

鮭白子から抽出した塩基性ペプチドの抗菌性

野崎一彦¹・松土俊秀²・中島智恭¹・矢嶋瑞夫¹・横塚弘毅²

Antimicrobial Activity of Basic Peptides extracted from Salmon Roe with Hydrochloric Acid

Kazuhiko Nozaki¹, Toshihide Matsudo², Tomoyoshi Nakajima¹, Mizuo Yajima¹,
and Koki Yokotsuka²

Asama Chemical Co., Ltd¹., Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University²

Abstract

Basic peptides were extracted from salmon roe with dilute hydrochloric acid. The peptides were separated into four fractions by Sephadex G-25 chromatography. Each of the fractions was further separated by Sephadex G-50, G-25, or G-15 chromatography, and ten basic peptide fractions with different molecular weights and amino acid compositions were obtained. An intact protamine fraction was not contained in the extract. The antimicrobial activity of the fractions obtained was tested with microorganisms found commonly in foods. Of these fractions, those eluted early on Sephadex chromatography had appreciable antibacterial activity, while those eluted late had the highest activity; the fractions eluted in the middle of the above fractions had little activity. The results suggested that the complete structure of protamine was not needed in order to reveal its antimicrobial activity, and certain specific amino acid sequences contributed to the activity.

細胞核塩基性タンパク質であるプロタミンは、主に魚類の成熟した精子核中にDNAと塩様結合をしたヌクレオプロタミンとして存在している。¹⁾プロタミンの化学構造や物理化学的性状および生物学的機能の研究が進む中で、抗菌作用についても研究がなされ、その塩基性に起因する比較的簡単なポリペプチド構造が抗菌性の発現に関与するのではないかと考えられてきた。^{2, 3)}

最近、プロタミンの抗菌性に関する作用機作について、Islamらは、プロタミンが主に細胞膜のリン脂質に結合し、膜の構造と機能に損傷を与え、⁴⁾細胞膜構造に変化を起こす⁵⁾ことを示した。また、プ

ロタミンを*Bacillus subtilis*に作用させると溶菌現象が起こり、ポリカチオンであるプロタミンの抗菌作用は、他の陽イオン性界面活性剤やポリペプチド抗生物質と類似している⁶⁾ことを示唆した。

一方、プロタミンは強塩基性物質であり、他の無機または有機の酸性物質と塩様結合体を形成し、培地のpHや金属イオン⁷⁾あるいは様々の有機物などが^{8, 9)}抗菌作用に影響を及ぼすことが知られている。従って、食品にプロタミンを添加した場合に食品成分との相互作用により、プロタミンの抗菌作用が弱くなることが考えられる。¹⁰⁾

ブドウマストやワインの酸化防止及び雑菌生育の

防止の目的で、古くから亜硫酸が用いられ、ワインの商業生産にはなくてはならない存在となっている。しかし、亜硫酸はその刺激臭あるいはイオウ臭がオフ・フレーバーとなり、また人体への影響が懸念されている。そこで亜硫酸に代わる抗微生物・抗酸化剤の開発が長く求められてきた。このような背景から、本論文では、果汁及びワイン産業を含む食品産業全般に広く利用できる天然の食品用保存剤の開発を目的として、プロタミンの抗菌性に着目して研究を進めた。しかし、魚類の精子核などから食塩水でヌクレオプロテインを抽出後、冷希塩酸で抽出するというプロタミンの分離法は、比較的熟練した抽出技術と長い処理時間を必要とし、その結果、プロタミンの価格が高くなり、その食品への使用が制限されている。また、プロタミンが強塩基性のために中性ないし塩基性の食品に溶かし難いなどの欠点も指摘され、さらにフェノール化合物と結合して混濁を起こしたり、酸性多糖類やタンパク質に吸着して、その保存効果を著しく低下させるなどの問題がある。

これらのことから、本研究では、鮭の白子に含まれるプロタミン及びそのタンパク質を抽出し、酸によって分解して低分子ペプチドとした後、食品化学的な立場より、これらのペプチドの物理的、化学的及び生物学的な特性を明らかにすることを試みた。その結果、得られたペプチドは種々の食品微生物に対して強い抗菌性を有し、プロタミンよりも強い抗菌性をもついくつかの塩基性ペプチドが分離できたので報告する。

実験方法

鮭白子抽出物の調製

北海道産鮭の凍結白子を室温で放置して解凍し、水洗後6倍量の1N塩酸を加えて50℃30分間加熱した。これを遠心分離し、得られた上清を40% NaOHでpH7.0に調整し、これをロータリーエバポレーターで減圧濃縮して約1/3量にした後、凍結乾燥した。凍結乾燥物を強塩基性陰イオン交換樹脂で処理して塩素イオンを除去した後、弱酸性陽イオン交換樹脂で処置してナトリウムイオンを除去した。このようにして得られた溶液を凍結乾燥したものを白子抽出物と名付けて、以下の実験に使用した。

白子抽出物のゲルクロマトグラフィー

白子抽出物10gを0.01N塩酸40mlに溶解し、メンブランフィルター(0.45 μ m)で濾過後、Sephadex G-25カラム(5X90cm;ゲルベッド1400ml)につけ、0.01N塩酸を用い、室温で、40ml/hの流速で溶出を行い、各画分15mlづつ集めた。溶出曲線はニンヒドリン法¹³⁾及び280nmの紫外部吸収を測定し

て作成した。このゲル濾過によって白子抽出物はFig. 1に示すように大きく4つのピークに分かれた。各ピークを集めてロータリーエバポレーターを用いて、40℃、減圧下でシロップ状になるまで濃縮後、濃縮物を水に溶かして凍結乾燥した。この操作を計7回繰り返した。また、4画分の凍結乾燥物をSephadex G-15、G-25及びG-50クロマトグラフィーによって再分別した。

画分1の凍結乾燥物をSephadex G-50(5X90cmカラム)、画分2と画分3の凍結乾燥物をSephadex G-25(5X90cmカラム)、画分4の凍結乾燥物をSephadex G-15(3.5X80cmカラム)を用いてさらに分別し、最終的に10画分(1-1-1、1-1-2、1-2、1-3、2-1、2-2、3-1、3-2、4-1、4-2)に分け、それぞれを凍結乾燥後、冷所に保存した。

アミノ酸組成

各画分約1mgを、定沸点塩酸1mlを用いて、減圧封管中110℃、24時間加水分解した。加水分解した試料液を減圧乾固後、NaOHの入ったデシケーター中で一夜放置して塩酸を完全に除いた。乾固物に1mlの0.2N塩酸を加えて溶かし、メンブランフィルター(0.45 μ m)で濾過後、濾液を日立高速液体クロマトグラフ-アミノ酸分析システムで分析した。

Sephadexクロマトグラフィーによる分子量の推定

Sephadex G-25(fine)を1.5X140cmのガラスカラムに充填し、室温で0.05NaClを含む0.01N塩酸で十分に洗った。チトクロームc(M.W.13000、シグマ製)、硫酸サルミン(M.W.4200、和光製)、ビタミンB₁₂(M.W.1350、ナカライテスク製)、グルタチオン・還元型(M.W.600、興人製)、グルタチオン・酸化型(M.W.307、興人製)、NaN₃(M.W.65、ナカライテスク製)の適当量を1mlの溶出液に溶かし、カラムに添加した。クロマトグラフィーは15ml/hの溶出速度で行い、ニンヒドリン法及び可視あるいは紫外部吸収を測定して溶出曲線を作成した。次いで、白子抽出物及び各画分を同様に同じクロマトグラフィーで分離し、マーカーの分子量と溶出位置との関係から、試料の分子量を求めた。

各ペプチド画分のアルカリ分解による分子量の推定

白子抽出物と各画分のアルカリ分解前後のニンヒドリン発色値¹⁴⁾から各ペプチドの相対的な分子量の比較を行った。試料液0.5mlを試験管にとり、2.5N NaOH 1mlを加えた後、蓋をしないで湯浴中90℃、2.5時間加熱した。冷却後、30%酢酸1mlを加えてpHを調整した。これを試料液としてニンヒドリン

発色¹³⁾を行った。

DNP法によるN-末端アミノ酸分析

白子抽出物あるいは各画分それぞれ3mgを5mlの1%トリメチルアミン水溶液に溶かし、10mlの5%FDNB-エーテル溶液を加えた後、室温で2時間反応させた。過剰のFDNBをエーテルで除き、エバポレーターで減圧乾固した。DNP化試料を6N塩酸で減圧封管中、105℃、6時間加水分解を行った。次に、水を加えて塩酸濃度を約1Nとした後、エーテルで5回抽出して、エーテル可溶性DNP-アミノ酸画分を得た。残った水溶液を減圧乾固し、乾固物より酸性アセトンで抽出したものを水溶性DNP-アミノ酸画分とした。

エーテル可溶性DNP-アミノ酸は薄層クロマトグラフィー (TLC) で、水溶性DNP-アミノ酸はペーパークロマトグラフィー (PPC) で分離を行った。TLCには20X20cmの薄層を用い、展開溶媒は、一次元：トルエン/ピリジン/エチレンクロロヒドリン/0.8Nアンモニア (100:30:60:60、v/v)、二次元：クロロフォルム/メタノール/酢酸 (95:5:1、v/v) とした。PPCはフタル酸緩衝液 (pH6.0) で飽和したtert-アミルアルコールを用いて行った。

展開後、各黄色のスポットを4mlの1%NaHCO₃で溶出し、360nm (プロリンは385nm) の吸光度を測定した。回収されたDNP-アミノ酸の加水分解中の破壊率はPorter & Sangerの報告¹⁵⁾に基づいてDNP-アルギニン10%、DNP-グリシン60%、DNP-プロリン90%、DNP-セリン10%とした。しかし、DNP化中の損失やクロマトグラフィー中の損失は考慮しなかった。

抗菌力試験

供試菌として、*Bacillus subtilis* IFO 1069、*Escherichia coli* IFO 3044、*Enterobacter aerogenes* IAM 12348、*Staphylococcus aureus* FDA 7091、*Lactobacillus plantarum* IAM 1041の5菌株を用いた。

前培養培地として、乳酸菌以外の細菌にはトリプトソイ培地 (トリプトン1.7%、ペプトン0.3%、グルコース0.28%、KH₂PO₄0.25%、NaCl0.5%、pH7.0) を用い、乳酸菌には別の培地 (酵母エキス1%、グルコース1%、ペプトン1%、酢酸ナトリウム0.3%、pH6.5) を用いた。

前培養培地10mlを50ml容三角フラスコに分注し、それぞれの検定菌を1白金耳接種し、70往復/分、35℃で16時間振盪培養した。

抗菌力検定用培地は、前培養培地と同じものを使用した。この培地8.5mlをL字管 (16.5X165mm、管

口より6cmの所を直角に曲げてある) に入れ、各画分溶液1mlを加えてオートクレーブ (121℃、15分) にかけて。これに各菌体の前培養液0.5mlを加えた。培養液中の生菌数は、各培養液を適宜生理的食塩水で希釈した後、減菌シャーレに注ぎ、この上に約40℃に保温した寒天培地 (前培養液に寒天を加えたもの) 約10mlを加え、35℃で2日間培養し、生じたコロニーを計数することによって調べた。

培養液中の菌濃度は、経時的に培養液の濁度を測定することによって調べた。すなわち、培養中のL字型試験管を試験管アダプターのついたUT-11型コロナ濁度計にいれ、一定時間毎に濁度を測定して培養曲線を作成した。

実験結果及び考察

白子抽出物のSephadex G-25クロマトグラフィー

白子の塩酸抽出液をイオン交換樹脂により脱塩した後凍結乾燥し、原料白子1kgあたり、約15gのペプチド混合物 (白子抽出物) を得た。この白子抽出物をSephadex G-25クロマトグラフィーで分別し、ニンヒドリン発色して溶出曲線を描くと少なく

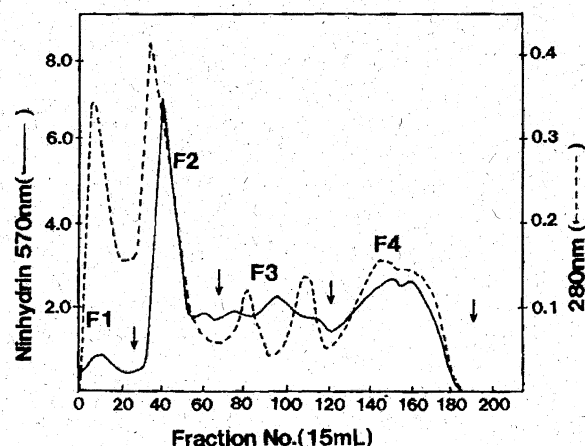


Fig. 1. Fractionation of acid extract from salmon roe by Sephadex G-25 chromatography.

The extract (10 g of peptide lyophilizate) was dissolved in 40 ml of 0.01 N HCl and filtered through a membrane filter (0.45-micro m). The solution was applied to a column of Sephadex G-25 (5 X 90 cm) followed by 483 ml water. The peptides were eluted from the column with 0.01 N HCl at a flow rate of 40 ml/h. Fractions of 15 ml were collected and aliquots of 0.1 ml were used for determining the elution profile by the ninhydrin method. The elution profile was also drawn by measuring the absorbance at 280 nm. The same chromatography was repeated 7 times.

とも4つの大きなピークが得られた (Fig. 1)。白子抽出物70gより画分1、5.17g；画分2、20.53g；画分3、22.41g；画分4、25.6gが凍結乾燥物として得られた。この曲線中の各ピークの溶出位置は、280nmでの吸収で作成した溶出曲線とほぼ一致したが、両曲線間のピークの大きさは必ずしも一致しなかった。これらのことは、白子抽出物中には種々のペプチドと紫外吸収物質が含まれ、その中のいくつかのペプチドは紫外吸収物質と結合した形で存在し、またこのクロマトグラフィーで排除容量付近のピークの高さが低いことは未分解のプロタミンがほとんどなく、大部分は分解された低分子のペプチドではないかと推定できた。

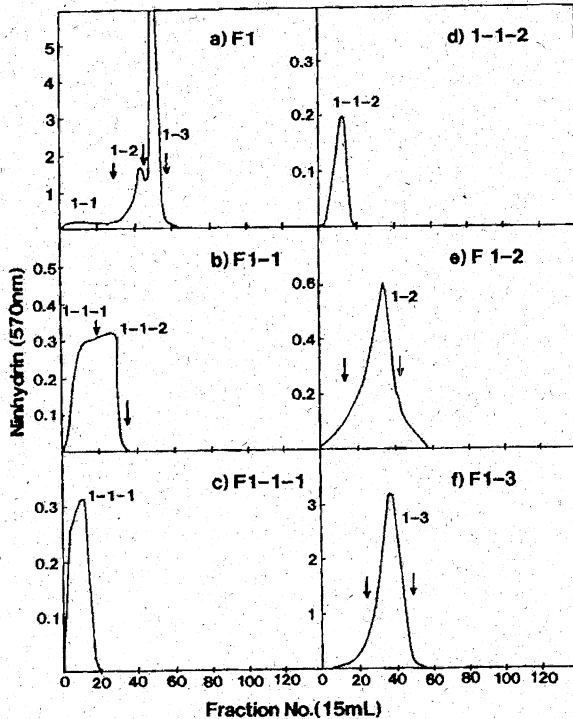


Fig. 2. Sephadex G-50 chromatography of fraction 1 and fractions separated from fraction 1.

The conditions were the same as given for Fig. 1.

2.1 g of fraction 1 (Fig. 1), 0.36 g of fraction 1-1 separated in (a), 0.16 g of fraction 1-1-1 separated in (b), 0.11 g of fraction 1-1-2 separated in (b), 0.56 g of fraction 1-2 separated in (a), and 0.66 g of fraction 1-3 separated in (a) were dissolved in 40 ml of 0.01 N HCl and applied to the column. The elution profiles were drawn after eluting with 515 ml of 0.01 N HCl in (a), 500 ml in (b), 493 ml in (c), 540 ml in (d), 585 ml in (e), and 780 ml in (f).

これらの4つの画分を種々のゲルクロマトグラフィーによってさらに分別した結果をFig. 2~Fig. 4に示した。画分1をSephadex G-50クロマト

グラフィーで分別すると、画分1-1~1-3の3つに分かれた (Fig. 2 a)、ピークの前半を1-1-1、後半を1-1-2とし、両者を再度同じカラムにつけて溶出した (Fig. 2 cと2 d)。画分1-2と画分1-3はSephadex G-50クロマトグラフィーを行っても、それ以上分かれず一つの主要なピークしか現れなかった (Fig. 2 eとFig. 2 f)。

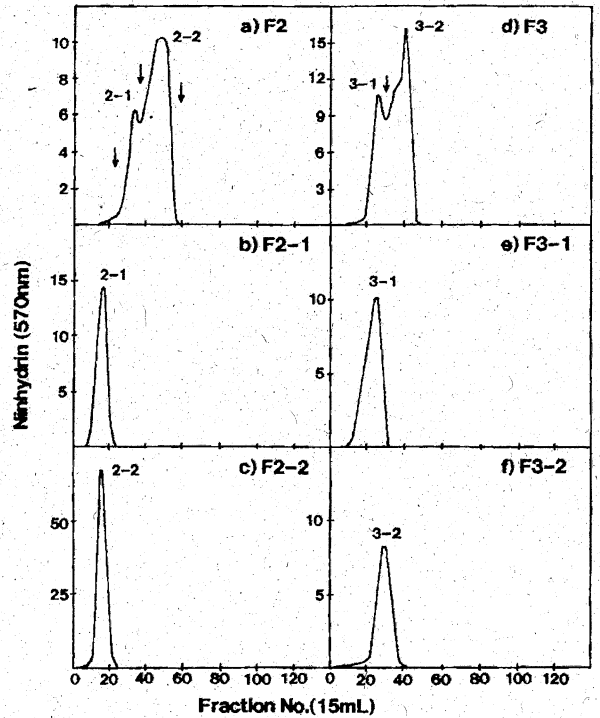


Fig. 3. Sephadex G-25 chromatography of fractions 2 and 3 and fractions separated from the two fractions.

3.27 g of fraction 2, 7 g of fraction 3 (Fig. 1), 4.14 g of fraction 3-1 (d), and 7.17 g of fraction 3-2 (d) were dissolved in 40 ml of 0.01 N HCl. 4.28 g of fraction 2-1 separated in (a) and 1.13 g of fraction 2-2 (a) were dissolved in 3 ml of 0.01 N HCl. The sample solutions were applied to a column of 5 X 90 cm (a, d, e, f) or a column of 2 X 107 cm (b, c). The elution profiles were drawn after eluting with 440 ml (a), 180 ml (b), 150 ml (c), 495 ml (d), 620 ml (e), and 450 ml (f) of 0.01 N HCl. The other conditions were the same as given in Fig. 1.

画分2は、Sephadex G-25クロマトグラフィーで再分別すると、2-1と2-2の二つに分かれたので (Fig. 3 a)、同じカラムに再びつけ溶出したがそれ以上のピークに分けることができなかった (Fig. 3 bと3 c)。画分3を上と同じカラムで再分別すると、3-1と3-2の二つのピー

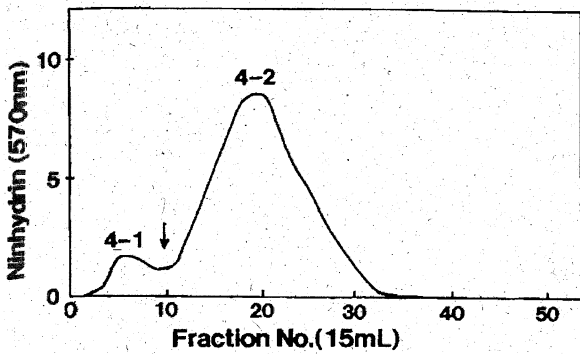


Fig. 4. Sephadex G-15 chromatography of fraction 4. 10 g of fraction 4 (Fig. 1) was dissolved in 20 ml of 0.01 N HCl and applied to a column of 3.5 X 80 cm. The elution profile was drawn after eluting with 204 ml of 0.01 N HCl. The other conditions were the same as given in Fig. 1.

Table 1. Yield of peptide fractions separated from 70 g of acid extract of salmon roe by Sephadex chromatography.

Peptide fraction	Yield (g)	Recovery (%)
1-1-1	0.26	0.37
1-1-2	0.23	0.33
1-2	0.40	0.57
1-3	0.37	0.53
2-1	2.74	3.91
2-2	0.85	1.21
3-1	3.29	4.70
3-2	6.09	8.70
4-1	1.38	1.97
4-2	23.68	33.82
Total	39.29	56.11

クに分かれた (Fig. 3 d)。それぞれのピークを再度同じSephadex G-25カラムで分けるとそれぞれ一つのピークとなった (Fig. 3 eと3 f)。

画分4は、Sephadex G-15クロマトグラフィーで明確な二つのピーク、4-1と4-2に分かれた。

以上10の画分の収量と収率をTable 1に示した。分子量が大きいと考えられる画分1-1-1~1-3の収量は非常に低く、分子量が最も小さいと思われる画分4-2が最も多量に得られ、次いで比較的分子量が小さいと考えられる画分3-2が多量に回収された。

各ペプチド画分のアミノ酸組成

Table 2にプロタミン (サルミンA11とサルミンA1) のアミノ酸組成¹⁶⁾の文献値、本研究で鮭の

白子より分離した抽出物、及び各ペプチド画分のアミノ酸組成を示した。鮭プロタミンであるサルミンA11とサルミンA1の構成アミノ酸の数は非常に少なく、A11では6つ、A1ではわずか5つである。どちらのサルミンでも全アミノ酸の約70%はアルギニンであり、次いでセリン、プロリン、グリシンがそれぞれ全アミノ酸の6~12%をしめている。N-末端アミノ酸はプロリン、C-末端アミノ酸はグリシンということも共通している。白子抽出物中にはサルミンA11やA1には含まれないアミノ酸が存在していた。すなわち、この抽出物の加水分解物中には鮭プロタミンには含まれていないスレオニン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン、リジン、ヒスチジンや酸性アミノ酸が検出された。このことは本抽出物中にはプロタミン以外の種々のタンパク質

Table 2. Amino acid composition of Salmin A11 and Salmin A1, extract from salmon milt, and peptide fractions separated from the extract.

Amino acid	Salmin A11	Salmin A1	Salmon roe extract	Fractions		
				1-1-1	1-1-2	1-2
Asp			0.16	1.70	1.50	0.79
Thr			0.14	1.01	0.93	0.41
Ser	12	11	7.19	8.28	7.76	7.68
Glu			1.18	3.68	3.24	1.79
Pro	9	9	9.39	8.68	13.42	8.84
Gly	6	6	6.90	4.08	4.05	3.03
Ala	3		1.70	0.88	0.85	0.53
Val		6	4.41	5.59	5.75	4.17
Met			trace	trace	trace	trace
Ile	3		1.13	1.86	1.95	1.38
Leu			0.14	1.41	1.27	0.66
Tyr			trace	0.45	0.29	trace
Phe			trace	0.28	trace	trace
Lys			0.05	5.39	5.49	2.18
His			trace	0.41	0.31	trace
Arg	67	69	67.58	58.32	53.23	68.55

Table 2 (continued).

Amino acid	2-1	2-2	Fractions			
			3-1	3-2	4-1	4-2
Asp	0.29	0.12	trace	trace	trace	trace
Thr	0.20	trace	trace	trace	trace	trace
Ser	9.71	9.29	6.72	2.75	6.23	6.72
Glu	1.13	1.22	0.53	0.39	1.29	0.86
Pro	10.12	6.44	9.68	4.34	11.65	10.25
Gly	9.91	19.51	6.50	11.51	2.87	5.09
Ala	2.66	0.85	1.85	0.51	1.78	0.30
Val	0.95	0.30	3.56	0.81	7.28	5.75
Met	trace	trace	trace	0	trace	trace
Ile	0.32	0.09	1.16	0.40	1.77	1.33
Leu	0.14	trace	trace	trace	trace	trace
Tyr	trace	trace	trace	0	0	0
Phe	trace	trace	trace	0	0	0
Lys	0.17	trace	0.61	0.23	2.50	1.06
His	trace	trace	trace	trace	trace	trace
Arg	64.42	62.19	69.38	79.07	64.63	70.64

やペプチドがプロタミン画分とともに白子より抽出されたことを意味する。各画分中に最も多量に存在するアミノ酸はアルギニンで、全アミノ酸の53~79%をしめている。この高いアルギニン含量は、サルミンA11やA1のアルギニン含量である67、69%と類似した値であった。

分離された10画分中で、画分1-1-1は最も分子量大きいと思われ、Sephadex G-25やG-50クロマトグラフィーでプロタミンと同じ位置に溶出されたが、そのアミノ酸組成はプロタミンのそれとはかなり異なり、プロタミン以外のペプチド成分が大部分であると考えられる。画分1-1-2もまた大きな分子量をもつ塩基性ペプチドと考えられるが、そのアミノ酸組成はプロリン含量以外は画分1-1-1とよく一致している。二つの画分は、他の画分よりもリジン含量が多く、逆にアルギニン含量は少なかった。

画分1-2は、アルギニンの含量が画分1-1-1より若干多いが、その他のアミノ酸含量はほぼ同じであった。画分1-3は他の画分と比較してアルギニン含量が多く、一方バリン含量は画分2-1、2-2、3-2と同様に非常に少なかった。

画分2-1の主要なアミノ酸組成はサルミンA11のそれとかなり類似していた。画分2-2はグリシン含量が全画分中最も多く含まれていた。

画分3-1のアミノ酸組成は、サルミンA1のそれとかなり一致していた。画分3-2はグリシンとアルギニンが特に多く含まれていた。また、セリン、プロリン、バリン含量が少なかった。

以上のゲルクロマトグラフィーの溶出パターンとアミノ酸分析の結果、本抽出物から得られた10画分は、白子中のプロタミンを含む種々のタンパク質の分解物あるいは塩基性ペプチドがほとんどをしめると考えられる。

アルカリ分解前後のニンヒドリン発色による分子量の推定

α -アミノ酸はニンヒドリンと反応して紫青色の物質を生成し、また ω -アミノ酸、ペプチド、タンパク質なども反応し同様な発色をするがプロリンのようなイミノ酸とは黄色の色素しか生成せず、また α -アミノ基との反応生成物が最も強い呈色値をもつことが知られている。ニンヒドリンがペプチドと反応したとき、ペプチドの種類によってその呈色値が著しく異なり、またペプチドのN-末端- α -アミノ基とはよく反応し強いニンヒドリン発色をするが、ペプチド内部の構成アミノ酸の側鎖の ω -アミノ基や他の発色団は α -アミノ基ほどには強い呈色値は得られない。ペプチドをアルカリ分解してもこ

れを完全に分解できず、またアルカリによるアミノ酸自身の破壊も著しいが、アルカリ分解後には新しい α -アミノ基が出現し、分解前のニンヒドリン呈色値と分解後の呈色値の比はペプチドの大きさの目安になる。従って、アルカリ分解前後のニンヒドリン呈色値の比によって各画分を比較すると、各画分の絶対分子量は分からないが、それらの相対的な大きさを知る一つの手段となる。すなわち、各画分の呈色比がnativeなプロタミンのそれと類似していれば、これらの画分は分解されておらず、一方呈色値が非常に低ければ分解されたプロタミンかあるいは他の低分子塩基性ペプチドであることを意味する。

Table 3. Ninhydrin color values at 570 nm before and after alkaline hydrolysis of salmon roe extract and peptide fractions.

Fractions	Sample weight(g)/ Water volume(ml)	Ninhydrin color values at 570 nm		Ratio B/A
		before alkaline hydrolysis (A)	after alkaline hydrolysis (B)	
Salmon protamine	2.3mg/8.9ml	0.061	1.294	21.2
Salmon milt extract	1.3mg/3.9ml	0.433	1.784	4.1
1-1-1	1.0mg/3.0ml	0.170	0.686	4.0
1-1-2	0.9mg/2.7ml	0.180	0.744	4.1
1-2	1.0mg/3.0ml	0.333	1.150	3.5
1-3	1.2mg/3.6ml	0.996	1.702	1.7
2-1	1.4mg/4.2ml	0.708	1.828	2.6
2-2	0.9mg/2.7ml	1.347	2.200	1.6
3-1	0.7mg/2.1ml	0.554	1.774	3.2
3-2	0.9mg/2.7ml	0.857	2.150	2.5
4-1	1.3mg/3.9ml	0.344	1.356	3.9
4-2	1.0mg/3.0ml	0.355	1.652	4.7

Table 3は、鮭プロタミン、白子抽出物及びゲルクロマトグラフィーで分離された10画分のアルカリ分解前後のニンヒドリン呈色値を示している。鮭プロタミンのアルカリ分解後の呈色値は分解前の呈色値の21.2倍となった。鮭プロタミンであるサルミンA1のアミノ酸組成はアルギニン24、グリシン2、プロリン3、セリン4、バリン2、(計35)；サルミンA11のアミノ酸組成はアルギニン22、グリシン2、イソロイシン1、プロリン3、セリン4、アラニン1(計33)であり、N-末端アミノ酸はプロリンである。プロリンのニンヒドリン反応物の570nmの呈色値は著しく低いので、鮭プロタミンのアルカリ分解前後のニンヒドリン呈色値の比は数百となることが予想できたが、得られた実験値は21.2であった。これに対する説明として、プロタミンが完全に加水分解されていないこと、またアルカリ分解中にアミノ酸の破壊が起こっていることによって、アルカリ分解後に実際に得られた呈色値は、理想的に分解されたときに得られる値よりも低くなったこ

とが考えられる。他方、白子抽出物及び10画分の同比は1.6~4.7となり著しく低かった。これは鮭プロタミンの場合の低い呈色比に対する理由に加えて、白子抽出中にはもともと分子量の小さな多数のペプチドが存在していたのではないかとということが考えられる。

白子抽出物のN-末端アミノ酸分析

仮に多数のペプチドが白子抽出物や各画分に存在するとすれば、N-末端として多数のアミノ酸が検出できるはずである。DNP-アミノ酸分析の結果、白子抽出物3mg中には、アルギニン0.005μモル、グリシン0.047μモル、プロリン0.147μモル、セリン0.004μモル、その他のアミノ酸0.015μモルのN-末端アミノ酸が検出できた。さらに、画分1(N-末端アミノ酸として、アルギニン0.008μモル、グリシン0.053μモル、プロリン0.042μモル、セリン0.003μモル、その他0.045μモル)、画分2(アルギニン0.047μモル、グリシン0.053μモル、プロリン0.023μモル、セリン0.013μモル、その他0.008μモル)、画分3(アルギニン0.041μモル、グリシン0.082μモル、プロリン0.074μモル、セリン0.046μモル、その他0.030μモル)、画分4(0.044μモル、グリシン0.111μモル、プロリン0.168μモル、セリン0.040μモル、その他0.044μモル)中には全て多数の末端アミノ酸が検出された。末端アミノ酸分析から推定した各画分の相対的な分子量は、画分1の平均分子量を100とすると、白子抽出物52;画分2、79;画分3、47;画分4、29であった。これらの結果、早く溶出される画分ほど大きな分子量をもつことが分かった。

ゲルクロマトグラフィーより推定した各画分の平均分子量

色々な種類のSephadexクロマトグラフィーの溶出パターンから、この白子抽出物は不均一で、かつnativeなプロタミンよりもかなり分子量の小さなペプチドであることが明らかとなった。それぞれのペプチド画分が完全に精製されていればそれぞれのペプチドの分子量を決定することは容易であるが、アミノ酸組成やN-末端アミノ酸分析から明らかのように均一なペプチドは見あたらない。そこで、各画

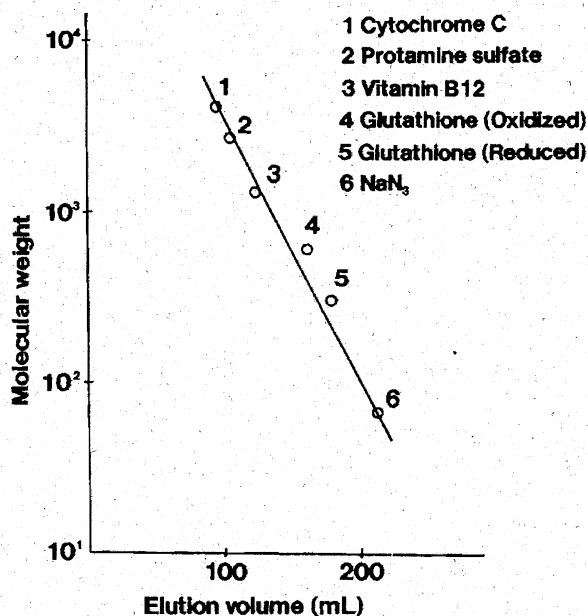


Fig. 5. Relationship between elution volumes of standard proteins on Sephadex G-25 and their molecular weights.

分の分子量の推定をゲルクロマトグラフィーでのパターンによって推定した。

Fig. 5は分子量マーカーの溶出液量と分子量との関係を示したものである。分子量65のNaN₃から分子量13000のチトクロームcまで、分子量と溶出液量との間で直線関係が得られた。この検量線に基づいて、各画分の分子量を求めた結果をTable 4に示した。ゲルクロマトグラフィーで分別した10画分の分子量は650~4200に分布した。各画分の溶出順序と分子量との間には相関性はなかった。このこととDNPアミノ酸分析及びアルカリ分解前後のニンヒドリン分析のデータを総合的に検討した結果、画分3-1から画分4-2は、保存中あるいはクロマトグラフィー中に水素結合などによって同じ塩基性ペプチド同士または他のいくつかの塩基性ペプチドが会合し、見かけ上大きな分子量をもつペプチドとして挙動し、このクロマトグラム上ではより早い位置に現れたが、N-末端分析ではもとのペプチド群の分子量を反映して小さな値となり、Fig. 5のクロマトグラフィーの結果と一致しなかったものと推定した。

Table 4. Estimation of molecular weights of peptide fractions by Sephadex G-25 chromatography.

Fraction	Molecular weights	Fraction	Molecular weight
1-1-1	>4200	2-2	650
1-1-2	>4200	3-1	2000, 800
1-2	3800	3-2	1300
1-3	900	4-1	>4200
2-1	800	4-2	2800

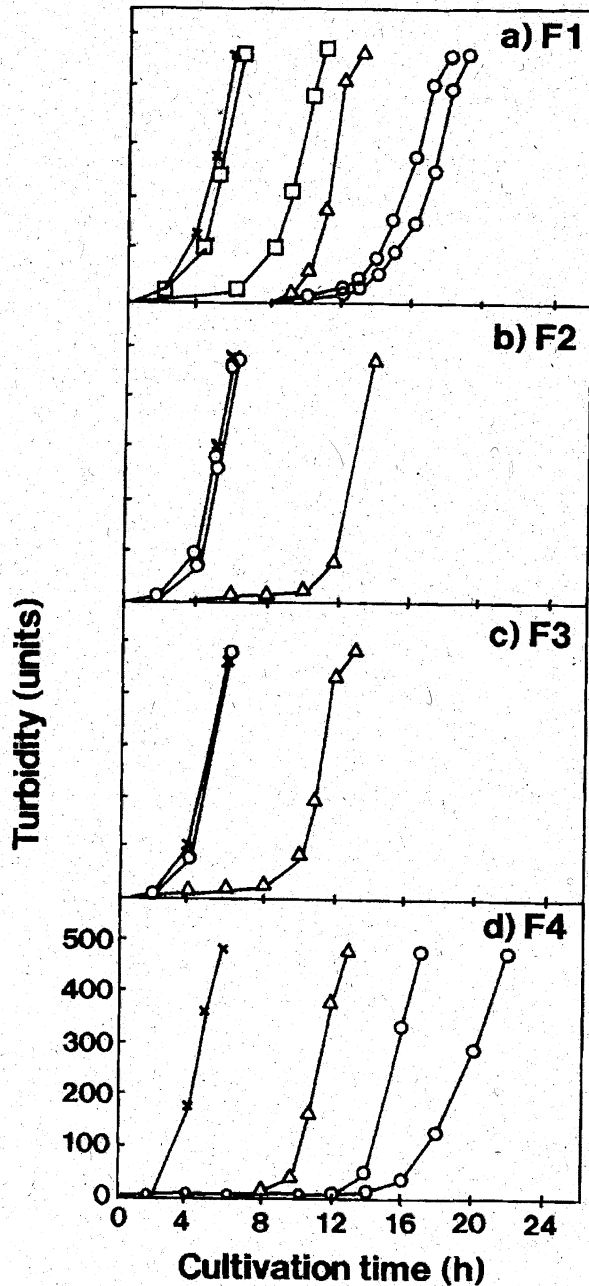


Fig. 6. Antimicrobial activity of peptide fractions towards *Bacillus subtilis*.

Each fraction was added to give a concentration of 0.05% (w/v) to a nutrient broth consisting of tryptone 1.7%, peptone 0.3%, glucose 0.28%, KH_2PO_4 0.25%, and NaCl 0.5% in deionized water (pH 6.0). The initial number of cells per milliliter in each culture was 10^4 to 10^6 . The concentrations of microbial cell suspensions in culture broths were estimated by measuring the turbidity with a Corona, model UT-11, turbidimeter.

-X- Control, -Δ- Salmon roe extract (a); -O- Fraction 1-1-1 (a); -●- 1-1-2 (a); -□- 1-2 (a); -■- 1-3 (a); -○- 2-1 (b); -●- 2-2 (b); -○- 3-1 (c); -●- 3-2 (c); -○- 4-1 (d); -●- 4-2 (d).

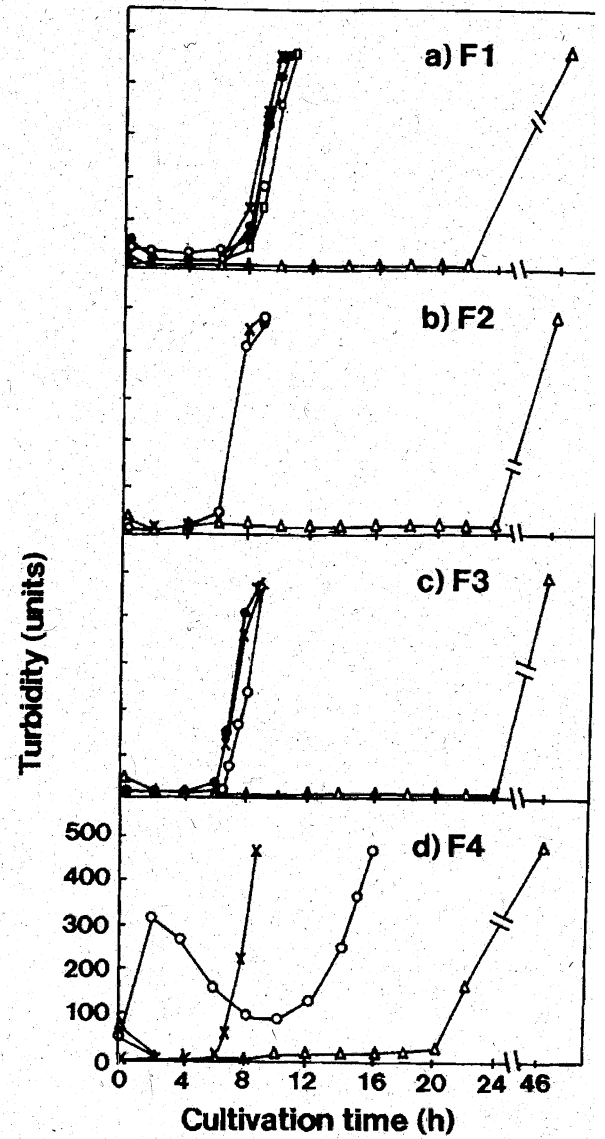


Fig. 7. Antimicrobial activity of peptide fractions towards *Escherichia coli*.

Each fraction was added to give a concentration of 0.1% (w/v) to the nutrient broth. The other conditions were the same as given in Fig. 6.

-X- Control, -Δ- Salmon roe extract (a); -O- Fraction 1-1-1 (a); -●- 1-1-2 (a); -□- 1-2 (a); -■- 1-3 (a); -○- 2-1 (b); -●- 2-2 (b); -○- 3-1 (c); -●- 3-2 (c); -○- 4-1 (d); -●- 4-2 (d).

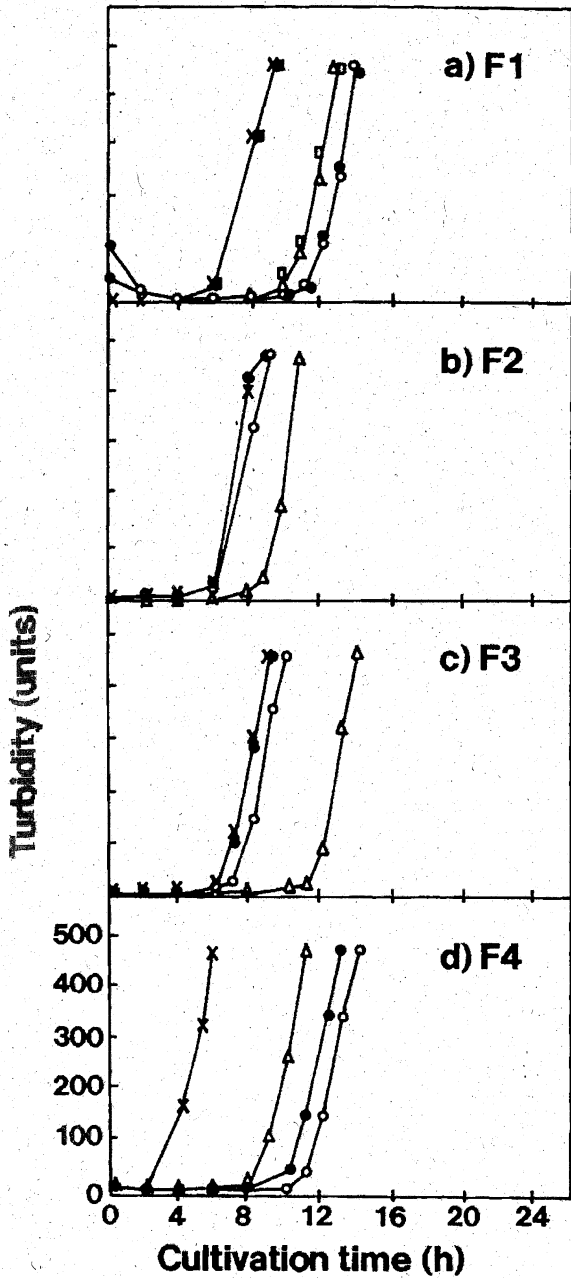


Fig. 8. Antimicrobial activity of peptide fractions towards *Enterobacter aerogenes*.

The conditions were the same as given in Fig. 6.

-X- Control, -Δ- Salmon roe extract (a); -○- Fraction 1-1-1 (a); -●- 1-1-2 (a); -□- 1-2 (a); -■- 1-3 (a); -○- 2-1 (b); -●- 2-2 (b); -○- 3-1 (c); -●- 3-2 (c); -○- 4-1 (d); -●- 4-2 (d).

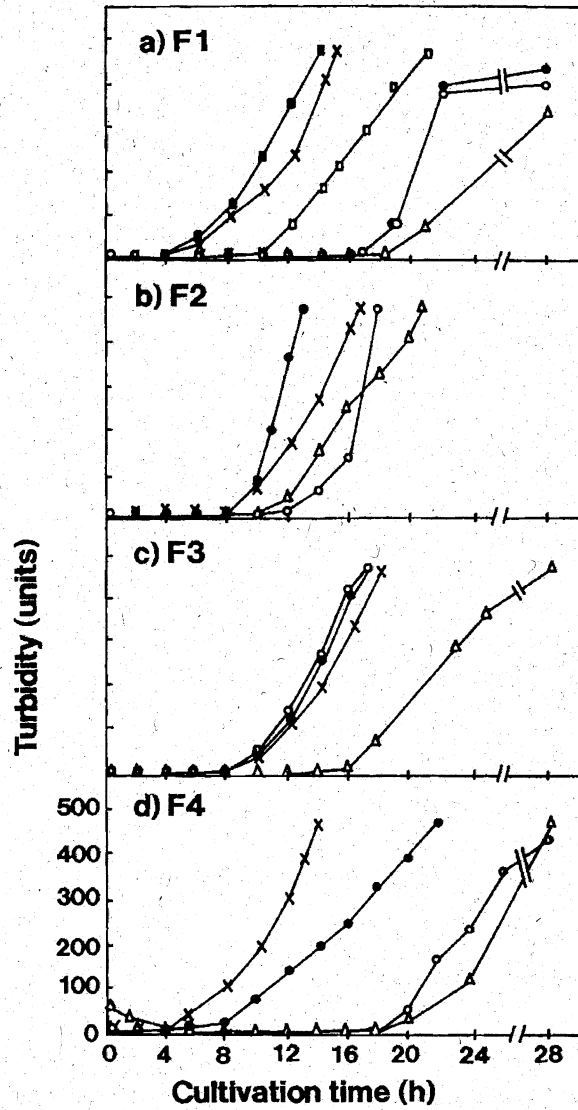


Fig. 9. Antimicrobial activity of peptide fractions towards *Staphylococcus aureus*.

-X- Control, -Δ- Salmon roe extract (a); -○- Fraction 1-1-1 (a); -●- 1-1-2 (a); -□- 1-2 (a); -■- 1-3 (a); -○- 2-1 (b); -●- 2-2 (b); -○- 3-1 (c); -●- 3-2 (c); -○- 4-1 (d); -●- 4-2 (d).

The concentration of the fractions added to the broth was 0.005% in (a) and (d), and 0.001% in (b) and (c).

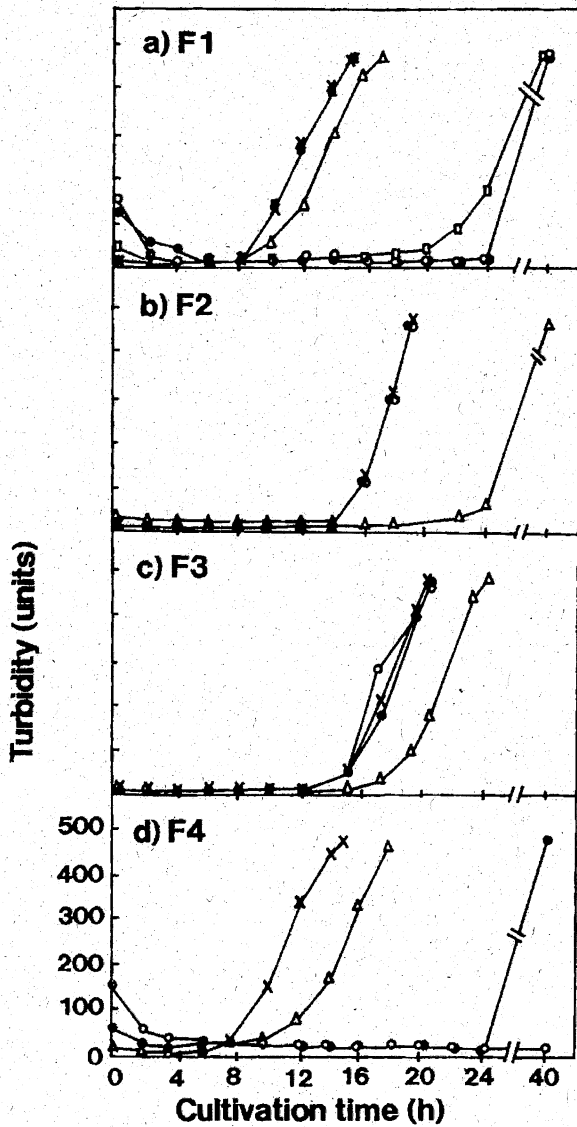


Fig. 10. Antimicrobial activity of peptide fractions towards *Lactobacillus plantarum*.
 -X- Control, -Δ- Salmon roe extract (a); -O- Fraction 1-1-1 (a); -●- 1-1-2 (a); -○- 1-2 (a); -●- 1-3 (a); -○- 2-1 (b); -●- 2-2 (b); -○- 3-1 (c); -●- 3-2 (c); -○- 4-1 (d); -●- 4-2 (d).

The concentration of the fractions added to the broth was 0.005% in (a), (b), and (d), and 0.001% in (c).

各画分の抗菌性

鮭白子抽出物及びこれからゲルクロマトグラフィーで分別した10画分の種々の微生物に対する抗菌性試験の結果をFig. 6 (*B. subtilis*)、Fig. 7 (*E. coli*)、Fig. 8 (*E. aerogenes*)、Fig. 9 (*S. aureus*)、Fig. 10 (*L. plantarum*) に示した。Fig. 11には上記5種の微生物に対する鮭白子抽出物、市販の鮭硫酸プロタミンと市販のニシン硫酸プロタミンの抗菌性を示した。

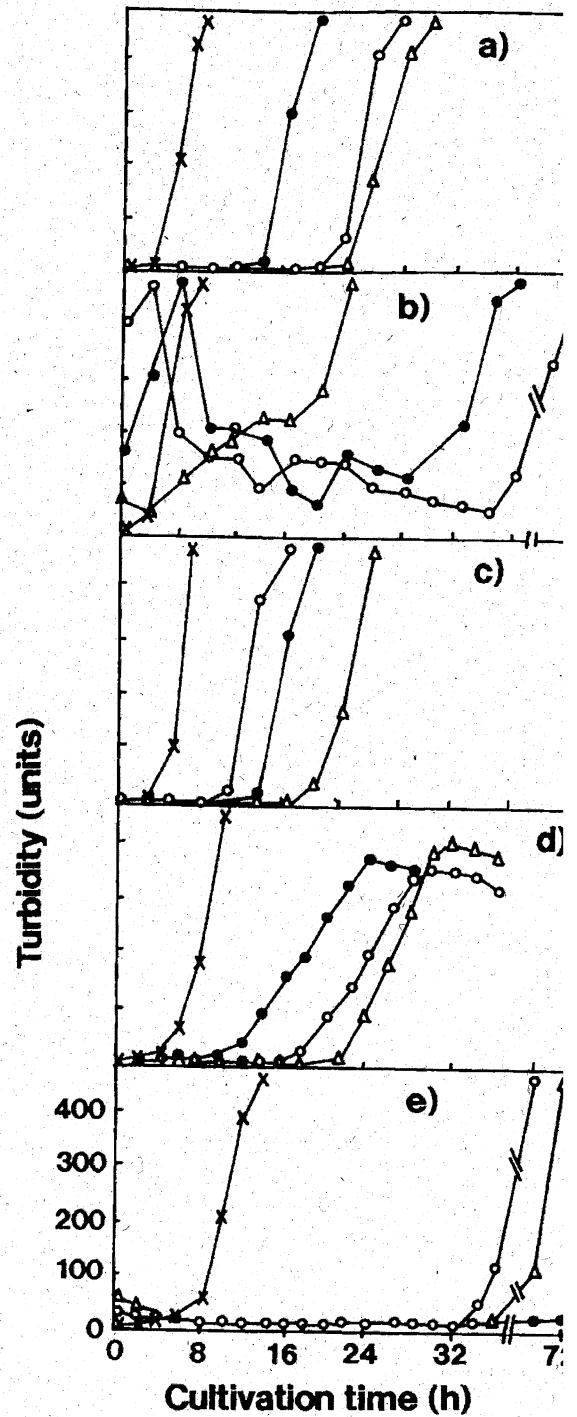


Fig. 11. Antimicrobial activity of salmon roe extract, protamine sulfate from salmon roe, and protamine sulf from herring towards *Bacillus subtilis* (a), *Escherich coli* (b), *Enterobacter aerogenes* (c), *Staphylococcus aureus* (d), and *Lactobacillus plantarum* (e).

-X- Control; -Δ- Salmon roe extract; -●- Protamine sulfate from salmon roe; -○- Protamine sulfate from herring.

The concentration of the fractions added to the broth was 0.005% in (a), (b), and (d), and 0.001% in (c).

鮭白子抽出物は5つの菌株すべてに対して増殖抑制効果を示した。Fig. 1のゲルクロマトグラフィーで分別した4画分中、最も抗菌力が強かったのは画分4(4-1と4-2)であり、5つの菌株全てに対してそれらの誘導期が鮭白子抽出物と同等か、あるいはさらに3倍程度長くなった。また、画分4-1と4-2の抗菌活性は2種の硫酸プロタミン(鮭とニシン)と同等以上であった。画分1(1-1-1~1-3)は、*E. coli*に対しては抗菌作用を示さないが、その他の4菌株に対しては鮭白子抽出物と同等ないし約2倍の抗菌効果が認められた。

Table 5. Growth of microorganisms on agar plates containing protamine sulfate preparations from salmon roe and herring, salmon roe extract, and peptide fractions.

	Microorganisms				
	BS	EC	EA	SA	LP
Protamine sulfate from herring	+/-	++	+/-	+/-	++
Protamine sulfate from salmon roe	++	++	+/-	+	+
Salmon roe extract	+	+	+	+	+
Fraction 1-1-1	++	-	+	+	++
1-1-2	++	-	+	+	++
1-2	+/-	-	+	+/-	++
1-3	-	-	-	+	-
2-1	-	-	-	-	-
2-2	-	-	-	-	-
3-1	-	-	-	-	-
3-2	-	-	-	-	-
4-1	+++	+/-	++	+	+++
4-2	++	++	++	+/-	++

The degree of inhibition is indicated as - for no growth inhibition of microorganisms, and +, ++, and +++, for varying degrees of growth inhibition, progressing from weak to strong.

Each sample was added to the individual media to give a concentration of 0.005% (w/v).

BS=*Bacillus subtilis*; EC=*Escherichia coli*; EA=*Enterobacter aerogenes*; SA=*Staphylococcus aureus*; LP=*Lactobacillus plantarum*.

Table 5は、鮭白子抽出物の抗菌活性に対する、分離した10画分及び2種の硫酸プロタミンの相対抗菌活性を示したものである。各画分の抗菌性は対象とする微生物で若干異なり、分子量が比較的に大きなペプチド(M. W. 4200と3800)と中程度の大きさのペプチド(2800)が抗菌性が高く、小さなペプチド(1300、900、800、650)は抗菌性を示さなかった。画分4-1と4-2は分子量を推定するためのゲルクロマトグラフィーでは大きな分子量のペプチドとして挙動したが、分離精製のためのゲルクロマトグラフィーやDNP法あるいはアルカリ分解前後のニンヒドリン発色値の比較ではかなり小さなペプチドと認められた。

以上の結果、鮭白子抽出物中には、未分解の完全構造を有するプロタミン分子は含まれておらず、

プロタミンの分解物やこれ以外の核タンパク質、細胞質タンパク質あるいはペプチドが混在し、これらの中にはプロタミンと同等あるいはそれ以上の抗菌活性を有するものがあつた。従つて、抗菌活性の発現には、ある程度の大きさのプロタミンの部分構造は必要であるが、全構造を必要としないことが明らかとなつた。従来、かなり面倒で時間のかかる方法によって抽出分離したプロタミンが食品防腐剤として使用されてきたが、複数種のタンパク質を起源とする低分子の塩基性ペプチドでも十分な抗菌性が認められるので、簡便な方法で大量に抽出した安価なペプチド調製品でも十分利用できるものと考えられる。

要 約

鮭の白子を塩酸抽出し、中和後脱塩して、塩基性ペプチド混合物を得た。この抽出物をSephadex G-25クロマトグラフィーにより分別すると大きく4つの画分に分かれ、さらにこれらをSephadex G-15, G-25, G-50を用いたゲルクロマトグラフィーによって10の画分に分けた。得られたペプチド画分についてアミノ酸分析を行い、またゲルクロマトグラフィーとDNP法による末端アミノ酸分析によって分子量測定を行った。その結果、これらのペプチドはいずれも塩基性ペプチドであるが、未分解の完全な構造を有するプロタミン分子は含まれておらず、プロタミン分解ペプチドやプロタミン以外の塩基性タンパク質あるいはペプチドが含まれていた。これらのペプチド画分の中、ゲルクロマトグラフィーで排除容量付近に溶出される画分には中程度の抗菌活性が認められたが、排除容量位置に溶出されたピークと最も遅く現れるピークとの中間に溶出された画分には抗菌性はほとんどなく、最後に溶出される画分が最も強い抗菌性を示した。これらの結果、抗菌性の発現には完全なプロタミン分子は必要なく、ある特定のアミノ酸配列をもつペプチドが抗菌性と深く関与していることが分かつた。

文 献

- 1) 安藤鋭郎、岩井浩一、山崎誠：“蛋白質化学”(赤堀四郎、水島三一郎編)、第3巻、p. 89、共立出版(1955)。
- 2) 安藤鋭郎、岩井浩一：“核酸及び核蛋白質”(江上不二夫編)、上巻、p. 454、共立出版(1951)。
- 3) Miller, B. F.: Abrams, R., Dorfman, A., Klein, M.: Science, **96**, 428 (1942)。
- 4) Islam, N. M., Motohiro, T., Kimura, T.: J. Gen. Appl. Microbiol., **33**, 481 (1987)。

- 5) Islam, N. M., Motohiro, T., Kimura, T.: J. Gen. Appl. Microbiol., **33**, 498 (1987).
- 6) Islam, N. M. Oda, H., Motohiro, T.: Nippon Suisan Gakkaishi, **53** (2), 297 (1987).
- 7) Kamel, M., Motohiro, T.: Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, **52** (10), 1843 (1986).
- 8) Wolff, R., Brignon, J.: Bull. Ste. Chim. Biol.: **36**, 1125 (1954).
- 9) Negroni, P., Fischer, L.: Rev. Soc. Argentina Biol., **20**, 487 (1944).
- 10) 元廣輝重: 食品工業、**30** (18), 20 (1987).
- 11) Pollister, A., Mirsky, A. E.: J. Gen. Physiol., **30**, 101 (1946).
- 12) Mirsky, A. E., Pollister, A.: J. Gen. Physiol., **30**, 117 (1946).
- 13) Rosen, H.: Archives of Biochemistry and Biophysics, **67**, 10 (1957).
- 14) Hirs, C. H. W., Moore: J. Biol. Chem., **219**, 623 (1956).
- 15) Porter, R. R., F. Sanger: Biochem., J., **42**, 287 (1948).
- 16) M. O. Dayhoff, "Atlas of Protein Sequence and Structure", National Biochemical Foundation, Washington D. C., VOL 5 (1972).