

シオミズツボワムシのプロテアーゼに 関する研究—II

数種の合成基質分解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—II

Hydrolytic Properties on Some Synthetic Substrates

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

Some properties of acid and alkaline proteinase activities in crude extract from the rotifer, *Brachionus plicatilis*, were reported in the previous paper(1). In the present paper, some properties of hydrolytic activities by the enzyme on CGT, BAA and GPA were investigated. The results of this study were summarized as follows.

1) Two kinds of CGT hydrolytic activity were detected, one was acting in acid pH range (optimum pH was 2.0) and the other was in neutral range(optimum pH was 7.5). The enzyme activity in acid pH range was very unstable and disappeared completely as exposed to room temperature at pH 2.0 for 4 hours. The enzyme activity at pH 7.5 was activated by means of preincubation at 50°~60°C for 30 minutes, and inhibited with IAA.

2) The optimum pH for BAA hydrolytic activity was about 6 and cysteine was required to activate the enzyme, which was inhibited considerably with Zn^{2+} and IAA, and partially with I_2 and PCMB.

3) GPA hydrolytic activity required cysteine too. The optimum pH was about 6 and the activity was inhibited with Zn^{2+} , I_2 and PCMB.

筆者らは前報(1)において、シオミズツボワムシ抽出液中のプロテナーゼ活性の性質を調べ報告した。今回はプロテアーゼ活性のうちCGT、BAAおよびGPA分解酵素活性について調べ、若干の知見を得たので報告する。

実験材料および方法

材料 前報(1)と同様、長崎市種苗センターで培養したシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下ワムシと略す)を網目40 μ と400 μ のプランクトンネットで採取し、充分洗浄後、遠心分離して集め試料とした。

試薬 CGTはMERCK社、BAAは半井化学薬品K.K.、GPAはMILES-YADA LTD.のものを使用し、その他試薬は特級を使用した。

粗酵素液の調製 前報(1)と同様の方法により調整した粗抽出液を用い、CGTおよびBAA分解活性の測定にはこの粗抽出液の60-80%飽和硫酸アンモニウム画分を、GPA分解活性の測定には40-70%飽和画分を用いた。

各沈殿画分を0.5%塩化カリウム溶液に溶解し同液に対し一夜透析後、生じた沈殿を除去して粗酵素液とした。

CGT分解酵素活性の測定法 0.05M CGT 0.5ml,

0.1M McIlvaine 緩衝液1.0mlに酵素液0.2mlを加え、37°Cで1時間反応後、10%トリクロル酢酸2.0mlを加え反応を停止した。40分放置後ろ過し、ろ液の中の遊離チロシンを YEMM-COCKING の方法(2)にて定量した。

BAA, GPA 分解酵素活性の測定法 0.05MのBAAあるいはGPAを0.5ml, 0.1M McIlvaine 緩衝液1.0mlに 5×10^{-3} M シス테인を0.2ml加え、37°Cで所定の時間反応後ろ過し、ろ液中の遊離アンモニアを CONWAY の微量拡散分析法(3)により測定した。

実験結果

硫酸アンモニウム塩析 前報(1)と同様、粗抽出液を硫酸アンモニウムの各飽和度で塩析し、各画分について CGT, BAA および GPA 分解活性を測定した。その結果、Table 1 に示すように CGT および BAA 分解活性は60-80%飽和画分に、GPA 分解活性は40-70%飽和画分に大部分が存在していた。以下の実験には上記の画分を用いた。

最適 pH CGT, BAA および GPA 分解活性におよぼす pH の影響を種々の pH について調べた結果を Fig. 1 に示した。CGT 分解活性 (Fig. 1(A)) は pH2.0 と7.5に最大活性が現われ、二種の酵素の存在が推察された。BAA 分解活性 (Fig. 1(B)) も pH5.5付近と pH 8 付近に最大活性が現われ、二種の酵素の存在が推察された。しかしアルカリ側の活性はシス테인を添加しなくとも同程度の活性がみられたことより、この活性は前報(1)で報告したトリプシン様酵素と考え、以下

Table 1. Distribution of CGT, BAA and GPA hydrolytic activities in ammonium sulfate fraction.

CGT hydrolytic activity was measured as follows. 0.5 ml of 0.05 M CGT, 1.0 ml of McIlvaine buffer at pH 7.5 and 0.2 ml of enzyme solution were incubated for 1 hour, and then the reaction was stopped by addition of 2.0 ml of 10 % trichloroacetate. After standing for 40 minutes, the reaction mixture was filtrated through Whatman No. 2 filter paper. The amount of tyrosin released was determined by the method of Yemm-Cocking (2). BAA and GPA hydrolytic activities were measured as follows.

0.5 ml of 0.05 M BAA (pH 5) or GPA (pH 6) in buffer solution, 1.0 ml of McIlvaine buffer, 0.1 ml of 1×10^{-2} M cystein and 0.2 ml of enzyme solution were incubated at 37° C. The mixture was filtrated as described above and the amount of ammonia released was determined by the method of Conway(3).

Ammonium sulfate saturation (%)	Relative activity (%)		
	CGT	BAA	GPA
0	100	100	100
0-30	0	0	0
30-40	0	1	0
40-50	7	0	27
50-60	25	22	30
60-70	35	33	42
70-80	30	42	2

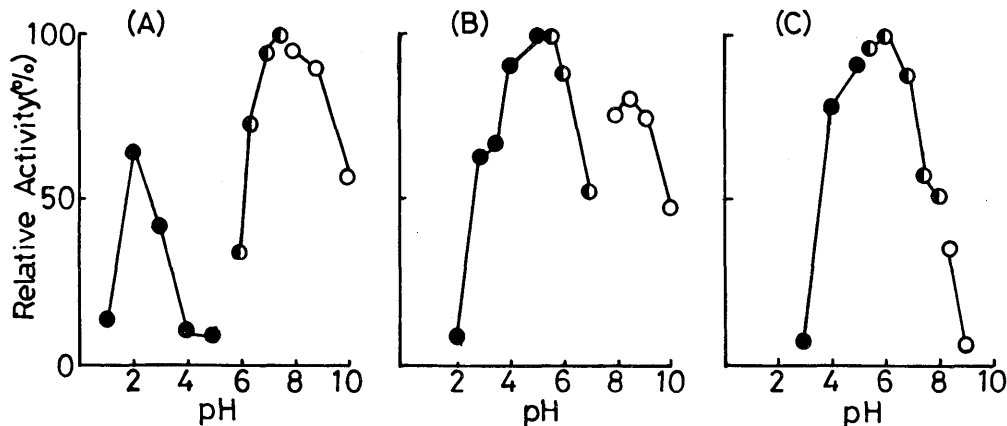


Fig. 1. Effect of pH on CGT, BAA and GPA hydrolytic activities. Each hydrolytic activity was measured as described in Table 1 in different buffer solutions. (A), CGT hydrolytic activity; (B), BAA hydrolytic activity; (C), GPA hydrolytic activity. ●, $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{HCl}$ buffer; ○, $\text{H}_3\text{BO}_3-\text{KCl}-\text{Na}_2\text{CO}_3$ buffer.

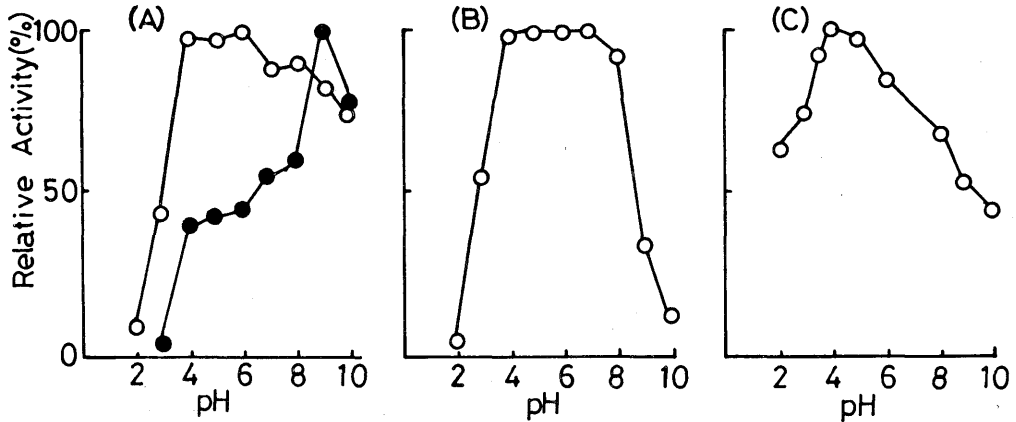


Fig. 2. pH-stability curves of CGT, BAA and GPA hydrolytic activities. Enzymes were preincubated at various pH's at 37°C for 4 hours. Remaining activities were measured as described in Table 1. (A) , CGT hydrolytic activity; ○, pH 2.0; ●, pH 7.5; (B), BAA hydrolytic activity; (C), GPA hydrolytic activity.

の実験にはシステインの添加によってのみ活性が発現する pH5.5の酵素について実験を行なった。GPA 分解活性はシステイン添加時に pH 6 付近に最大活性を示したが (Fig. 1 (C)), システイン無添加時には活性は認められなかった。

pH 安定性 三種の合成基質分解酵素活性におよぼす pH の影響を調べるため、1 N 塩酸および 1 N 水酸化ナトリウムを用いて酵素液を種々の pH に合わせ、37°C に 4 時間保温した後、残存する酵素活性をそれぞれの方法により測定し、結果を Fig. 2 に示した。最適 pH7.5 の CGT 分解活性 (Fig. 2 A) は pH 4-6 の範囲で最も安定であり、最適 pH 付近でも比較的稳定であったが pH 4 以下では失活が著しかった。一方最適 pH2.0 の CGT 分解活性 (Fig. 2 A) は pH 9 付近で最も安定であったが、それより酸性域では非常に不安定であった。また pH10 でも 25% の活性が失活し、安定 pH は非常に狭かった。またデータとしては示さなかったが、この酵素活性は粗抽出液では pH7.5 に最適 pH をもつ酵素活性より高かった。しかし塩析操作以降の活性消失が著しいため以後の実験は行なわなかった。BAA および GPA 分解活性はそれぞれ pH 4-7, pH 4 付近では安定であったがそれ以外の pH 域では失活が著しかった。

最適温度 CGT 分解活性の最適温度を調べるため、酵素反応を種々の温度で 1 時間その結果を Fig. 3 に示した。CGT 分解活性はこの条件で 50°C に最大活性を示した。

温度安定性 CGT, BAA および GPA 分解活性の

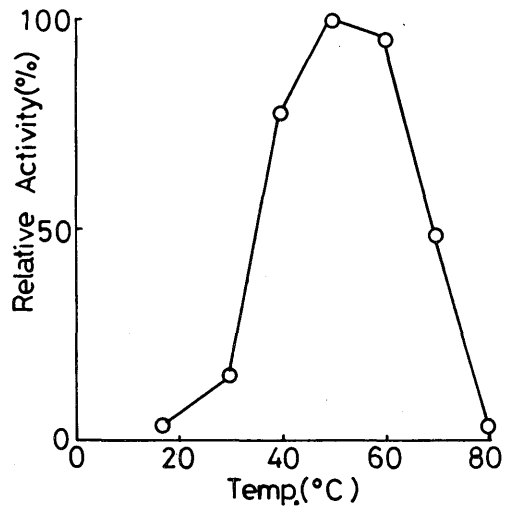


Fig. 3. Temperature-activity curves of CGT hydrolytic activity. Reaction mixture was incubated at various temperature at pH 7.5 for 1 hour.

熱に対する安定性を調べるため、酵素液を Fig. 4 に示すような種々の温度で所定の時間保温し、残存する酵素活性をそれぞれの方法で測定した結果を Fig. 4 に示した。37°C までの熱処理では三種の分解酵素とも安定であったが、CGT 分解活性 (Fig. 4 (A)) は 50°C あるいは 60°C の加熱で活性が増加した。また 70°C で 60 分間の処理に対しても約 50% の活性が残存しており熱に対しては比較的稳定と思われた。BAA 分解活性 (Fig. 4 (B)) は 50°C で 10 分間の処理でわずかに活性が増加したが、30 分間の処理では約 20% の活性が消失した。また

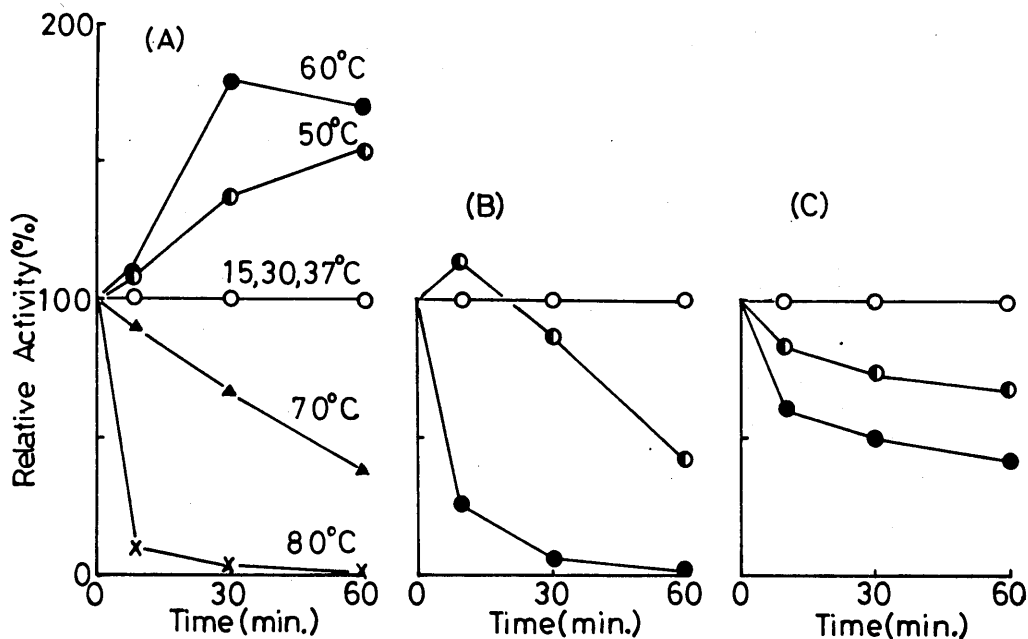


Fig. 4. Heat-stability curves of CGT, BAA and GPA hydrolytic activities. Enzymes were preincubated at various temperatures for different times. Remaining activities were measured as described in Table 1. (A), CGT hydrolytic activity; (B), BAA hydrolytic activity; (C), GPA hydrolytic activity.

60°Cで30分間の処理でほとんど完全に失活した。GPA分解活性 (Fig. 4 (C)) は60°Cで60分間の処理でも約50%の活性が残っており比較的熱に対して安定であった。

各種試薬の影響 反応混液中に Table 2 に示すような各種試薬を終濃度 $1 \times 10^{-3}M$ になるよう加え、CGT, BAA および GPA 分解活性におよぼす各種試薬の影響を調べた。この結果 CGT 分解活性は PCMB で若干阻害され、システインでやや賦活された。BAA 分解活性は Zn^{2+} , IAA で強く阻害され、また I_2 や PCMB により50%程度、 Hg^{2+} , EDTA にも若干阻害された。GPA 分解活性は Zn^{2+} , I_2 および PCMB に阻害されたが、 Fe^{2+} , Pb^{2+} ではわずかながら賦活された。

BAA および GPA 分解酵素の活性化 システイン、メルカプトエタノールおよびシアン化カリウムによる BAA および GPA 分解酵素の活性化について調べた。その結果をシステイン添加時の活性を100として Table 3 に示した。BAA および GPA 分解活性はシステインの添加なしでは全く活性を示さず、活性発現には $1 \times 10^{-4}M$ 以上のシステインが必要であった。また BAA 分解酵素はメルカプトエタノールによっても活性化されたがその程度はシステインの約50%であった。またシアン化カリウムでは両酵素とも活性化されなかった。

Table 2. Effect of various reagents on CGT, BAA and GPA hydrolytic activities. The reaction mixture containing the reagents in a final concentration of $1 \times 10^{-3}M$ excepted that the PCMB was $6 \times 10^{-3}M$. The activities were measured by the method as described in Table 1.

Chemicals ($10^{-3}M$)	Relative activity (%)		
	CGT	BAA	GPA
None	100	100	100
$HgCl_2$		78	111
$FeCl_2$		100	124
$CuCl_2$		111	121
$CaCl_2$	96	82	85
$ZnCl_2$	95	20	66
$PbCl_2$		91	122
$CoCl_2$		88	107
EDTA		82	91
Iodoacetamide	103	34	91
I_2		59	58
2-mercaptoethanol		84	97
PCMB ($6 \times 10^{-3}M$)	72	62	79
Cysteine	133		

Table 3. Activation with some substances on BAA and GPA hydrolytic activities. The reaction mixture containing the substances in the final concentrations indicated was incubated. The activities were measured by the method as described in Table 1.

Substance added	Concentration (M)	Relative activity (%)	
		BAA	GPA
Cysteine	1×10^{-3}	100	100
	1×10^{-4}	102	98
	1×10^{-5}	79	63
KCN	1×10^{-3}	3	1
Cysteine + KCN	1×10^{-3}	103	101
	1×10^{-3}		
2-Mercapto-ethanol	1×10^{-3}	53	—
None		1	0

考 察

CGT 分解酵素は pH2.0 と 7.5 付近に最大活性が現われ二種の酵素の存在が推察された。酸性域で作用する酵素活性は失活が著しく、本研究ではほとんど調べることができなかった。この酵素活性は CGT を分解することや最適 pH から推察してペプシン様酵素と考えられるが、前報(1)で報告したようにこの pH 域ではヘモグロビンに対する作用は極めて弱かった。pH7.5 に最適 pH を示す酵素は 50°C あるいは 60°C で 30 分間の処理で活性はかなり増大した。この原因としてはチモーゲンの活性化、インヒビターの失活および高次構造の変化などが考えられるがこの点に関しては今後の研究を待たねばならない。CGT を分解する酵素としてはカテプシン A が考えられ、システインや PCMB に対する影響はカテプシン A の性質(4)と類似していたが、IAA に阻害されないことや最適 pH などが異なっていた。カルボキシペプチダーゼ A も CGT を分解するが、その活性化にはシステインが必要なことや IAA に阻害されること (5, 6, 7) が本酵素とは異なっていた。

BAA 分解酵素は活性発現に 1×10^{-4} M 以上のシステインが必要であり、最適 pH は 5 付近であった。安定 pH は 4 - 7 の範囲にあり熱処理では 50°C までは安定であったが 60°C では失活が著しかった。また Zn^{2+} , IAA に強く阻害され、 I_2 , PCMB, ジチオスレイトールにも若干阻害された。PCMB とジチオスレイトールによる阻害は矛盾していると考えられるがマダコ肝臓

中のカテプシン D について森下ら(8)が同様の報告をしている。この BAA 分解酵素は、その性質よりカテプシン B(4)と考えられ、さらに pH 5 付近で BApNA を分解しなかったことよりカテプシン B₂ (9, 10)と考えられた。トリプシンも BAA を分解するが先にも述べたように活性化にシステインを全く必要とせず、また PCMB や IAA にも影響されないことより本酵素はトリプシンとは異なる酵素と考えられる。

GPA 分解酵素も活性化にシステインが不可欠であったがシアン化カリウムでは活性化されなかった。最適 pH は 6 付近にあり、熱に対して比較的安定であった。また Zn^{2+} , I_2 に強く阻害され、かつ PCMB や Ca^{2+} にも若干阻害された。システインの存在下で GPA を分解する酵素としてはカプシン C(11)が考えられ、本酵素の最適 pH や Zn^{2+} , IAA による阻害はカテプシン C の性質と一致していた。しかしカテプシン C はシステインのみでなくシアン化カリウムでも活性化されることや、PCMB には全く影響をうけない点で本酵素と異なっている。他に GPA を分解する酵素としてはキモトリプシンが知られているが、この場合最適 pH は 8 付近にあり、かつ活性化にはシステインを必要としない点で本酵素と異なる。

終わ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

- (1) 原研治・石原忠・荒野拓・保田正人 (1979) 本誌, **46**, 31~35
- (2) Yemm, E. M., and Cocking, E. C., (1955). *Analyst.*, **80**, 209-213
- (3) Johnston, R. B., Mycec, M. J., and Fruton, J. S., (1950). *J. Biol. Chem.*, **185**, 129
- (4) 赤堀四郎 (1966). 酵素ハンドブック, 朝倉書店, 東京, P 516
- (5) Fruton, J. S., and Bergman, M., (1941). *J. Biol. Chem.*, **138**, 19-27
- (6) Fruton, J. S., and Bergman, M., (1941). *J. Biol. Chem.*, **141**, 247-262
- (7) Greenbaum, L. M., and Sherman, R., (1962). *J. Biol. Chem.*, **237**, 1082-1085
- (8) 森下達雄 (1976). 日水会秋季大会講演要旨, 429
- (9) Barret, A. J., and Dingle, J. T., (1971). "Tissue Proteinase", ed. by Barret, A. J., and Dingle, J. T., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, p. ix.

- (10) Otto, K., (1971) . "Tissue Proteinase", ed. by Barret, A. J., and Dingle, J. T., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, p. 1
- (11) Fruton, J. S., and Bergman, M., (1939). *J. Biol. Chem.*, **130**, 19-27