

ミミズ (*Lumbricus rubellus*) 細胞中に発見された きわめて安定な線溶酵素 (その2)

—単離・精製と酵素化学的性質—

中島伸佳, 田谷直俊*, 美原 恒**, 須見洋行

要 約

新鮮なミミズ (*Lumbricus rubellus*) 細胞中より, 6種類の新規な線溶酵素をポリアクリルアミド電気泳動的に均一に単離・純化した。これらの精製酵素蛋白は, フィブリン, カゼインなどの高分子蛋白質を加水分解する強い酵素活性と, 各種の合成アミド基質 (クロモザイム基質) を分解する活性を保持していた。

精製酵素の酵素活性は, 幅広い至適pH範囲 (pH 9 ~ 11) を持ち, 少なくとも1年間以上, 室温条件下で安定であった。また50℃, 30分間の加熱では活性が保持されており, 比較的熱に安定な, セリンプロテアーゼであると考えられた。ミミズ細胞中での本酵素の分布, 並びに精製酵素の基質特異性, 阻害剤の影響などをはじめとした酵素化学的性質を解明した。

はじめに

ミミズは数千年前より中国をはじめ極東の諸国で医療に用いられてきた。本邦でも“地龍”という名称で漢方に記載がある。またニュージーランドの原住民がミミズを食用としている例もあり, 韓国ではミミズエキスと呼ばれる, みみずをすりつぶした溶液が健康食品として毎日飲用され, 最近, 保健薬として認可された事実が知られている。

実際, 生きたミミズの85%は水分であるが乾燥ミミズの50%から60%が蛋白質であることも知られており, 蛋白源としても, 充分利用価値があると思われる。

一方, 近年, パルプ工場, 食品工業, あるいは畜産業などから排出される有機性廃棄物を糞ミミズの種類である *Lumbricus rubellus* を用いて処理する方策がとられており, ミミズの利用法が注目されている。¹⁾

最近, 我々は, 室温条件下で, 自己消化・分解が進行し, 醬油様に変化した, ミミズの生理食塩水抽出液中で, 7年間以上もの長期間, 活性を保持していた蛋白分解酵素を発見し, その一蛋白成分の単離精製に成功したので, 酵素化学的性質を中心に報告した。²⁾

本稿では, 新鮮なミミズ細胞中に存在する線溶酵素の単離・純化方法を確立し, その種類や性質について検討を加えたので, 基質特異性をはじめとした酵素化学的性質について得られた知見を報告する。

実験材料と方法

実験材料として用いたミミズ粉末は, 以下のものを出発材料とした。すなわち, 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ているみみず (*Lumbricus rubellus*) 1 kg (約20,000匹) を集め, よく洗浄して泥を落とし, 一昼夜, 純水中に放置し, 消化管内の糞土を十分排泄させた後, ウルトラホモキサー (日本精機) にてホモジネートを調製し, これを凍結乾燥により粉末にした。このミミズ粉末に10倍量の生理食塩水を加え, 2日間のインキュベーションを行った後の上清を粗酵素液として用いた。

本酵素の単離・精製は, 0~4℃の条件下において, 各種のカラムクロマトグラフィーにより行った。

酵素活性の測定は, 前報²⁾に示した通り, クロモザイム基質を用いる分光光学的方法, 及び, 人工血栓 (フィブリン) 平板による方法により実施した。

精製酵素蛋白の純度検定は, Davis の電流流動法に従った。³⁾

酵素活性, 並びに, 比活性の表示, 蛋白質の測定方法等も, 前報²⁾の通りである。

ただし, 分光光学的方法に基づく酵素活性は, pH 7.2 の0.1M potassium phosphate buffer を用いて, 標準条件下で実施した。また, 精製酵素標品の蛋白量 (mg) は, 乾燥重量 (dry weight) で表示した。

実験結果と考察

(みみず細胞の線溶酵素活性)

Fig. 1 に示すように, ミミズを切断し, フィブリン平板上におくと, 咽頭部, 咀囊, 砂囊および腸管の前3分の1から分泌された線溶活性が観察された。さらに, ミ

*タカノフーズ (株) 研究所 **宮崎医科大, 生理学教室

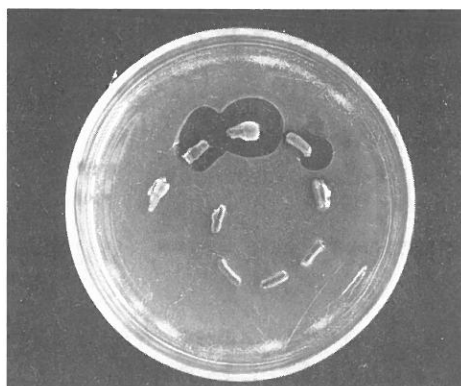


Fig.1 Fibrinolytic activity of *Isombricus rubellus*

ミズを皮, 体液および消化管部分に分けて線溶活性を測定すると, 体液および消化管部分に活性がみられた。

(線溶酵素の精製・純化)

前述したミミズ粉末の生理食塩水抽出液を室温にて, 2日間インキュベーションを行ない, 本酵素の前駆物質の自己消化による活性の発現を生じせしめ,¹⁾その遠心分離上清を出発原料とした。まず, この上清について硫酸分画により濃縮, 透析を行った後, Sephacryl S-200カラムクロマトグラフィーによるゲルろ過を行い, 得られた蛋白分画について DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー (1.6×25cm) により, 10mM の Tris-HCl buffer (pH 8.0) を溶媒として, 溶解させた NaCl 濃度を 0 から 0.5M まで変化させ, 酵素蛋白のグラジェント溶出を行った。

Fig. 2 に示すごとくカゼイン分解では 4 つのピークがみられ, このカゼイン分解能のピークと一致して, フィブリン分解活性も認められた。蛋白収量からこれらを, 3 画分 (F-I, F-II 及び F-III) に分け, それぞれについて以下の精製を行った。

F-I 分画については, 再び DEAE-セルロースクロマトグラフィーを同条件下で行うと, さらに 3 つの分画に分かれた。この 3 つの分画について, それぞれ Sephadex G-75 によるゲルろ過を行い, Davis-電気泳動法により単一のバンドを示す状態に純化した (Fig. 3)。これらの 3 種の精製酵素を, F-I-0, F-I-1, 及び F-I-2 と命名した。

F-II 分画に対しては, HW 55 によるイオン交換を同様に行った後, さらに ACH-Sephrose によるアフィニティークロマトグラフィー, 及び Sephadex G-75 によるゲルろ過クロマトグラフィーにより, Davis-電気泳動で均一な状態に精製し, F-II 純化標品とした

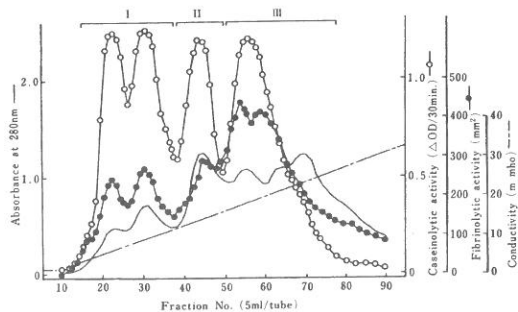


Fig. 2 Ion Exchange Chromatography on DEAE Cellulose of the enzyme fraction obtained by Gel Filtration on Sephacryl S200
Column size : 1.6×25cm
Buffer ; Liner gradient of 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0~0.5M NaCl
Flow rate ; 20 ml/hr

— : OD 280nm における吸光度, ○— : カゼイン分解活性, —●— : 標準フィブリン平板における溶解面積 (mm²), --- : NaCl 加 10 mmol/l トリス-塩酸緩衝液 pH 8.0 の電導度 (m mho)

(Fig. 3)。

また, F-III 分画は, Benzamidine - Sepharose によるアフィニティークロマトグラフィーを行った後, トヨパール HW55 によるイオン交換により精製した結果, さらに 2 つの分画にわかれ, それぞれを Sephadex G-75 によりゲルろ過を行い, Davis-電気泳動法により, それぞれ単一のバンド (Fig. 3) を示す純化酵素標品を得た。それぞれの精製酵素を F-III-1 及び F-III-2 と命名した。

この計 6 分画に分けられたミミズ細胞由来の精製酵素標品 (F-I-0, F-I-1, F-I-2, F-II, F-III-1 及び F-III-2) について, 以下の実験を行い, 酵素化学的性質等を解析した。

(精製酵素の基礎的性質)

前報²⁾でも述べた様に, 6 種類の精製酵素のすべてにおいて, クロモザイム基質 (S-2238) 及びフィブリンに対する加水分解反応の至適 pH は, 9~11 付近であり, pH 5~11 (室温, 20min) のいずれの pH 域においても安定であった。また, 反応の至適温度は, フィブリンに対しては 40℃ 付近, クロモザイム基質に対しては 50~60℃ であり, 50℃, 20min の熱処理では, 安定に活性を保持し, 60℃ 以上では, 急激な失活がみられた。

本酵素は, 幅広い至適 pH 域 (pH 9~11) を持つアルカリプロテアーゼであり, 広範囲の pH 条件下で安

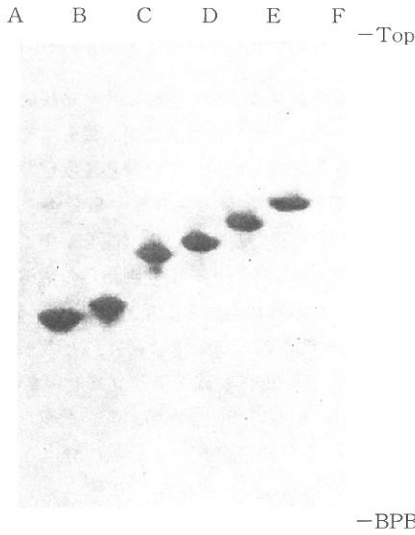


Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzymes³⁾.
A. F-III-2, 10 μ g of protein; B. F-III-1; C. F-II; D. F-I-2; E. F-I-1; F. F-I-0.

定であった。また、50°C程度までの耐熱性を有していた。
(精製酵素の安定性)

粗酵素(乾燥ミミズ粉末)を含め、精製酵素標品、F-III-1, F-II及びF-I-1について、それぞれ1mg (dry weight)/mlの濃度で、0.02%のNaNO₂を添加した50mM potassium phosphate buffer (pH7.2)中で、室温条件下(25°C)において放置し、残存活性の

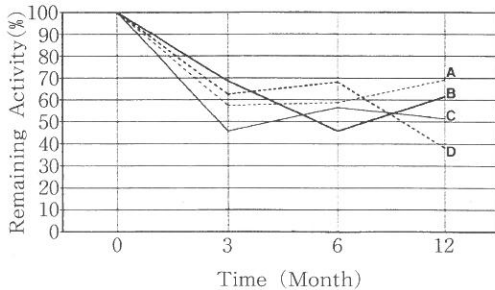


Fig. 4 Stability of the enzymes from *Lumbricus rubellus* extract.

The fibrinolytic activity was measured on fibrin plate²⁾

One mg/ml of A, F-III-1; B, F-II; C, F-I-0; D, dry extract in 10mM potassium phosphate (pH7.2) with 0.02% NaNO₂ were separately stand for various periods.

変化を検討した。

フィブリン平板法によりフィブリンの直接溶解能を検定した結果、線溶活性はFig. 4に示すように、室温放置後3ヶ月間においては、残存活性の減少がみられたが、その後、少なくとも1年間は、どの酵素分画においても急激な失活はみられず、安定に活性を保持していた。

従って、本酵素は60°C以上の加熱、もしくは、別報で論ずるような自己消化による分子構造等の変化に起因する酵素活性の失活⁵⁾を除いて、室温条件下では、比較的安定なプロテアーゼであると考えられる。

(基質特異性)

新鮮なミミズ乾燥粉末より純化された6種類の精製酵素について、標準フィブリン平板法及び、各種のクロモザイム基質(合成ペプチドアミド基質)に対する反応性を解析した。

Fig. 5に示すように線溶活性を発現させたフィブリン平板上での溶解斑は、いずれの酵素蛋白分画にも確認され、非常に強い酵素活性を有していると考えられた(F-III-2及びF-III-1については、純化酵素0.1 μ g, F-II~F-I-0に関しては、1 μ gを反応に供し、37°C, 2hr後の線溶活性を解析した。これらの

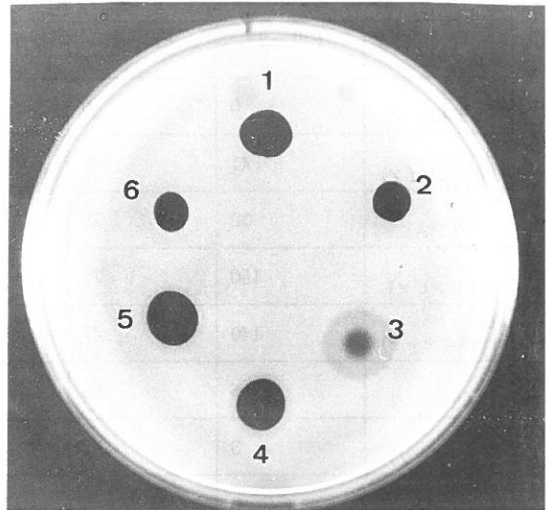


Fig. 5 Fibrinolytic activity of the purified enzymes.

The purified enzymes were separately added on the fibrin plate²⁾.

1, F-III-2, 0.1 μ g protein; 2, F-III-1, 0.1 μ g of protein; 3, F-II, 1 μ g protein; 4, F-I-2, 1 μ g protein; 5, F-I-1, 1 μ g protein; 6, F-I-0, 1 μ g protein.

The fibrinolytic activity was measured after the incubation for 2 hrs at 37°C.

6種類の精製酵素の活性を定量的に算出すると、F-III-2よりF-I-0の標品において、それぞれ620カゼインユニット/mg酵素蛋白(CU/mg)、350、20、59、68、及び30であった。酵素活性はF-III-2分画が最も強い値(カゼインユニット)を示した。なお、本酵素にはプラスミノゲン活性化能はみられなかった。

さらに、Table Iに示す様に、各種のクロモザイム基質への反応性をみると、6種類の純化酵素すべてにおいてトロンビンの合成基質(S-2238)に強く作用し、フィブリンに対する反応性と同様、F-III分画が最も強い活性を示した。比活性(units/mg・min)は、F-III-2よりF-I-0の順に、それぞれ、150、72、0.1、0.4、0.2、及び0.1であった。また、F-III分画は、トロンビンの合成基質以外にも、カリクレイン(S-2266)、プラスミノゲンアクチベーター(S-2288)、ウロキナーゼ(S-2444)、トリプシン、及びプラスミン(S-2251)などのクロモザイム基質に比較的広い特異性を示す酵素であった。

F-II酵素は、エラスターゼ、ウロキナーゼの合成基質に対し、トロンビン基質に対する活性よりも強い作用

を示し、F-I分画の酵素は、トロンビンの他に、カリクレイン、プラスミノゲンアクチベーターの合成基質に作用した。

次に本酵素のクロモザイム基質に対する反応様式を解析するため、それぞれの精製酵素が、最もよく作用する合成基質(各2種類)についての反応速度定数を測定した。Table IIに示す結果の通りF-III分画の精製酵素が、基質に対して高い親和性と反応性を示すことが確認されたが、F-II分画とF-I分画からの精製酵素は、全般的にみて各基質に対する反応性は低く(Vmax値が低い)、親和性も低い(km値は高い)と考えられた。F-II酵素のS-2238基質(トロンビンの合成基質)に対する反応性については、km値が低いながら、Vmaxが特に低く、F-III及びF-I分画の酵素との反応性の差異がみられた。

なお、表には示していないが、それぞれの精製酵素標品を10µg(dry weight)づつ、標準条件下(pH7.2)で、比較的長時間反応させると、F-III分画の酵素は、トリプシンの合成基質(Bz-L-Arg-pNA)に、また、F-I分画の酵素は弱いながらも、キモトリプシンの合

Table I. Substrate specificity of the purified enzymes.

(µmol/mg・min)

基質	酵素	FIII-2	FIII-1	F-II	FI-2	FI-1	FI-0
1	(エラスターゼ)	0	0	0.3	0	0	0
3	(カリクレイン)	41	63	0	0.6	0.5	0.4
4	(TPA)	30	28	0	2.8	2.2	0.1
5	(トロンビン)	150	72	0.1	0.4	0.2	0.1
6	(ウロキナーゼ)	140	47	0.2	0	0	0
7	(プラスミン)	6	28	0	0	0	0
8	(トリプシン)	3	2	0	0	0	0
9	(キモトリプシン)	0	0	0	0	0	0
10	(エラスターゼ)	0	0	0	0	0	0

比活性は、前報²⁾に示してあるように、各種のクロモザイム基質に対して分光光学的に標準条件下で測定した(37℃, pH7.2)。基質(1から8、及び10)については、終濃度0.25mM、基質9は0.125mM、酵素、F-III-2とF-III-1については、0.1µg(dry weight)を、F-IIからF-I-0については、1µgを反応に供した。

酵素活性測定に用いたクロモザイム基質の構造は次の通りである。1, MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA; 2, Suc-Ala-Ala-Ala-pNA; 3, H-D-Val-Leu-Arg-pNA; 4, H-D-Ile-Pro-Arg-pNA; 5, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA; 6, pyro-Glu-Gly-Arg-pNA; 7, H-D-Val-Leu-Lys-pNA; 8, Bz-L-Arg-pNA; 9, Bz-L-Tyr-pNA; 10, pyro-Glu-Pro-Val-pNA.

Table II. Kinetic parameter of the purified enzymes

酵素	F-III-2	F-III-1	F-II	F-I-2	F-I-1	F-I-0
(トロンビン基質) Km (μ M)	65.2	30.0	42.3	204.1	152.2	161.6
Vmax	197.7	72.9	0.05	0.538	0.36	0.084
	ウロキナーゼ基質	カリクレイン基質	エラスターゼ基質	TPA基質	TPA基質	カリクレイン基質
Km (μ M)	227.7	27.1	210.3	335.5	331.0	167.5
Vmax	268.4	86.1	0.51	5.84	4.96	0.51

酵素活性は、Table I に示す条件下で測定した。各酵素について、最も良く反応する基質 (各2種類) に対する Km, Vmax を算出した。

成基質 (Bz-L-Tyr-pNA) に反応した。F-III-2 及び、F-III-1 をトリプシン様のプロテアーゼとするならば、F-I 分画は、キモトリプシン様酵素と考えられる。F-II 分画については、その作用様式 (基質特異性) を含めて、まったく新規なプロテアーゼと思われる。

従って、3種類の活性分画 (Fig. 2 参照) から精製された6種類の酵素標品は、同分画由来 (F-III 及び F-I) の精製酵素蛋白であっても、クロモザイム基質に対する特異性はわずかに異なり、F-II 酵素を含めて、反応様式をそれぞれ異にするものであると考えられる。

別報⁵⁾で論ずる本酵素の蛋白化学的性質の差異を含め、各精製酵素蛋白の構造と機能に関する詳細な研究を現在、継続中である。

(阻害剤の影響)

6種類の精製酵素について、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 III に示す様に、F-III分画の2種類の精製酵素をはじめとしてSBTI (Soybean trypsin inhibitor) や Aprotinin により阻害を受けたが、他のさまざまな化合物 (阻害剤) に対しては、いずれの酵素分画も顕著な阻害作用を受けなかった。

阻害剤の影響に関しては、今回、新鮮なミミズ細胞より単離・純化された6種類の酵素標品の方が、前報²⁾で報告した標品よりも、反応阻害作用を受けにくいという結果が得られた。

本酵素は、その反応阻害様式からみて、セリンプロテアーゼの一種であると考えられる。

(考察)

新鮮なミミズ細胞の凍結乾燥粉末より単離・純化した6種類の精製酵素標品について、基質特異性をはじめと

Table III. Effect of inhibitors on purified enzymes.

Inhibitors	Concent.	Residual activity (%)					
		F-III-2	F-III-1	F-II	F-I-2	F-I-1	F-I-0
none		100	100	100	100	100	100
SBTI	0.001mg/ml	0.5	1.4	17	60	60	60
Trasylol	0.001mg/ml	0.7	0.3	25	84	85	90
TPCK	0.1mM	100	100	100	97	91	100
TLCK	0.1mM	88	79	83	100	100	70
ϵ -ACA	0.1mM	100	100	100	100	100	100
Elastatinal	0.1mg/ml	99	94	92	84	100	50
PCMB	0.01mM	100	95	100	100	91	90
EDTA	1mM	100	100	100	100	91	100

各種の阻害剤を表に示した濃度を含む 10mM potassium phosphate buffer (pH7.2) 中で、室温にて、20分間放置し、残存活性 (%) を測定した。反応時の基質は、トロンビンのクロモザイム基質 (S-2238) を用い、Table I に示す標準条件下 (37°C, pH7.2) で活性測定を実施した。実験に用いた各阻害剤の詳細は前報²⁾の通りである。

した酵素化学性質を解明した。

本酵素は、いずれの標品もフィブリンに対する線溶活性を示し、特にF-III-2は、最も強くフィブリン平板を溶解した。各種のクロモザイム基質に対する反応性は、F-III, F-II, 及び F-Iのそれぞれの分画ごとに、ほぼ共通した特異性を示した。

本酵素は、ミミズの消化管部分を中心とした体内の前3分の1の組織より分泌される、比較的、pH や熱に安定な、アルカリプロテアーゼの一種であり、SBTI などにより反応が阻害される新規なセリンプロテアーゼであると考えられた。

それぞれの精製酵素蛋白は、その作用様式の差異を、あるいは、別報で論ずる蛋白化学的性質の差異⁵⁾を含め、一次構造(アミノ酸配列)レベルでの相異に起因するアイソザイムであると考えられる。

血栓症等の治療を目的とした本酵素の薬理・臨床応用について、その可能性を強く実証する研究結果が報告さ

れており⁴⁾、本酵素の経口投与による血中線溶活性亢進等の作用機作の解明をはじめとして、今後の本酵素の詳細な研究に期待がよせられている。

なお、今回、ミミズ(*Lumbricus rubellus*)細胞中より発見され、単離・精製法が確立された、強い線溶活性を有する新規なセリンプロテアーゼを、その起原の学名より、一般名として、ルンブロキナーゼ(Lumbrokinase)と命名した。

本酵素の蛋白化学的性質と分子構造について、本紀要の別報において論じている。⁵⁾

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究資金援助をはじめ、数々の御援助と御指導を賜りました、京都大学、化学研究所、微生物化学研究部門教授、左右田健次博士に深く感謝いたします。なお、実験・研究に関し、御理解と御協力を頂きました吉田啓子さんにお礼申し上げます。

引 用 文 献

- 1) 美原恒ら、みみずの線溶酵素、立山シンポジウムIII, p70, 1986.
- 2) 中島伸佳, 田谷直俊, 津島弘文, 須見洋行, ミミズ(*Lumbricus rubellus*)細胞中に発見されたきわめて安定な線溶酵素(その1). — 存在と性質, 安定性 —, 岡山県立短大研究紀要, 35巻, p-68-72, 1991.
- 3) B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121 p404, 1964.
- 4) S. Park. K. C. Kye, M. Lee, H. Sumi, and H. Mihara, *Thromb. Haemostas.*, 62 (1), p545. 1989.
- 5) 中島伸佳, 田谷直俊, 浜田博喜, 下岡正志, 須見洋行, ミミズ(*Lumbricus rubellus*)細胞中に発見されたきわめて安定な線溶酵素(その3). — 蛋白化学的性質と分子構造 —, 岡山県立短大研究紀要, 36巻, p,77-81, 1991.

平成3年10月9日受付

平成3年11月7日受理