

シオミズツボワムシのプロテアーゼに 関する研究—I

粗酵素液中のプロティナーゼ活性の性質について

原 研治・石原 忠・荒野 拓・保田 正人

Studies on Protease of the Rotifer, *Brachionus
plicatilis*— I

Some Properties of Proteinase in the Crude Extracts

Kenji HARA, Tadashi ISHIHARA, Hiraki ARANO, and Masato YASUDA

Acid and alkaline proteinase activities were detected in an ammonium sulfate fraction (50–80%) of crude extracts from the rotifer, *Brachionus plicatilis*. Some properties of the activities in the fraction were investigated. The optimum pH was obtained at about 4.0 for acid proteinase and at about 8.0 for alkaline one. The optimum temperatures of the acid and the alkaline proteinase were 60° and 50°C, respectively, under the experimental condition. The both proteinase activities were unstable as heated at 60°C for 10 minutes. The acid proteinase activity was inhibited with 1×10^{-3} M of Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{-} , I_2 , monoiodoacetate and PCMB*. The alkaline proteinase activity was inhibited with 1×10^{-3} M of Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{-} , I_2 , NBS, DFP, TLCK and potassium permanganate.

近年、魚類種苗生産の仔魚期餌料としてシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下ワムシと略) が重要な役割を果している。通常このワムシは海産クロレラなどの微細藻類や酵母などを餌料として生産されているがワムシの消化酵素などに関する生化学的知見は全くみられない。そこで筆者らは、ワムシのもつ消化酵素を調べることは餌料栄養学的な意味のみでなく比較生化学的にも興味のある問題と考え、ワムシ抽出液中に存在する数種の加水分解酵素の活性を調べ、アミラーゼ活性、セルラーゼ活性の他に強いプロティナーゼ活性やペプチターゼ活性の存在を確認した。本報ではこれらの酵素活性のうち、プロティナーゼ活性について粗酵素液を用いてその性質を調べ、2・3の知見を得たので報告する。

実験材料および方法

材料 長崎市種苗センターで培養したワムシを網目40μのプランクトンネットで採集し、次いで混在するチグリオバスなどを網目400μのプランクトンネットで除去した。このワムシをろ過海水で充分洗浄後、生理食塩水で洗浄し遠心分離(5000rpm, 10分)で集め試料とした。

試薬 牛血清ヘモグロビン, α-N-Benzoyl-DL-Arginine-*p*-Nitroanilide (BApNA) は SIGMA 社, カゼインは MERCK 社のもの, その他の試薬は特級を使用した。

粗酵素液の調製 Fig. 1 に示した方法により調製した。すなわち0.5%塩化カリウム溶液と共にホモジナイ

* PCMB: *p*-chloromercuribezoate; NBS: N-bromosuccinimide; DFP: diisopropyl fluorophosphate; SDS: sodium dodecyl sulfate; TLCK: N-tosyl-L-lysylchloromethan;

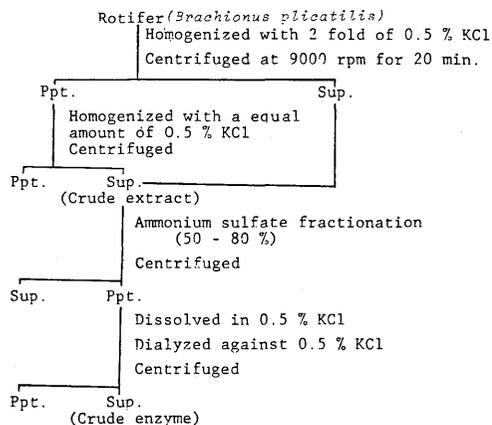


Fig. 1. Preparation of the enzyme.

ズし、遠心分離にて上清液を得た。これの50-80%飽和硫酸アンモニウム画分を集め、0.5%塩化カリウム溶液に溶解後、同液に一夜透析し生じた沈殿を除去後粗酵素液を得た。

酵素活性の測定 基質として1%熱変性ヘモグロビン0.5mlを用い、これに酢酸ナトリウム-塩酸緩衝液1.0mlと0.5mlの酵素液を加え、所定の温度で1時間反応させた後8%トリクロル酢酸2.0mlにて反応を停止した。30分後にろ過し、そのろ液を用いてLOWRYらの方法(1)によってプロティナーゼ活性を測定した。1%カゼインを基質として用いた場合は、緩衝液としてホウ砂-リン酸カリウム溶液を用い上記の方法に従った。また基質としてBAPNAを用いた場合は、緩衝液に溶解した0.1mMのBAPNA2.0mlに酵素液0.2mlを加え、37°Cで1時間反応後ERLANGERら(2)の方法に従って遊離した*p*-nitroanilideを測定した。

実験結果

硫酸アンモニウム塩析 Fig. 1の方法で得た粗抽出液を硫酸アンモニウムの各飽和度で塩析し、得られた画分について酸性およびアルカリプロティナーゼ活性を調べた。その結果、Fig. 2に示すように50%飽和画分にはいずれの活性もほとんど検出されず、50-80%飽和の画分にほとんどの活性が存在していた。以下の実験にはこの画分を用いた。

最適pH 酵素活性におよぼすpHの影響を調べFig. 3の結果を得た。すなわちpH4付近の酸性域とpH8付近のアルカリ域に最適pHをもつ二種の酵素活性を認めた。尿素変性カゼインを用いたときは酸性側の最適pHはほとんど変わらなかったが、アルカリ

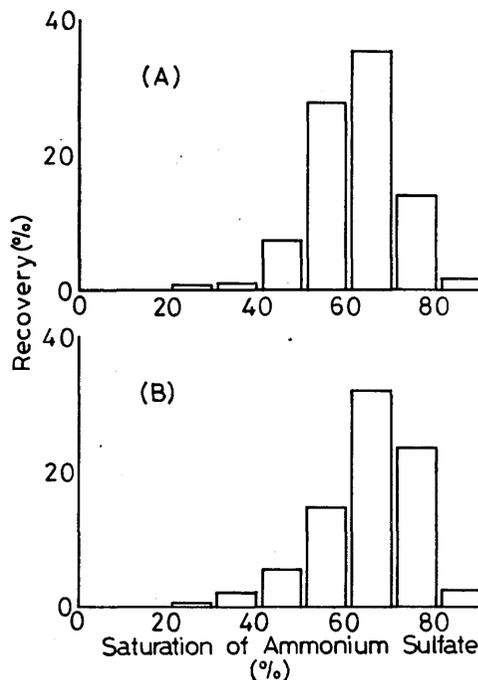


Fig. 2. Distribution of proteinase activities in ammonium sulfate fraction.

Proteinase activities were measured with heat-denatured hemoglobin or casein as substrate. The reaction mixture containing 0.5 ml of 1% substrate, 1 ml of buffer solution and 0.5 ml of the enzyme solution was incubated at 40°C for 1 hour, and then 2.0 ml of 8% trichloroacetate was added to the mixture. After standing for 40 minutes, the mixture was filtrated and the aliquot of the filtrate was used for the colorimetric determination by the method of Lowry (1).

(A) Acid proteinase activity. The reaction mixture was incubated at pH 4.0 (CH₃COONa-HCl buffer) with hemoglobin as substrate.

(B) Alkaline proteinase activity. The reaction mixture was incubated at pH 8.0 (Na₂B₄O₇-KH₂PO₄ buffer) with casein as substrate.

側のそれは中性側にシフトした。以下前者を酸性プロティナーゼ、後者をアルカリプロティナーゼと呼ぶ。またアルカリプロティナーゼとしてはトリプシン様酵素の可能性が考えられたので、トリプシンが特異的に分解する合成基質であるBAPNAを用いてその最適pHを調べた。その結果、Fig. 4に示したように酸性域ではほとんど分解されなかったが、アルカリ域ではpH8.5付近に最適pHを認めた。

pH安定性 酵素の安定性におよぼすpHの影響を

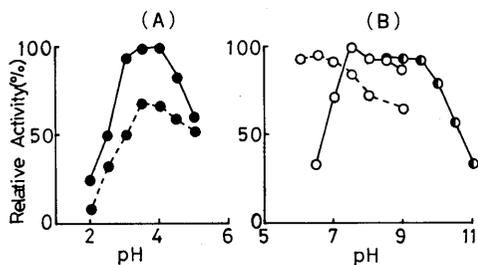


Fig. 3. Effect of pH on acid and alkaline proteinase activities.

(A) Acid proteinase activity; —, heat-denatured hemoglobin; ----, urea-denatured casein. Buffer used was $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{HCl}$.

(B) Alkaline proteinase activity; —, heat-denatured casein; ----, urea-denatured casein. Buffers used were as follows; ○, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7-\text{KH}_2\text{PO}_4$; ●, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7-\text{KCl}-\text{Na}_2\text{CO}_3$.

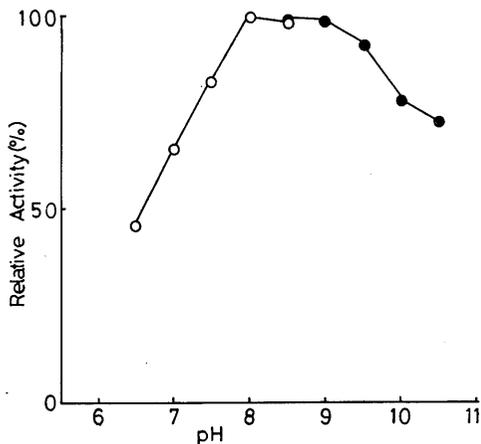


Fig. 4. Effect of pH on BApNA hydrolysis by alkaline proteinase. The reaction mixture containing 2.0 ml BApNA solution and 0.2 ml of the enzyme solution was incubated at 37°C for 1 hour. The amount of the released *p*-nitroanilide was determined by measuring the absorbance at 405 nm. Buffers used were as follows; ○, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7-\text{KH}_2\text{PO}_4$; ●, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7-\text{KCl}-\text{Na}_2\text{CO}_3$.

調べるため、1N 塩酸と1N 水酸化ナトリウムを用いて pH 調整を行なった酵素液を 37°C に2時間保温後、残存する酵素活性を測定し Fig. 5 の結果を得た。酸性プロティナーゼ活性は pH 6-8 の比較的広い範囲で安定であったがアルカリプロティナーゼは pH6 付近でのみ安定でありそれ以外の pH 域では失活が著しかった。

最適温度 プロティナーゼ活性の最適温度を調べるため、種々の温度で1時間反応させて得られた結果を

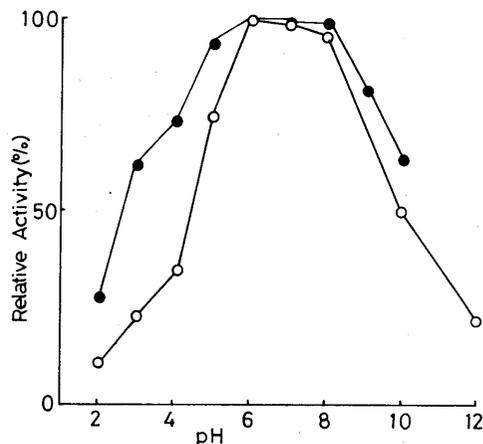


Fig. 5. pH-stability curves of acid and alkaline proteinase activities. Enzymes were preincubated in various pH values at 37°C for 2 hrs. Remaining activities were measured by the method as described in Fig. 2. ●, acid proteinase activity. ○, alkaline proteinase activity.

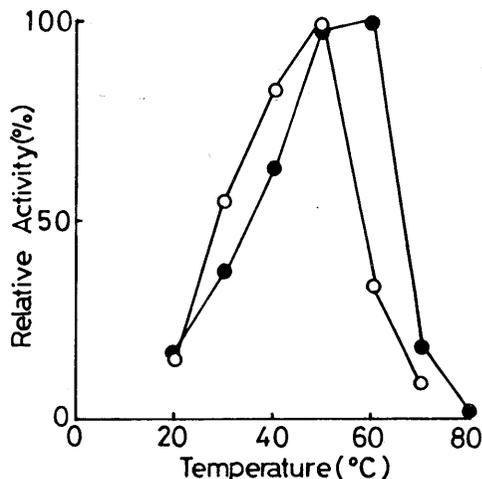


Fig. 6. Temperature-activity curves of proteinase activities. Reaction mixture was incubated at various temperature for 1 hour and the activities were measured by the method as described in Fig. 2.

Fig. 6 に示した。酸性プロティナーゼ活性は 60°C で、またアルカリプロティナーゼ活性は 50°C で最高であった。

温度安定性 酵素溶液を Fig. 7 に示す種々の条件で保温した後、残存する酵素活性を測定し酵素の安定性におよぼす温度の影響を調べた。その結果、酸性およびアルカリプロティナーゼ活性は両者共 37°C までは安定であったが、 60°C では10分間の処理で、酸性プロティナーゼ活性は最高活性の約75%が、またアルカリ

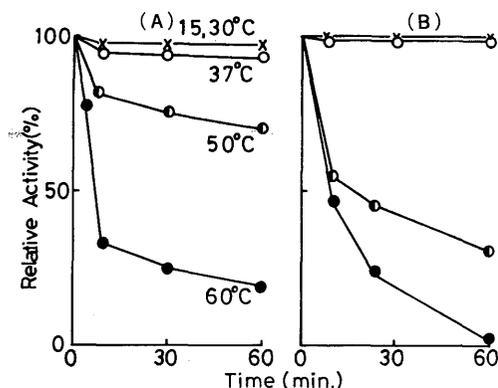


Fig. 7. Heat-stability curves of acid and alkaline proteinase activities.

Enzymes were preincubated at various temperatures for different times. Remaining activities were measured by the method as described in Fig. 2. (A), acid proteinase activity; (B), alkaline proteinase activity.

プロテイナーゼ活性は約50%が消失した。

各種試薬の影響 反応混液中に Table 1 に示すような各種の試薬を終濃度 $1 \times 10^{-3}M$ になるよう加え、酵素活性におよぼす各種試薬の影響を調べた。この結果酸性プロテイナーゼ活性は Hg^{2+} , Cu^{2+} , I_2 , Ag^+ , モノヨード酢酸, PCMB, NBS, SDS にかんりの程度で阻害され、そのうち PCMB による阻害は Table 2 に示すようにシステインの添加により完全に賦活された。一方アルカリプロテイナーゼ活性は Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , I_2 , NBS, DFP, TLCK, 過マンガン酸カリウムに強く阻害された。さらに筆者らの研究室で調製したアサクサノリのトリプシンインヒビター F1-a, F1-b にも阻害された。

考 察

水産袋形動物の一種であるシオミズツボワムシ (袋形動物門, 無吻袋虫亜門, 輪虫綱) のもつ酵素のうちプロテイナーゼ活性について若干の性質を調べた。シオミズツボワムシ抽出液中には少なくとも、酸性域に最適 pH をもつ酸性プロテイナーゼとアルカリ域に最適 pH をもつアルカリプロテイナーゼの二種のプロテイナーゼが存在していた。硫酸塩析酵素を用い両プロテイナーゼ活性の性質を調べたところ、酸性プロテイナーゼ活性の最適 pH は熱変性ヘモグロビンを基質として pH4 であり、最適温度は $60^\circ C$ であった。またこの酵素活性は pH 6-8 の間では安定であり、 Hg^{2+} , Cu^{2+} , I_2 , モノヨード酢酸, SDS, NBS, PCMB に阻害された。この PCMB による阻害はシステイン

の添加により完全に回復したことより酸性プロテイナーゼ分子中の SH 基が何らかの形で酵素活性に影響を与えていることが推察された。また NBS は主としてトリプトファンを修飾することより酵素分子中のトリプトファン残基が酵素活性に寄与していることが考えられた。しかしながら NBS はトリプトファン残基のみでなくチオール基を有するアミノ酸をも修飾する可能性も考えられ、この点に関してはさらに精製酵素を用いて検討しなければならない。pH4 付近に最適 pH をもつプロテアーゼとしてはカテプシン D(3) の可能性が考えられ、事実、温度や pH に対する影響など

Table 1. Effect of various reagents on acid and alkaline proteinase activities.

The reaction mixture containing the reagents in final concentration of $1 \times 10^{-3}M$ excepted that the PCMB was $6 \times 10^{-5}M$. The activities were measured by the method as described in Fig. 2.

| Chemicals final conc. | Relative activity (%) | |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------|
| | Acid proteinase | Alkaline proteinase |
| None | 100 | 100 |
| CaCl ₂ | 102 | 98 |
| CuCl ₂ | 46 | 17 |
| CuSO ₄ | — | 27 |
| MnCl ₂ | 97 | 90 |
| ZnCl ₂ | 85 | 92 |
| CoCl ₂ | 86 | 83 |
| FeCl ₂ | 88 | 97 |
| HgCl ₂ | 36 | 0 |
| PbCl ₂ | 103 | 92 |
| AgNO ₃ | 38 | 5 |
| I ₂ | 12 | 0 |
| Iodoacetate | 63 | 97 |
| EDTA | 102 | 98 |
| 2-Mercaptoethanol | 123 | 106 |
| Cysteine | 176 | 105 |
| PCMB | 53 | 77 |
| NBS | 34 | 0 |
| DFP | 95 | 18 |
| SDS | 16 | 98 |
| TLCK | 99 | 23 |
| TPCK* ¹ | 95 | 96 |
| PLTI F1-a (0.01%)* ² | — | 21 |
| PLTI F1-b (0.01%)* ² | — | 6 |

*¹ N-tosyl-L-phenylalanylchloromethan

*² Purple laver trypsin inhibitors were prepared by authors and each specific activity of the F1-a and F1-b was increased up to about 4000 folds.

Table 2. Effect of cysteine and PCMB on acid proteinase activity.

The reaction mixture containing the compounds in the final concentrations indicated was incubated. The activity was measured by the method as described in Fig. 2.

| Compounds | Final conc. (M) | Relative activity (%) |
|-----------------|--|-----------------------|
| None | | 100 |
| Cysteine | 1×10^{-3} | 198 |
| PCMB | 5×10^{-5} | 53 |
| Cysteine + PCMB | 1×10^{-3} 5×10^{-5} | 190 |

はマサバ筋肉カテプシン D(4)、マサバ肝臓カテプシン D(5)や牛の子宮カテプシン D(6)とよく一致していた。また Hg^{2+} や Cu^{2+} のような重金属による阻害や I_2 による阻害もマサバ肝臓カテプシン D(5)、マダコ肝臓カテプシン D(7)やウサギ筋肉カテプシン D(8)と一致していた。しかしながらこれらのカテプシン D は PCMB やモノヨード酢酸では阻害されないことやシステインでの賦活も見られないことより、シオミズツボワムシの酸性プロティナーゼはカテプシン D とは若干性質の異なるものと考えられた。

アルカリプロティナーゼ活性の最適 pH は、カゼインを基質としたとき pH8 付近にあり、最適温度は $50^{\circ}C$ であった。安定 pH は比較的狭く、また数種の化合物によって阻害された。本酵素は DFP により強く阻害されたことより、活性中心の触媒部位にセリン基を有する、いわゆるセリンプロテアーゼであると考えられた。またトリプシンの特異的阻害剤である TLCK によって強く阻害され、キモトリプシンの阻害剤である TPCK には阻害されなかったことやトリプシンの特異的な基質である BApNA を分解したことより本酵素はトリプシン様酵素であることが示唆された。さらに、本酵素は筆者らの研究室で調製したアサクサノリのトリプシンインヒビター F1-a, F1-b(9)によっても阻害された。しかしながら安定 pH の範囲が、トリプシンの場合は pH 2-3 (10)であるのに対し、本酵素の場合は pH6 付近であることや、トリプシンの場合は Ca^{2+} により安定化されるが本酵素の場合は Ca^{2+} による酵素の安定化はみられなかったことなどが異なっていた。その他本酵素も NBS に完全に阻害されたことより、この酵素分子中のトリプトファンあるいはチオール基をもったアミノ酸残基が酵素活性に寄与していることが考えられた。またヨウ素による阻害は、主

としてチロシン、ヒスチジン、システイン残基などの化学修飾のためと考えられる。しかし本研究では粗酵素を用いての研究であるため、さらに精製した酵素を用いての化学量論的な研究が必要であろう。水産生物起源の中性およびアルカリ性プロテアーゼに関しては、コイ筋肉アルカリプロテアーゼについて牧之段(11)、岩田ら(12)、オキアミプロテアーゼについて野口ら(13)、ヒゲナガエビ肝臓プロテアーゼについて村松ら(14)の報告があるが、これらのプロテアーゼとは pH や温度に対する影響に関しては類似性を示したが、PCMB その他の化合物に対する影響などについては相異点が認められた。

終りに材料を提供していただいた長崎市種苗センターに謝意を表す。

文 献

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Tall, A. L., and Randall, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.*, **193**, 256.
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N., and Cohen, W. (1961). *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271-278.
- 赤堀四郎 (1966). 酵素ハンドブック, 朝倉書店, 東京, p. 529
- 坂本政美 長崎大学大学院水産研究科, 1972年修了修士論文, (未印刷).
- 越智信雄 長崎大学大学院水産研究科, 1977年修了修士論文, (未印刷).
- Frederic, J., and Shamberber, R. J. (1970). *J. Biol. Chem.*, **246**, 1951.
- 森下達雄 (1975). 日水会秋季大会講演要旨, 428
- Suzuki, A., and Fuzimaki, M. (1968). *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 8, 975-987.
- 城島正彦 長崎大学大学院水産研究科, 1977年修了修士論文, (未印刷).
- 赤堀四郎 (1966). 酵素ハンドブック, 朝倉書店, 東京, p.509.
- Makinodan, Y., and Ikeda, S. (1969). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **35**, 15-23.
- Iwata, K., Kobashi, K., and Hase, J. (1974). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **40**(2), 189-200.
- 野口明徳・柳本正勝・梅田圭司・木村進 (1976). 農化, **50**, 415-421.
- 村松毅・垣内宏通 (1978). 日水誌, **44**(2), 171-174.