溶解하여 100°C에서 分解시켜 그 分解物을 Folin 法으로 呈色하였으며 經時的인 分解狀態는 다음 圖 8와 같다.

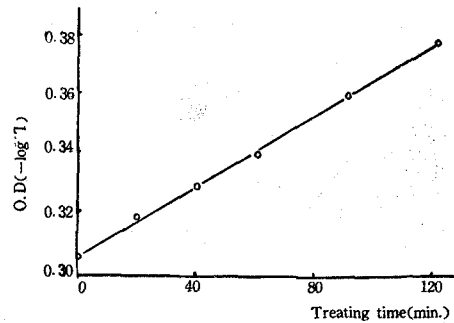


Fig. 8. Hydrolysis of Sample by Hydrochloric Acid

10) Sample 의 抗原性에 對해서

本 Sample 을 0.8% NaCl 溶液에 溶解하여 體重 約 3 kg 의 家兔에 初日 10 mg 을 血管內로 注射하고 4日 間隔으로 2次에 20 mg, 3次에 30 mg 式 各各 注射하여 免疫시킨 後 10日後에 常法에 의 해 心臟으로 부터 採血하여 免疫血清을 얻어 過剩의 抗原에 對하여 Ring Test 와 Gel diffusion Method 를 使用하여 免疫反應을 調査한 結果 原 抗血清에 對해서 positive 로 나타났으나 5倍 稀釋以上에서는 反應을 認定하지 못하였다. 以上の 結果로써 本 Alisma Canaliculatum Sample 은 弱하나마 抗原性을 가지고 있다고 보여진다.

IV. 要 約

Alisma Canaliculatum 으로부터 分離한 protein 의 一種이 α -Chymotrypsin 의 作用에 미치는 影響을 조사한 바 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같다.

- 1) 本 Sample 은 α -Chymotrypsin 에 依해서 全然 作用을 받지 않는 protein 의 一種이며
- 2) 本 Sample 은 α -Chymotrypsin 의 失活을 強하게 保護하며
- 3) 本 Sample protein 의 I.P 는 約 4.7 에 位置하며
- 4) 本 Sample 은 Rabbit 에 對해서 弱하나마 抗

原性を 나타낸다.

V. 參考文獻

- 1) J.B. Summer; "Chemistry and Methods of Enzymes" Academic press (1953).
- 2) P. Desnuelle; "The Enzymes" (1960).
- 3) P. Desnuelle; "Adv. in Protein Chemistry" (1961).
- 4) B.S. Hartley; "Nature" 201, 1284 (1964).
- 5) H. Neurath; "Protease Text" (1965).
- 6) 赤堀四郎; "酵素 研究法" 2. (1960).