

カツオ (*Katsuwonus pelamis*) 塩辛由来 の新規な線溶プロテアーゼ

— 精製と性質 —

中島伸佳, 坂東真由美*, 大川照代**
田谷直俊***, 須見洋行

要 約

カツオ (*Katsuwonus pelamis*) 塩辛 (酒盗) より、フィブリンに対し強い溶解活性を示す新規な線溶酵素を単離、精製した。本酵素は分子量約38,000、等電点4.65のモノマー蛋白であり、カゼイン、フィブリンをはじめ、トロンビン、TPA (組織プラスミノゲンアクチペーター) など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。

本酵素のトロンビンの合成基質の加水分解反応に対する至適pHは10～11付近であり、40℃、20minの熱処理においても安定であったが、50℃、20minでは、ほぼ50%の活性が失われた。

カツオ消化管由来のタンパク質分解酵素であると考えられる本酵素活性は、カツオ塩辛の熟成期間中、長期間安定に保持されていた。本稿では、精製酵素蛋白のN末端付近のアミノ酸配列と、酵素化学的性質を解明した。

はじめに

我々は、心疾患、脳血管障害などの成人病の原因となる血栓性疾患の予防・治療を目的として、経口療法の開発を含めた、新規な血栓溶解酵素の検索と、応用利用に関する検討を行なっている。最近、漢方薬でもある地龍 (ミミズ) エキスから極めて、安定、かつ強力な新規線溶酵素を見出し、精製酵素の構造と機能について報告した^{1～3)}。

今回、我々は、日本の伝統的水産加工食品であるカツオ (*Katsuwonus pelamis*) 塩辛 (酒盗) 中に、長期間安定に活性を保持していたカツオの消化管由来の新規な血栓溶解酵素を、はじめて単離精製し、その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社製のものをを用いた。フィブリンノーゲンはSigma製、牛トロンビンは持田製薬製を用いた。

酵素活性は、0.25mMクロモザイム基質、10mM potassium phosphate buffer (pH7.2)、及び適量の酵素液を含む反応液1ml中で、37℃において、生成するp-ニトロアニリンの405nmにおける吸収の増大に基づき、分光光学的に算出した⁴⁾。

酵素活性1 unitは、1分間あたりに1 μ molの基質を生成物に変換しうる酵素量とした。比活性は、1mgの酵素蛋白あたりのunit数を示した。蛋白量の測定など、特に明記していない場合の各種の実験条件は、すべて、前報^{1～3)}のそれに従った。フィブリン、及びカゼインに対する加水分解活性の測定は既報の方法により行った⁵⁾。

酵素蛋白の純度は、Davis-電気泳動法⁶⁾により検定し、分子量は、標準蛋白を用いてSDS-電気泳動⁷⁾及びHPLCによるゲル透過法⁸⁾により測定した。等電点は、既法¹⁰⁾に従って測定した。

実験材料は、旬福辰により供与されたカツオの酒盗 (3ヶ月熟成、塩分20%存在下)、3kgを4倍量の水で抽出し、脱塩したものを粗酵素液とした。最終塩濃度は、0.73% (NaCl) であった。本酵素の精製は、0～4℃の条件下において、10mM potassium phosphate buffer (pH7.2) 中で、S-2238クロモザイム基質を用いて、各種のクロマトグラフィーにより実施した。

精製酵素蛋白のN末端アミノ酸配列は、自動エドマン分解法によりプロテインシーケンサー (ABS) を用いて実施した⁹⁾。

実験結果と考察

(カツオ塩辛の線溶酵素活性)

Fig. 1 に示すように、カツオ塩辛 (酒盗、約1.0g)

* 現、三菱化成(株)水島工場 **現、日本ケミカルリサーチ(株)研究所 ***タカノフーズ(株)研究所

を標準フィブリン平板⁵⁾ (人工血栓) 上に置くと、数分以内にフィブリンの溶解がみられ、約2時間後、血栓の大部分が完全に溶解した。なお、塩辛製品中に含まれる塩分による酵素活性の変動もほとんどみられなかった。また、本酵素は、カゼインに対しても強い分解活性を示した。

なお、本酵素は、カツオ (*Katsuwonus pelamis*) の消化管 (幽門垂等) 由来の消化酵素のひとつであると思われる。

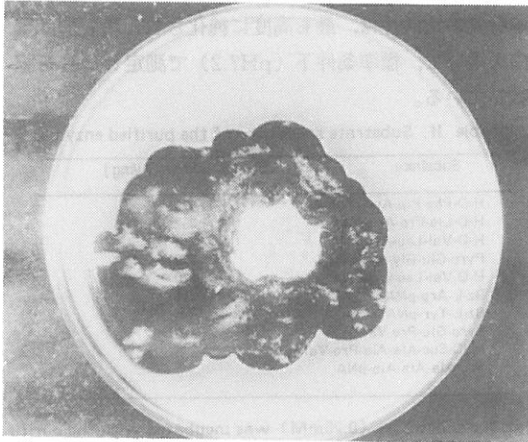


Fig. 1 Fibrinolytic activity of *Katsuwonus pelamis* digest tract on fibrin plate.⁵⁾

Katsuwonus digest tract (1.0 g, wet. wt) was placed on the fibrin plate. The fibrinolytic activity was detected after the incubation at 37°C for 2 hr.

(線溶酵素の精製・純化)

前述したカツオ塩辛 (3 kg) 由来の粗酵素液 (12 l) を遠心分離し不溶物を除いた後、10mM potassium phosphate buffer (pH7.2) で平衡化したDEAE-Cellulose (10×30cm) アニオン交換クロマトグラフィーより、buffer中のKCl濃度を変化させ、0.3M KClを含む同bufferで酵素活性画分を溶出させた。さらに得られた酵素画分を、アミコンPM-10限外口過膜で濃縮後、DEAE-Toyopearl 650M (3×20cm) により再クロマトを行い、buffer中のKCl濃度を0～0.5Mに変化させ酵素蛋白を溶出させた。

次に得られた酵素画分をButyl-Toyopearl疎水クロマトグラフィー (3×20cm) により、buffer中の硫酸濃度を2M～0Mに変化させ酵素活性を溶出させた。

続いて、単一画分として得られた酵素蛋白をCellulofine GCL-2000 (2×100cm) によるゲル濾過により精製した後、得られた酵素画分をMono Q (0.5×5cm) カラムを用い、高速液体クロマトグラフィーにより、Davis電気泳動法的に均一な状態に精製した (Fig. 2 A)。

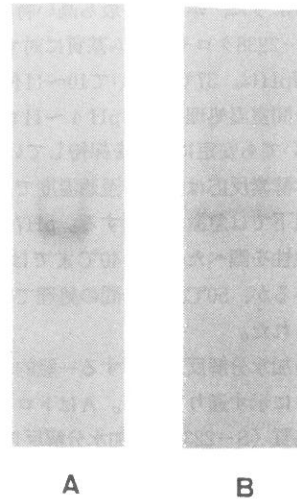


Fig. 2. Electrophoresis of the purified enzyme.

A, The purified enzyme (20 μg) was electrophoresed under the conditions of Davis⁶⁾. B, The enzyme was electrophoresed under the conditions of Laemmli in the presence of 0.1 % SDS.⁷⁾

Table I に示す様に精製酵素蛋白0.5mgは、標準条件下においてS-2238基質に対し、比活性113.4 (平均値) を示し、精製率は約140倍、収率は0.2%であった。

Table I. Purification of the enzyme

Steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
1. Crude extract	42516	34650	0.8	100
2. DEAE-Cellulose	1908	16275	8.5	47.0
3. DEAE-Toyopearl	428	4215	9.8	12.2
4. Butyl-Toyopearl	20	1179	60.5	3.4
5. Cellulofine GCL-2000	6	576	93.5	1.7
6. Mono Q	0.5	57	113.4	0.2

(分子量)

SDS-電気泳動法の結果をFig. 2 B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38,000と算出され、SDS処理液中の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、本酵素蛋白の分子量は、ゲル濾過法によっても、約38,000と測定された。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であると考えられる。

(等電点)

本酵素の等電点を、等電点電気泳動法¹⁰⁾ により測定した結果、pI 4.65と算された。本酵素蛋白は、比較的、酸性側に等電点を持つ蛋白であると考えられる。

(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℃において10~11付近である。また、20分間室温処理では、pH 4~11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℃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。pH7.2における20分間の耐熱性を調べた結果、40℃までは100%活性を保持しているが、50℃、20分間の処理では約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. 3のA~Dに示す通りである。Aはトロンビンのクロモザイム基質(S-2238)の加水分解反応に対する標準条件下における至適pHを、Bは、室温で20分間放置した際のpH安定性を、またCは、反応に対する至適温度を、Dは、20分間処理における熱安定性を、それぞれ示している。

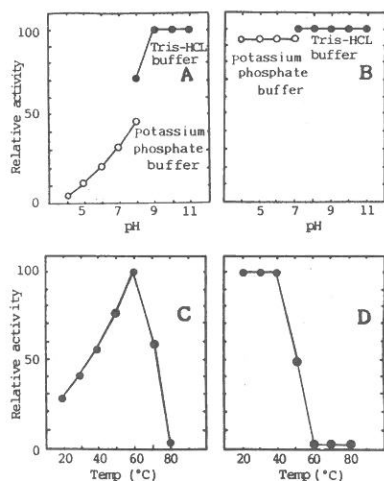


Fig. 2 pH, temperature optimum and stability of the purified enzyme.

A : 0.04 μ g of the enzyme was assayed with various pH at 37°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°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 0.05M Tris-HCl buffer (pH7.2)

(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基質を効率よく加水分解するが、Table-II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)や組織プラスミノゲンアクチベーターの合成基質に最もよく作用する。

さらに、カリクレイン、ウロキナーゼ及びプラスミンの合成アミドも基質となり、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、新鮮なミズ抽出物より単離した線溶酵素の6画分の中で“F-III”と名付けた精製酵素のそれとほぼ一致していた¹⁻³⁾。

なお、Table IIに示したクロモザイム基質に対する本酵素の比活性は、最も高度に純化された精製酵素蛋白を用いて、標準条件下(pH7.2)で測定した値を記載している。

Table II. Substrate specificity of the purified enzyme.

Substrate	Specific activity (U/mg)
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	419
H-D-Lle-Pro-Arg-pNA	352
H-D-Val-Leu-Arg-pNA	214
Pyro-Glu-Gly-Arg-pNA	206
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	110
Bz-L-Arg-pNA	14
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 (0.25mM) was incubated with the purified enzyme (0.04 μ g) in the standard reaction conditions (pH7.2) described in the text.

(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-III)。

本酵素反応はセリンプロテアーゼの阻害剤であるSBTI, DFP, Aprotinin, TLCKにより顕著に阻害された。TPCKや ϵ -ACAによる反応阻害はほとんどみられなかった。

本酵素は、反応に対する阻害剤の影響等から考えて、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。また、本酵素は、エラスターゼの阻害剤であるElastatinalや、金属キレート剤EDTA, SH基(システイン残基)の阻害剤PCMBなどによる顕著な反応阻害もみられなかった。

Table III. Effect of inhibitors on purified enzyme.

Inhibitors	Concent.	Residual activity (%)
None	—	100
DFP	0.1 mM	3
SBTI	0.001 mg/ml	1
Aprotinin	0.001 mg/ml	2
TPCK	1 mM	40
TLCK	1 mM	14
ϵ -ACA	0.1 mM	40
Elastatinal	0.1 mg/ml	50
EDTA	1 mM	50
PCMB	0.1 mM	30

The enzyme activity was measured after the incubation of the purified enzyme (0.18 μ g) with various inhibitors for 20 min at 25°C in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2).

