

## 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 —

中島伸佳, 田谷直俊\*, 浜田博喜\*\*,  
下岡正志\*\*\*, 須見洋行

### 要 約

前報〔岡山県立短期大学研究紀要, 第36巻 pp.71~76, 1991〕において報告した, ミミズ細胞中より単離・純化された6種類の新規な線溶酵素蛋白質について, それらの分子量, 等電点, アミノ酸組成, 免疫化学的相同性などの蛋白化学的諸性質を解明した。また同時に, N末端付近のアミノ酸配列(一次構造)を解析し, 類縁関係にあるプロテアーゼとの一次構造における相同性(ホモロジー)に関する知見を得た。

精製酵素蛋白は, 前報で述べた基質特異性をはじめとする酵素化学的性質, 分子量, 等電点, 蛋白化学的性質, あるいは, 一次構造などについて相異がみられ, 遺伝子レベルでの違いにより4種類のアイソザイムが存在すると考えられた。

### はじめに

我々は, すでに, ミミズ (*Lumbricus rubellus*) 細胞中に発見された新規な線溶酵素蛋白質について, それらの安定性, 作用機作, その他の酵素化学的諸性質を解明し報告した<sup>1,2)</sup>。

これらの精製酵素蛋白は, 従来知られていた線溶酵素をはじめとする, いずれのセリンプロテアーゼとも異なる新しい蛋白質分解酵素であると考えられるものであった。

本稿では, ミミズ由来の新規な線溶酵素の臨床応用への可能性をふまへ<sup>3)</sup>, それらの蛋白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

実験に用いたミミズ由来の精製酵素, その活性測定方法等は, 前報の通りである<sup>1,2)</sup>。

分子量は, SDS電気泳動法<sup>4)</sup>, 高速液体クロマトグラフィーを用いたゲルろ過法<sup>5)</sup>, 並びに, 超遠心法<sup>6)</sup>による測定法に基づいて算出した。アミノ酸組成の分析は, 既報の方法に従った<sup>7-8)</sup>。

一次構造(アミノ酸配列)の解析は, 自動エドマン分解装置(プロテインシーケンサー)により行った<sup>10)</sup>。また, 一次構造の相同性(ホモロジー)の解析は, FACOM, M-380Qコンピューターを用いNBRF蛋白シーケンスデータバンクより検索した<sup>11)</sup>。

等電点は, IEF Standards (Bio-Rad, CA) を用い既報の方法に従って等電点電気泳動法により測定した<sup>12)</sup>。

免疫化学的解析は, オクタロニー免疫二重拡散法<sup>13)</sup>に従った。

### 実験結果と考察

(精製酵素の分子量)

本酵素の分子量を解明するため, まずSDS-電気泳動法を行った。Fig.1に示す電気泳動ゲル写真の通り, 標準蛋白質との移動度の差より算出した6種類の純化標品の分子量は, F-III-2より, F-I-0の順に, それぞれ,

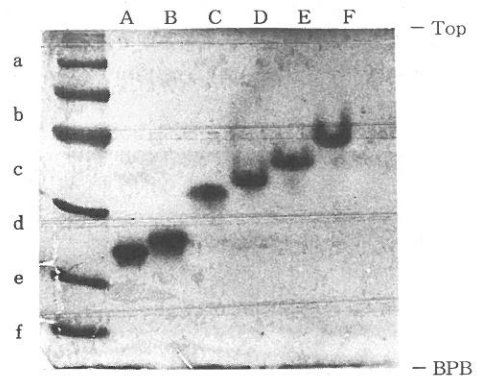


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme.<sup>4)</sup>  
A, F-III-2 (20  $\mu$ g protein); B, F-III-1;  
C, F-II; D, F-I-2, E, F-I-1; F, F-I-0.  
Marker protein for molecular weight determination (Pharmacia): a, phosphorylase b (M. W. 94,000); b, bovine serum albumin (M. 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,  $\alpha$ -lactalbumin (M. W. 14,000).

\*タカノフーズ(株)研究所 \*\*岡山理大・理・基礎理学科 \*\*\*イワキ硝子(株)組織培養研究室

造の解明により明白にされるものと思われる。

Table I. Molecular weights of the purified enzymes

|                     | F-III-2 | F-III-1 | F-II   | F-I-2  | F-I-1  | F-I-0  |
|---------------------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|
| SDS-page            | 23.000  | 27.000  | 36.000 | 38.000 | 43.000 | 49.000 |
| Gel-filtration      | 46.000  | 43.000  | 32.000 | 32.000 | 32.000 | 24.500 |
| Ultracentrifugation | 23.100  | —       | 19.800 | —      | —      | 15.500 |

23,000, 27,000, 36,000, 38,000, 43,000及び49,000と計算され、F-III-2の分子量が最も低く、F-II、F-Iと順次に分子量が増大し、F-I-0が最も大きい値を示した。

(Table I)

また、ゲルろ過法、及び超遠心法により分子量を測定したが、Table Iに示すように、ゲルろ過法で算出した分子量は、F-III-2が最も大きく(46,000)、F-I-0(24,500)にいたる順に値が減少した。超遠心法で測定した分子量(F-III-2、F-II、及びF-I-0)についても、上記のいずれの値とも異なる結果が得られた。

SDS-電気泳動法により算出した値と、ゲルろ過法よりのそれとが、F-III-2とF-I-0において、それぞれ、ほぼ逆の値を示し、F-II及びF-I-2については、電気泳動法及びゲルろ過法で得られた分子量が、ほぼ一致していた。

この分子量の測定方法の違いに基づいた測定値の差異は、酵素蛋白のサブユニット構造に起因するものなのか、あるいは、酵素に結合する糖鎖などの結合分子種による影響であるのか、現在のところ不明であるが、本酵素の全一次構造(アミノ酸配列)の解析や高次(立体)構

(自己消化による分子量等の変動)

各種のクロマトグラフィーにより単離・純化された精製酵素標品は、電気泳動的に均一な蛋白成分としての挙動を示すが、おそらく自己消化(プロテオリシス)に起因すると考えられる小分子化(フラグメンテーション)が観察された。すなわち、SDS-電気泳動時の熱処理、水溶液中での加熱等により、より小さい分子量成分への蛋白組成変動がみられた。特に、60℃以上の加熱によりFig. 2に示すようなSDS-電気泳動パターンの変化が生じる。このフラグメントへの変化は、本酵素の熱失活曲線<sup>1,2)</sup>とほぼ一致しており、フラグメンテーション後は、おそらく酵素活性は、失活しているものと思われる。このような現象は、プロテアーゼにはよくみられることであるが、本酵素において特徴的なことは、F-III-2及びF-III-1成分に関して、フラグメンテーション後に、残存したメインバンドのSDS-ゲル上での移動度が減少し、算出される分子量値が大きくなること、またF-III-1蛋白においては、そのメインバンド成分(分子量35,000程度)が、前報<sup>2)</sup>で論じたところの、7年間安定に活性を保持していた酵素蛋白成分のひとつと分子量的に一致することである。

さらに、F-III-2酵素蛋白成分がフラグメンテーションを起こした際に、生じた小フラグメントのアミノ酸配列は、ほとんどが本酵素のN末端付近の一次構造を示していることも注目される現象であろうかと思われる。

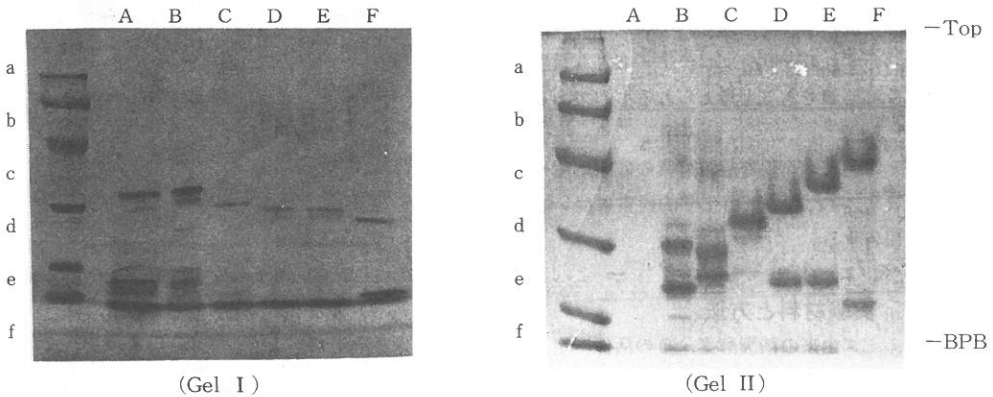


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzymes<sup>4)</sup>.

A~F and a~f were noted in Fig. 1.

(Gel I) sample was heated for 15min at 90°C before electrophoresis.

(Gel II) sample was heated for 15min at 70°C before electrophoresis.

(等電点)

精製酵素の等電点を、等電点電気泳動法により、等電点マーカーを用いて測定した。

その結果、F-III-2よりF-I-0の順に、pIは3.40, 3.60, 4.20, 4.00, 4.30及び、4.85と算出された。6種類の精製酵素は、比較的酸性域pHに個別の等電点をもつ蛋白質であり、等電点的にも、精製標品は均一であることが示された。

(免疫化学的同一性)

6種類の精製酵素蛋白の免疫化学的同一性を解析するため、Ouchterlony 免疫二重拡散法により、それぞれの酵素分画で免疫したマウス抗体 (抗血清) を用いて検討した。

Fig. 3 に示すように、F-III, II及びIのそれぞれの酵素分画間に、一定の同一性がみられた。すなわち、F-III-2もしくは、F-III-1を抗原として調整した、マウス抗体は、F-III-2及びF-III-1の酵素蛋白のいずれとも交互に沈降線を形成し、F-I-2及びF-I-1より得られた抗体は、それぞれのその抗原 (F-I-2及びF-I-1) の両者と交互に反応した。また、F-II抗体は、F-II蛋白のみと、F-I-0抗血清は、F-I-0蛋白のみと、それぞれ独立した沈降

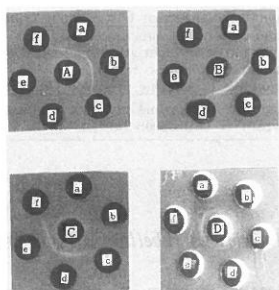


Fig. 3. Ouchterlony double diffusion analysis of the purified enzymes<sup>10)</sup>.

- |                             |            |
|-----------------------------|------------|
| A: Anti F-III-1 mouse serum | a: F-III-2 |
| B: Anti F-II mouse serum    | b: F-III-1 |
| C: Anti F-I-2 mouse serum   | c: F-II    |
| D: Anti F-I-0 mouse serum   | d: F-I-2   |
|                             | e: F-I-1   |
|                             | f: F-I-0   |

線を生じた。従って、4種類の同一性 (相関性) が確認された。

これらの同一性は、前報<sup>2)</sup>で述べた本酵素の基質特異性等の相異や後述する一次構造 (アミノ酸配列) に基づく酵素蛋白間の同一性とも、よく一致していた。

(アミノ酸組成分析)

6種類の酵素蛋白より、F-III-2, F-II及びF-I-0について、酸水解法によるアミノ酸組成を解析した。アミノ酸は pico-tag 法により高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。分析を行った3種類の酵素蛋白のいずれもかなり類似したアミノ酸組成であったが、特徴的なことは、アスパラギンまたはアスパラギン酸、及びグルタミンまたはグルタミン酸が比較的多く含まれ、セリン、

Table II. Amino acid composition of the purified enzymes

|                            | F-III-2 | F-II   | F-I-0  |
|----------------------------|---------|--------|--------|
| M.W. (SDS-electrophoresis) | 23,000  | 36,000 | 49,000 |
| Residue                    |         |        |        |
| B (N+D)                    | 28      | 46     | 52     |
| Z (Q+E)                    | 15      | 21     | 20     |
| S                          | 21      | 42     | 42     |
| G                          | 27      | 53     | 62     |
| H                          | 4       | 8      | 12     |
| R                          | 8       | 8      | 19     |
| T                          | 14      | 31     | 54     |
| A                          | 17      | 42     | 65     |
| P                          | 14      | 19     | 23     |
| Y                          | 9       | 11     | 17     |
| V                          | 23      | 27     | 35     |
| M                          | 3       | 4      | 3      |
| C-C                        | 3       | 3      | 6      |
| I                          | 17      | 20     | 33     |
| L                          | 7       | 26     | 33     |
| F                          | 6       | 2      | 8      |
| K                          | 3       | 1      | 0      |
| C                          | 1       | 0      | 0      |
| W                          | 4       | 9      | 8      |

Amino acid composition was analyzed by the methods described previously<sup>7-8)</sup>.

グリシン、スレオニン、アラニン、プロリン、バリン、及びイソロイシンなどに富むことがわかった。この傾向は分析した酵素標品すべてに共通しており、さらに、システイン、リジン、メチオニンなどの含量は、3標品共にきわめて低かった。

Table IIに、SDS-電気泳動法により算出した分子量 (F-III-2, 23,000 : F-II, 36,000 : F-I-0, 49,000) をもとに算出したアミノ酸残基の整数値を示しているが、全体的な傾向としては、アスパラギンまたはアスパラギン酸などを多く含むことから、比較的酸性で、かつ安定

な蛋白質であると考えられる。

また, S-S結合は, F-III-2, F-II及びF-I-0の酵素蛋白中に, それぞれ, 3, 3, 及び6個含まれていると計算され, 遊離のSH基は, F-III-2に1個含まれるが, F-II及びF-I-0中には, 含まれていないと考えられた。

(N末端付近の一次構造 [アミノ酸配列])

ミミズ細胞より単離・純化された6種類の精製酵素は, 前報<sup>2)</sup>で述べたようにクロモザイム基質に対するそれぞれの酵素蛋白の反応性に相異があり, また, 分子量や, 等電点もそれぞれ異なる。免疫化学的にも, 前述したように4種類の相同性(相関性)がみられる。

そこで, これらの酵素の一次構造レベルでの相関性を調べ, 蛋白化学の見地からの本酵素の構造と機能に関する情報を得るため, 自動エドマン分解装置により, 各酵素蛋白のN末端付近のアミノ酸配列を解析した。

その結果, Fig. 4に示すように, セリンプロテアーゼによくみられるN末端アミノ酸配列(I又はVにはじまり, G-Gに続く)が, それぞれの精製酵素に確認され, 少なくとも, 22残基目までは, かなり高い相同性が数残基おきにみられた。

また, F-III-2とF-III-1は, 22残基までが, F-I-2とF-I-1については, 25残基までが, まったく等しい配列を有していた。F-II及びF-I-0は, 相同性を有しながらも, 他の精製酵素蛋白とは異なった配列が確認された。

以上の結果より, 20数番目までのそれぞれの酵素蛋白のN末端アミノ酸配列は, 前述した免疫化学的な相同性と同様に, “F-III-2とF-III-1”, “F-II”, “F-I-2とF-I-1”, そして, “F-I-0”の4種類のグループに, 遺伝

子レベルでの分類が可能であると考えられる。

現在, さらに詳細な情報を得るため, 精製酵素蛋白のプロテアーゼによる限定分解を行い, 全一次構造(全アミノ酸配列)の解析を実施している。

(一次構造の相同性の解析)

前述したそれぞれの酵素蛋白の20数番目までのアミノ酸配列について, 他のプロテアーゼのそれとの相同性(ホモロジー)を解析した。

その結果, Table IIIに示すように, N末端付近のアミノ酸配列の相同性に基づいて分類された4種類のグループごとに, 相同性の高いプロテアーゼが確認された。これらのプロテアーゼは, 血液凝固溶解系のセリンプロテアーゼや, エラスターゼ, 補体系酵素, トリプシン, キモトリプシン, あるいはカリクレインなど内在性のプロテアーゼなどであり, 10数残基が連続して共通しているものなど, 60%以上の比較的高い相同性がみられた。

Table III. Homology of the purified enzymes<sup>11)</sup>

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| F-III-2.1 | Elastase 2 precursor (Pig)                                 | 67%/15base |
|           | Elastase 2A precursor (Human)                              | 65%/15base |
|           | Coagulation factor IX precursor (Christmas factor) (Human) | 67%/15base |
| F-II      | Coagulation factor IXa precursor (Human)                   | 65%/16base |
|           | Coagulation factor IX (Christmas factor) (Bovine)          | 56%/16base |
|           | Trypsin I (Broad-fingered crayfish)                        | 65%/17base |
|           | Plasma kallikrein precursor (Human)                        | 63%/19base |
| F-I-2.1   | Complement subcomponent C1r b chain (Human)                | 56%/16base |
|           | Coagulation factor IX a precursor (Human)                  | 65%/14base |
|           | Coagulation factor IX (Christmas factor) (Bovine)          | 57%/14base |
|           | Plasma kallikrein precursor (Human)                        | 67%/15base |
| F-I-0     | Trypsinogen-like proenzyme precursor (Fruit fly)           | 57%/23base |
|           | Trypsinogen-like proenzyme precursor (Fruit fly)           | 60%/22base |
|           | Chymotrypsin II (European hornet)                          | 60%/17base |

## 考 察

ミミズ (*Lumbricus rubellus*) 細胞乾燥粉末より単離・

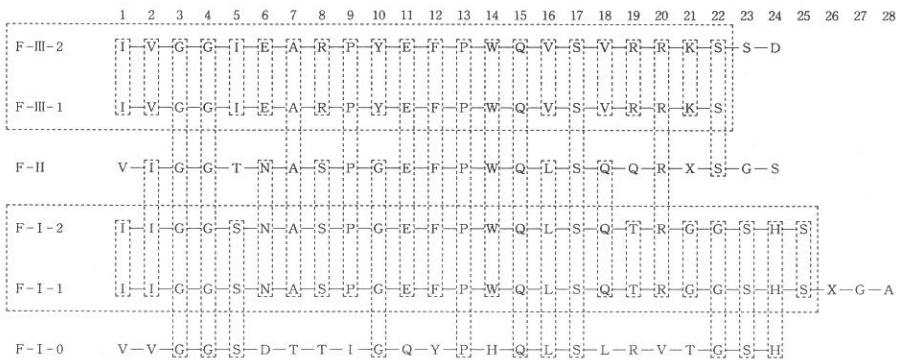


Fig. 4. N-Terminal amino acids sequence of the purified enzymes<sup>10)</sup>

純化した6種類の精製酵素について、酵素化学的性質<sup>2)</sup>及び蛋白化学的性質を解明した。

基質特異性、分子量、等電点などの異なるそれぞれの精製酵素蛋白は、類似した特徴を持ちながらも、N末端付近のアミノ酸配列(一次構造)と免疫二重拡散法による相同性の解析を行った結果、“F-III-2とF-III-1”が、そして、“F-II”, F-I-2とF-I-1”, さらに“F-I-0”がそれぞれ、遺伝子レベルで同起原の酵素蛋白であることが推定され、4種類のグループに分類することができた。現在のところ、“F-III-2”と“F-III-1”の基質特異性の差異、あるいは、それぞれ6種類の蛋白の分子量や等電点の違いなどが、本酵素の構造と機能において、いかなる意味をもつのであるのかが、明白ではない。

今後、本酵素の全一次構造(アミノ酸配列)や高次構

造の解析、あるいは、遺伝子レベルでの詳細な検討により、それらが明らかにされると思われる。

新起源の、かつ、新規のセリンプロテアーゼとして、血栓症予防・治療への薬理臨床の可能性をはじめとする本酵素へ寄せられる期待は大きく、今後のより詳細な研究の進展が望まれる。

## 謝 辞

アミノ酸配列の決定に関して御協力頂きました、川崎医科大学、衛生学教室、津島弘文博士、並びに、一次構造のホモロジー検索に関して御援助を賜りました、大阪大学産業科学研究所、食品化学部門、谷沢克行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) 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, pp.68-72, 1991.
- 2) 中島伸佳, 田谷直俊, 美原恒, 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2) — 単離・精製と酵素化学的性質 —, 岡山県立短大研究紀要, 36巻, pp.71-76, 1991.
- 3) S.Park, K.C.Kye, M.Lee, H.Sumii, and H.Mihara, *Thromb. Haemostas.*, 62 (1), p.545, 1989.
- 4) U.K.Laemmli, *Nature*, 227, p.680, 1970.
- 5) H.Wada, K.Makino, and T.Takeuchi, *J. chromatogr.*, 320, p369, 1985.
- 6) K.E.van Hold and R.L.Baldwin, *J.Phys.Chem.*, 62, p734, 1958.
- 7) R.L.Heinrikson and S.C.Meredith, *Anal. Biochem.*, 136, p65, 1984.
- 8) H.Edelboch, *Biochem.*, 6, p1948 1967.
- 9) G.L.Hillman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, p70, 1959.
- 10) P.Edman and G.Begg, *Eur. J. Biochem.*, 1, p80, 1967.
- 11) W.B.Goad and M.Kanehisa, *Nucleic Acids Res.*, 10, p247, 1982.
- 12) C.W.Wrigley, *Methods in Enzymology*, Vol.22, ed. by W.B.Jakoby, Academic Press, New York, p559, 1971.
- 13) O.Ouchterlony, *Handbook of Experimental Immunology*, ed. by Weir D.M., Blackwell Scientific, p655, 1967.

平成3年10月9日受付

平成3年11月7日受理