

ミミズ (*Lumbricus rubellus*) 細胞中に発見 されたきわめて安定な線溶酸素(その1) — 存在と性質, 安定性 —

中島 伸佳, 田谷 直俊*, 津島 弘文**, 須見 洋行

要 約:

7年間室温にて放置し, 自己消化・分解により醤油様に変化した乾燥日本産シマミミズ(*Lumbricus rubellus*)の生理食塩水抽出物中で, 安定に酵素活性を保持していた新規な血栓溶解酵素を, SDS-電気泳動的に均一な状態に単離精製した。本酵素は分子量 35,400 ± 500 のモノマー蛋白質であり, カゼイン, フィブリンをはじめ, トロンピンやカリクレインのクロモザイム基質(合成アミド基質)を加水分解する強い活性を有していた。また, 本酵素はトリプシンインヒビターなどで阻害されるセリンプロテアーゼの一種であった。

本酵素のトロンピンの合成基質の加水分解反応に対する至適pHは9.0～11付近であり, 50℃, 20minの熱処理においても安定であったが, 60℃, 20minでは, ほぼ50%の活性が失活した。本酵素はエラスターゼ活性を有しないが, 精製酵素蛋白のN末端付近のアミノ酸配列は, ヒト及びブタ由来のエラスターゼのN末端付近の一次構造と類似していることが確認された。また, 本抽出液中には少なくとも3種類の線溶活性を有する酵素蛋白が存在することが, Zymographyと免疫拡散法により確認され, 本精製酵素蛋白は新鮮なミミズホモジネートより単離した6種類の酵素画分の中で, F-III-1と名付けた蛋白成分と一致した。

はじめに:

ミミズは数千年前より中国をはじめとした諸国で医薬品として用いられている。本邦でも“地龍”という名称で記載がある。また, 中国の最近の漢方書¹⁾には種々の血栓性疾患に対して用いられるように書かれているが, ほとんどその研究はなされていない。

最近, 美原らにより, ミミズ(*Lumbricus rubellus*)細胞中に強い血栓溶解活性が確認され, その線溶酸素の臨床的応用が報告された。²⁾

今回, 我々は, ミミズ生理食塩水抽出物中に, 長期

間安定に活性を保持していた強い活性を有する新規な血栓溶解酵素を, はじめて単離精製し, 酵素化学的性質を明らかにしたので報告する。

実験材料と方法:

S-2238などのクロモザイム基質(合成アミド基質)は, Kabi社製のものを用いた。フィブリンノーゲンはSigma製, 牛トロンピンは持田製薬製を用いた。

酵素活性は, 0.25 μmolのクロモザイム基質, 0.50 μmolのTris-HCl buffer (pH 9.0), 及び適量の酵素液を含む反応液1 ml 中で, 37℃において, 生成するp-ニトロアニリンの405 nmにおける吸収の増大に基づき, 分光光学的に算出した。³⁾ 酵素活性1 unitは, 1 min間あたりに1 μmolの基質を生成物に変換しうる酵素量とした。比活性は, 1 mgの酵素蛋白あたりのunit数を示した。

蛋白質はLowry⁴⁾の方法により牛血清アルブミン(Sigma)を標準物として算出した。

フィブリン及びカゼインに対する加水分解活性は既報の方法⁵⁾により行った。

酵素蛋白の純度は, SDS-電気泳動法⁶⁾により検定し, 分子量は, 標準蛋白質を用いてSDS-電気泳動及びHPLCによるゲル濾過法により測定した。

実験材料である日本産シマミミズ(*Lumbricus rubellus*)は, 宮崎医科大学動物実験施設より排出される有機性廃棄物により飼育される1 kg(約20,000匹)を集め, 洗浄後, 純水で消化管内の糞土を排出させ, ウルトラホモジナイザーを用いて生理食塩水中でホモジナイズした抽出物の一部(50 ml)をNaN₃存在下, 7年間, 室温にて放置し, 自己消化・分解の末, 醤油様に変化したものを粗酵素液とした。

本酵素の精製は, 7年間, 室温にて保存されたミミズ細胞生理食塩水抽出物を, 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) 中で, 0～4℃の条件下において, Bz-L-Arg-pNAを基質として各種のカラムクロ

* タカノフーズ(株)研究所 ** 川崎医科大学, 衛生学教室

マトグラフィーにより行った。

実験結果と考察；

(酵素の単離・精製)

7年間、室温にて放置した日本産シマミミズ生理食塩水抽出物 50 ml を原料として、10mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) で平衡化した Sephacryl S-200 (4×100 cm) column によりゲル濾過を行い、Bz-L-Arg-pNA を基質とした活性画分を限外濾過膜 (Amicon PM-10) により濃縮した。

次に、DEAE-Toyopearl 650M (2×20 cm) アニオン交換クロマトグラフィーにより buffer 中の KCl 濃度を 0~0.3M に変化させ、酵素蛋白を溶出させた。さらに、得られた酵素画分を Mono Q (0.5×5 cm) column を用い、高速クロマトグラフィーにより SDS-電気泳動的に均一な状態に精製した。

原料 50ml の抽出液中には 125mg の蛋白質が含まれ、本酵素が最もよく作用する S-2238 クロモザイム基質に対する活性は 54units であったが、精製酵素の蛋白質量は 0.16mg、活性は 17units、比活性は 106 であった。従って、精製倍率は 250 倍、収量は 32% であった。

ミミズ抽出液 (粗酵素) と精製酵素のフィブリン平板法⁵⁾ によるフィブリン溶解活性を Fig. 1 に示しているように、7年間室温にて安定に活性を保持していた新規の血栓溶解酵素のひとつを精製することが可能であった。

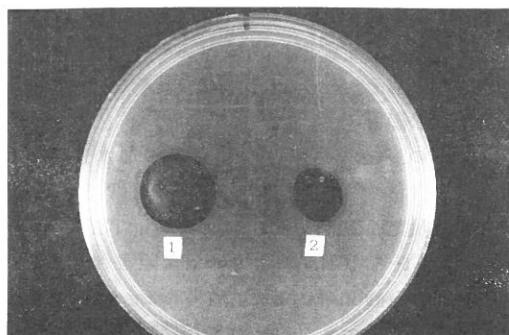


Fig. 1 Zymography of *Lumbricus rubellus* extract and the purified enzyme.

Lumbricus rubellus extract (1; 13 μ g protein) and the purified enzyme

(2; 1 μ g protein, S.A.=106) were separately added on the fibrin plate.⁵⁾

The fibrinolytic activity was measured after the incubation for 1 hr at 37 $^{\circ}$ C.

(基礎的性質)

後述するように、本酵素が最も高い特異性を示す基質である S-2238、クロモザイム基質に対する加水分解反応の至適 pH は、37 $^{\circ}$ C において 9~11 付近である。また、20 min 間室温においては pH 5 から 11 までのいずれの pH においても安定に活性を保持していた。

また、本酵素反応は 60 $^{\circ}$ C が至適温度であるが、それ以上の高温下では急激に失活する。pH 9 における 20 min 間の耐熱性を調べた結果、50 $^{\circ}$ C までは 100% 活性を保持しているが、60 $^{\circ}$ C、20 min 間の処理では約 50% の失活が認められた。

本酵素の加水分解反応に対する一般的性質は、Fig. 2 の A~D に示す通りである。

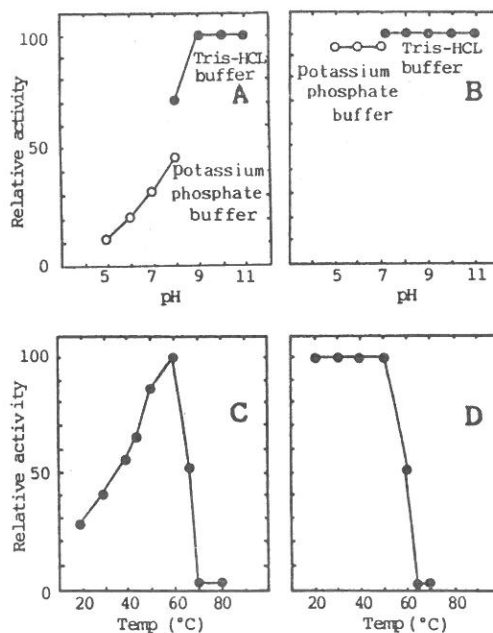


Fig. 2 PH, temperature optimum and stability of the purified enzyme.

A ; 0.2 μ g of the enzyme was assayed with various pH at 37 $^{\circ}$ C in the standard reaction mixture described in the text.

B ; the enzyme activity was assayed after the incubation with various pH for 20 min at 25 $^{\circ}$ C.

C ; the enzyme activity was assayed at various temperature.

D ; the enzyme activity was assayed after incubation at various temperature for 20 min in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 9.0).

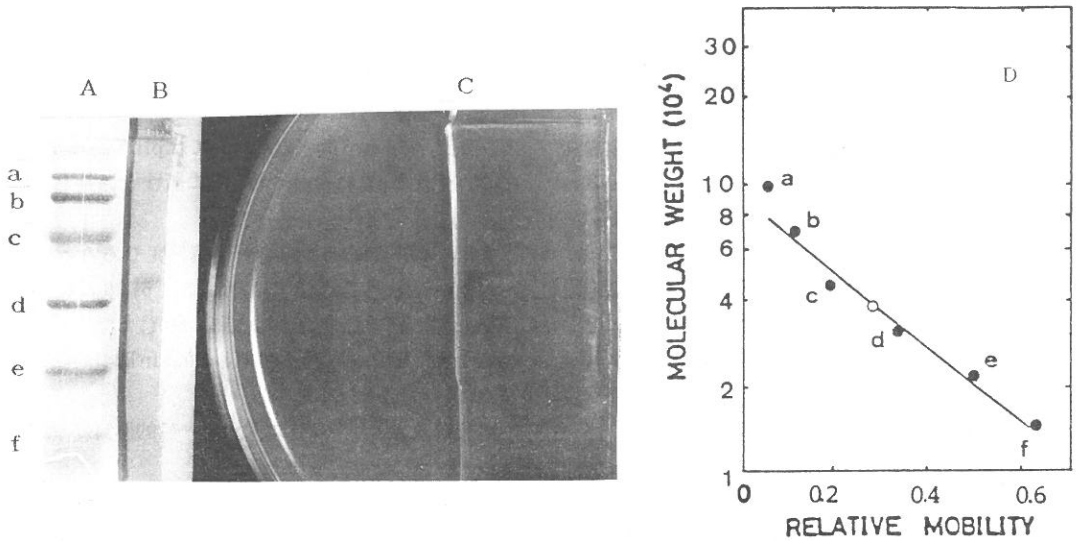


Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme.

A, marker proteins for molecular weight determination (Pharmacia) :a, phosphorylase b (M. W. 94,000) ; b, bovine serum albumin (M. W. 68,000) ; c, ovalbumin (M. W. 43,000) ; d, carbonic anhydrase (M. W. 30,000) ; e, soybean trypsin inhibitor (M. W. 20,000) ; and f, α -lactalbumin (M. W. 14,000).

B, a final preparation of the enzyme ($10\mu\text{g}$).

C, zymography of the purified enzyme on a fibrin plate⁵⁾.

D, relative mobility was plotted against subunit molecular weight in a semilogarithmic scale for the molecular weight estimation. The position of the enzyme is shown by an open circle.

(分子量)

SDS-電気泳動法の結果とアクリルアミドゲル中で行ったZymographyの結果をFig. 3に示す。標準蛋白質との移動度の比較より、本酵素の分子量は $35,500 \pm 500$ と算出され、SDS処理液中中の2-メルカプトエタノールの有無においては、電気泳動パターンに変化はみられなかった。

また、Fig. 4に示すように、ゲル浴過での精製酵素蛋白の分子量も、 $35,000 \pm 500$ と算出された。従って、本酵素は単一ポリペプチド鎖からなるモノマー蛋白質であると考えられる。

(基質特異性)

本酵素は、カゼイン、フィブリンなどの高分子蛋白質を効率よく加水分解するが、Table-Iに示すように各種の合成アミドペプチドも良好な基質となりえた。

本酵素は、トロンビンのクロモザイム基質(S-2238, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA)やカリクレインの合成基質(S-2266, H-D-Val-Leu-Arg-pNA)に最もよく作用する。さらに、組織プラスミノゲンアクチペーター、ウロキナーゼ及びプラスミンの合成アミドペプチドも基質となり、標準反応条件下で、トリプシ

ン様酵素の合成基質であるBz-L-Arg-pNAにもわずかに作用した。また、エラスターゼの合成基質には作用しなかった。

本精製酵素の基質特異性は、新鮮なミミズ抽出物より単離した酵素(現在、研究中)⁹⁾の6画分の中で“F-III-1”と名付けた精製酵素のそれと一致しており、現在、それらとの一次構造の比較を行っている。

(阻害剤の影響)

本酵素のS-2238クロモザイム基質の加水分解反応に対する各種の阻害剤の影響を検討した(Table-II)。

本酵素反応はSBTI, BPTI, Aprotinin, TLCK, ϵ -ACA及びt-AMCHAにより顕著に阻害されたが、TPCKやNeguvonによる反応阻害はほとんどみられなかった。また、エラスターゼの阻害剤であるElastatinalによる阻害作用もみられなかった。

本酵素は、反応に対する阻害剤の影響から考えて、トリプシン様のセリンプロテアーゼの一種であると思われる。

(N末端付近のアミノ酸配列)

精製酵素の自動エドマン法によるN末端アミノ酸付近の一部構造を解析した結果Fig. 5に示すようにヒト

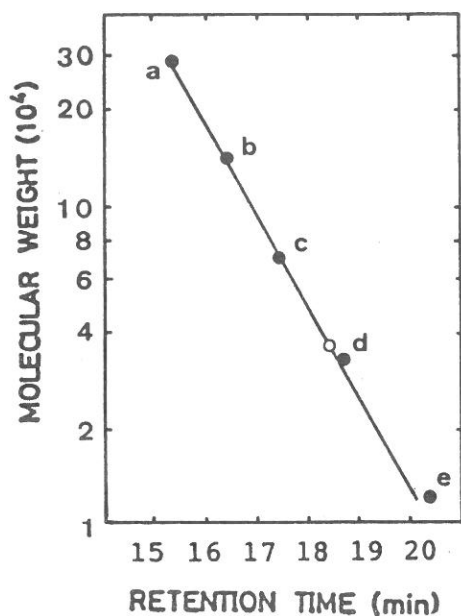


Fig. 4 The molecular weight of the enzyme was measured by high performance liquid chromatography with an Asahipak GS-520 column (0.75 × 60 cm) (Asahi Kasei Co.,). Retention time was plotted against molecular weight in semilogarithmic scale. The position of the purified enzyme is shown by an open circle.

The standard proteins (Oriental Yeast Co.,) used were: a, glutamate dehydrogenase (M.W. 290,000); b, lactate dehydrogenase (M.W.142,000); c, enolase (M.W. 70,000); d, adenylate Kinase (M.W. 32,000); and e, cytochrome c (M.W.12,400).

Table I Substrate specificity of the purified enzyme

substrate	Relative activity (%)
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	100
H-D-Val-Leu-Arg-pNA	100
H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	50
Pyro-Glu-Gly-Arg-pNA	37.5
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	32.5
Bz-L-Arg-pNA	0.8
Bz-L-Tyr-pNA	0
pyro-Glu-Pro-Val-pNA	0
MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA	0
Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	0

Various substrates (0.25 μ mol/ml) was incubated with the purified enzyme (0.2 μ g) in the standard reaction conditions described in the text.

Table II Effect of inhibitors on the purified enzyme.

Inhibitors	Concent.	Relative activity (%)
none	—	100
SBTI ^{a)}	0.01 mg/ml	0
	0.001 mg/ml	0.3
BPTI ^{b)}	0.01 mg/ml	0
	0.001 mg/ml	2.8
Aprotinin	0.01 mg/ml	0
	0.001 mg/ml	0
TPCK ^{c)}	1 mM	54
TLCK ^{d)}	1 mM	0
	0.1 mM	36
Neguvon ^{e)}	1 mM	63
ϵ -ACA ^{f)}	1 mM	0
	0.1 mM	34
t-AMCHA ^{g)}	1 mM	0
	0.1 mM	3.3
Elastatinal	0.1 mg/ml	74

a) SBTI : Soybean trypsin inhibitor

b) BPTI : Beef pancreas trypsin inhibitor

c) TPCK : Tosyl-phenylalanyl-chloromethylketose

d) TLCK : Tosyl-lysyl-chloromethylketose

e) Neguvon : 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl-0,0-dimethylphosphate

f) ϵ -ACA : ϵ -amino caproic acid

g) t-AMCHA : trans-4-aminomethylcyclohexane carboxylic acid

The enzyme activity was assayed after the incubation of the purified enzyme (0.2 μ g) with various inhibitors for 20 min at 25°C in 0.05M Tris-HCl buffer (pH 9.0).

及び、ブタ由来のエラスターゼのN末付近の一次構造と類似したアミノ酸配列を有することが確認された。

本酵素は、エラスターゼ活性を示さず、また、エラスチンなどのエラスターゼ反応阻害剤の影響を受けないが、エラスターゼのN末端アミノ酸配列と本酵素のそれ(15個のアミノ酸)とが60%以上の類似性(Homology)を有することは興味深いことである。⁷⁾

(考察)

7年間もの長期間、室温中に保存され、醬油様に変化したミミズ細胞生理食塩水抽出液中で、きわめて安定にその酵素活性を保持していた本酵素は、カゼイン、フィブリンなどの高分子蛋白質や、トロンビンのクロモザイム基質をはじめとして、各種のクロモザイム基質の加水分解を触媒するトリプシン様のセリンプロテアーゼの一種であった。

3種類の血栓溶解活性を有するミミズ細胞由来の蛋白質分解酵素が長期間、室温にて安定に強い活性を保持していたことが確認された。

現在、新鮮なミミズ細胞抽出液より単離精製した6種類の蛋白質分解酵素の分子構造と触媒機能について、詳細な研究を行っている。

謝 辞

アミノ酸配列の決定と一次構造のホモロジー検索に関して御協力頂きました、大阪大学産業科学研究所、食品化学研究部門、谷沢克行博士に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 江蘇新医学院：中葯大辞典下巻，上海：上海科学技術院，p. 2111 (1980)
- 2) S. Park, K. C. Kye, M. Lee, H. Sumi, and H. Mihara, *Thromb Haemostas* 62(1), 545, (1989)
- 3) G. Claeson, P. Friberger, M. Knos, and E. Eriksson, *Haemostasis*, 7, 109 (1941)
- 4) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 5) T. Astrup, and S. Mullertz, *Archs. Biochem. Biophys.*, 40, 346 (1952)
- 6) U. K. Laemmli, *Nature*, 227, 680 (1970)
- 7) M. O. Dayhoff, "Atlas of Protein Sequence and Structure", National Biomedical Foundation, Washington D.C., Vol. 5 (1972)
- 8) O. Ouchterlony : Handbook of Experimental Immunology, p.655-659, Weir DM (ed) Blackwell Scientific. (1967)
- 9) 美原 恒, 須見洋行, 水本英昭, 米田智幸, 池田隆造, 山本貴敏, 津島弘文, 丸山真杉, みみずの線溶酵素, 立山シンポジウム, III, 70 (1986)

平成3年3月14日受付

平成3年4月26日受理