

琉球大学学術リポジトリ

ハブ毒のコラゲナーゼに関する研究(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 知念, 功, 石松, 亮, 福田, 亘博, Chinen, Isao, Ishimatsu, Akira, Fukuda, Nobuhiro メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4085

ハブ毒のコラゲナーゼに関する研究

知念 功*・石松 亮**・福田 亘博*

Isao CHINEN, Akira ISHIMATSU, and Nobuhiro FUKUDA
Studies on collagenase of Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom

I 緒 論

1962年, J. GrossとC. M. Lapierre⁵⁾等が, オタマジャクシの尾部を培養したものを用い, 中性付近で, 天然のコラーゲンに作用させ, それが水解されることがわかって以来, 種々の動物たとえば, ヒゲナガエビ⁹⁾, ブリ¹⁴⁾, ネズミの子宮⁷⁾, 皮膚³⁾, ウサギ²⁾, 人間の各組織^{3,4)}等で, コラゲナーゼの存在が報告されている。

一方, 蛇毒の場合は, 蛇毒が細胞壊死作用を有する⁸⁾ことなどから, 以前にコラゲナーゼの研究を行なった例はあり, 粗毒をアゾコラーゲンやゼラチンに作用させた場合, これらを分解すると報告^{6,10,11)}されているが, カゼイン等を分解するエンドペプチダーゼもこれらの基質を分解する¹²⁾ことから, 蛇毒では, 生のコラーゲンに作用するコラゲナーゼの存在が疑問視されていた。本研究では, 蛇毒でのコラゲナーゼの存在を確認するため, 不溶性コラーゲンを用い, そのコラーゲン繊維の本蛇毒による分解を調べると共に, 蛇毒酵素のこの不溶性コラーゲンへの作用条件を設定した。またこの不溶性コラーゲンと蛇毒酵素との親和性を利用し, バッチ法により, 本酵素をこの不溶性コラーゲンに吸着させて, 精製した。また精製酵素については, 基質特異性等をも調べたのでこれらの結果を以下に報告する。

II 実験方法

1. 酵素溶液の調整法

ハブ毒およびサキシマハブ毒液は, 沖縄本島内で購入し, その蛇毒液は, 8,000 rpmで30分間, 冷却遠心し, 得られた上清を凍結乾燥した。その粉末蛇毒を1ml当り, 1mgになるように溶解した。実際にその溶液を酵素溶液として用いる際には, 2倍に希釈して用いた。またこの酵素希釈液は, 5mM塩化カルシウムを添加した0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用いた。

2. コラゲナーゼ活性測定法^{9, 14)}

Fig. 1に示すように, 基質としては, 不溶性コラーゲン (Type 1. Bovine Achilles Tendon, Sigmer) を用い, それ 15 mg に 5 mM 塩化カルシウムを加えた 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を 1 ml 加

* 琉球大学農学部農芸化学科

** 日本専売公社熊本地方局

Collagen (15 mg)
 |
 |—0.05 M Tris buffer—5 mM CaCl (pH8.0) 1 ml
 |—Enzyme (Habu venom 50 μ g/5 mM CaCl solution) 1 ml
 Incubate (60 °C, 60 min)
 |
 |—15% TCA 1 ml
 Centrifugation (15 min, 12,000 rpm)
 Filtrate (No. 5c 5.5 cm)
 Supernatant 1 ml
 |
 |—12N HCl 1 ml
 Hydrolysis (110 °C, 16—20 hour)
 |
 |—methyl red
 Neutralization (6N NaOH)
 Fill up 6 ml
 1 ml
 |
 |—H₂O 1 ml
 |—Chloramine T 1 ml
 Standing 20 min.
 |
 |—Perchloric acid 1 ml
 Mixed and allowed to stand 5 min.
 |
 |—20% p-DMBA 1 ml
 60 °C, 20 min.
 Cool
 |
 Color read at 560 nm

Fig. 1. Assays for Collagenolytic Activity

え、さらに先に調整した酵素液1mlを加え、60°Cで1時間反応を行なった。その後15%トリクロロ酢酸溶液1mlを加えたのち、その溶液を12,000 rpmで、15分間冷却遠心を行ない、得られる上清を東洋濾紙 (No. 5C. 5.5 cm) で濾過した。その濾液1mlをキャップ付試験管に入れ、12 N塩酸1mlを加えたのち、110°Cで16~20時間加温し、水解を行なった。加水分解した溶液は、放置し、冷却したのち、指示薬としてメチルレッドを1~2滴加えたのち、6 N苛性ソーダ溶液で中和した。中和溶液は、6mlに定容したのち、その溶液を1mlとり、水を1ml加え、さらに0.05 M クロラミン T液を1ml加えたのち20分間放置した。次に3.15 M 過塩素酸1mlを加え、よく混合したのち同様に室温に5分間放置した。次に20% p-DMBA 1mlを加えたのち、60°Cで20分間加温した後、室温まで冷却し、560 nmの波長で吸光度を測定し、その溶液中のヒドロキシプロリン含量を求めた。

3. 蛇毒コラゲナーゼの精製法

1) アフィニティクロマトグラフィー

基質として用いている不溶性コラーゲン5gに、緩衝液400mlに溶解した粗毒(ハブ毒50mg)溶液を

加えたのち、30°Cで60分間反応を行なった。その後8,000 rpmで30分間冷却遠心を行なった。その上清をSup Iとした。またその沈殿物は、同緩衝液400 mlを加えよく攪拌したのち、同様に遠心を行ない洗浄を行なった。洗浄を行なった沈殿物は、同緩衝液に1 M塩化ナトリウムを加えた溶液200 mlを加え、遠心し、溶出された本酵素上清液をSup IIIとした。この溶液は、透析を行ない脱塩したのち、凍結乾燥を行ない濃縮し、セファディクスゲルカラムクロマトグラフィーにより、さらに精製を行なった。また一方沈殿物は、さらに1 M塩化ナトリウムを加えた溶液、および水を加えて洗浄したのち、その沈殿物は、先に得られたSup Iを加え、同様に、30°Cで60分間反応を行なったのち、同様な操作を繰り返し行ないSup III', IV'を得た。この分画も同様にセファディクスゲルカラムクロマトグラフィーにより、さらに精製を行なった。

2) セファディクスカラムクロマトグラフィー

アフィニティクロマトグラフィーにより得られた活性分画をさらに精製するため、セファデックスG-75, G-150ゲルを用いてゲル濾過を行なった。その方法については、前報¹⁾で述べているため本報では、省略する。

4. カゼインおよびヘモグロビン消化法

精製酵素の基質特異性を調べるため、カゼインおよびヘモグロビン消化法を用いた。その両法は、前報¹⁾で詳細に記述したので本報では省略する。

5. ディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動法¹⁾

カラムクロマトグラフィー等により精製した本酵素の純度及び泳動ゲル中での活性分布を調べるため、本法を用いた。この方法についても前報¹⁾で詳しく記述したため本報では省略する。

III 実験結果

1. ヒドロキシプロリン標準曲線

本研究では、蛇毒中のコラゲナーゼ活性を求めると、基質として不溶性コラーゲンを用い、それに蛇毒を作用させ、生成して来る可溶性ペプチド等の含量を測定し、本酵素活性を求めるとにした。一般にコラーゲンのアミノ酸組成では、特異的にグリシン、プロリン、ヒドロキシプロリン等が多く、普通のタンパク質に良く見られる芳香族アミノ酸は、極めて少ないため、本酵素活性を求めるとに普通のタンパク質量を測定する際用いるLowry法等を適用することは、困難である。そのため本研究では、この可溶性ペプチド含量を求めると、この溶液を加水分解し、遊離してくるヒドロキシプロリン含量を前述の方法に従って測定することにした。そのためヒドロキシプロリンの標準曲線を作成した。その結果、Fig. 2が得られた。ヒドロキシプロリン含量は8 μ gまでは、吸光度との間に直接関係が見られた。そのため以後の実験では、ヒドロキシプロリン含量が8 μ g以下になるように酵素量等を調整した。

2. ハブ毒及びサキシマハブ毒のコラゲナーゼ活性

沖縄県内に棲息する主要な毒蛇、ハブとサキシマハブについて、毒中のコラゲナーゼ活性を比較した結果、

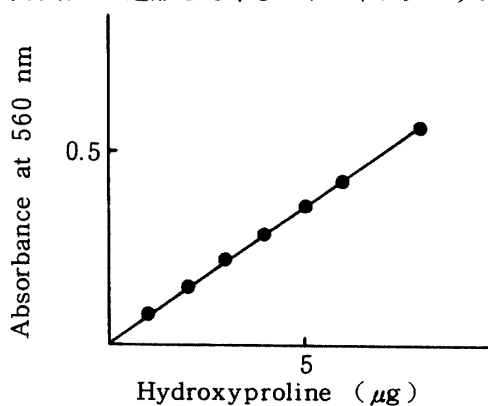


Fig. 2 Hydroxyproline Standard Curve.

八重山諸島に棲息するサキシマハブの毒の方が、沖縄本島およびその周辺諸島に棲息するハブの毒よりも、その酵素活性は高く、196 ($\mu\text{g Hypro.}/50 \mu\text{g/hr}$)であった。ハブ毒では低く、104であった。ただし本酵素活性を測定するにあたっては、酵素反応液中に塩化カルシウムを加えず、また反応温度も40°Cで行なっている。この結果は、Table 1に示した。

Table 1 Collagenase Activity of *T. flavouridis* and *T. elegans* Venom

	<i>T. flavouridis</i>	<i>T. elegans</i>
Collagenase Activity (Hydroxyproline $\mu\text{g}/\text{mg}/\text{hr.}$)	103.50	195.75

3. コラゲナーゼ活性測定条件の設定

1) 基質濃度の影響

本酵素活性を測定する際用いる基質の濃度の影響を知る必要上、基質量を1mgから20mgまで重量を変えて設定し、それに酵素液(粗毒として50 μg)を加え、反応を行い本酵素活性を測定した。その結果Fig. 3が得られた。基質量は、10mgまでは、本酵素活性に影響を与え、酵素活性との間に直線関係が得られた。10mg以上の基質では、本酵素活性はほぼ一定になった。そのため今後本酵素活性を測定する際には、基質は、15mg用いることにした。

2) pHの影響

本酵素の至適pHを求めるにあたっては、前報¹⁾で述べたように、本蛇毒のプロテアーゼ活性の至適pHが、8.0にあたることを参考にして、反応系内のpHを7.5から9.0まで設定し、前述の様に基質は、15mg、酵素液(粗毒として50 μg)加えて、反応を行ない本酵素活性を測定し、至適pHを求めた。その結果、Fig. 4に示した様に、ハブ毒コラゲナーゼの至適pHは、プロテアーゼの場合と同様に8.0であった。

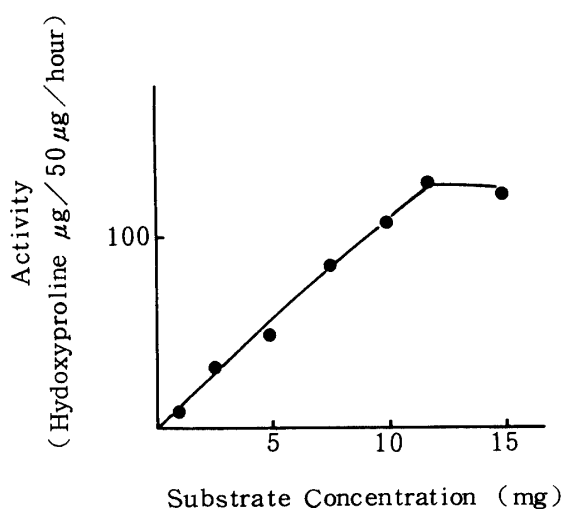


Fig. 3 Effect of Substrate Concentration on Habu Venom Collagenase Activity.

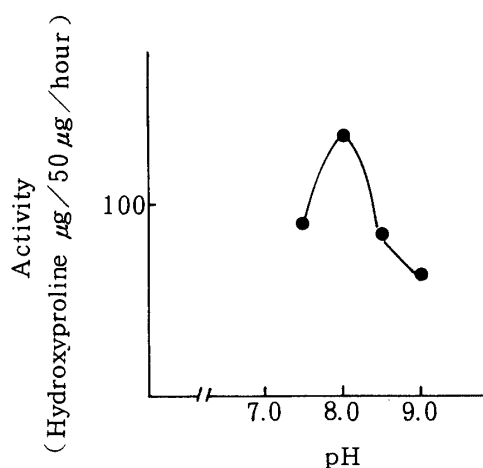


Fig. 4 pH Dependence of Habu Venom Collagenase Activity.

3) 反応温度の影響

前述の結果をもとにして基質量は、15 mgにし、それに酵素液（粗毒として50 μg ）を加え、反応 pH を8.0に調整したのち、反応温度を30 $^{\circ}\text{C}$ から65 $^{\circ}\text{C}$ まで種々変えて反応を行ない、本酵素活性を測定し、至適反応温度を求めた。Fig. 5に示したように、本酵素の至適反応温度は60 $^{\circ}\text{C}$ であり、プロテアーゼとは、異なっていた（50～55 $^{\circ}\text{C}$ ）¹⁾。

4) 反応時間の影響

同様にこれまでの結果をもとにして、基質15 mg、酵素液（粗毒として50 μg ）を加え、反応液のpHを8.0に調整し、又反応温度を60 $^{\circ}\text{C}$ にし、反応時間を10分から180分まで種々変えて反応を行ない、本酵素活性におよぼす反応時間の影響を調べた。Fig. 6に示したように、反応時間60分までは、本酵素活性は、反応時間に比例し直線的に増大した。この結果をもとにし、本酵素反応の反応時間は、60分間行なうことにした。

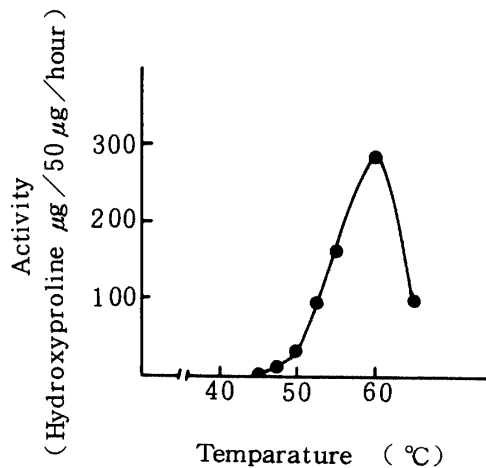


Fig. 5 Relationship of Habu Venom Collagenase Activity to Reaction Temperature.

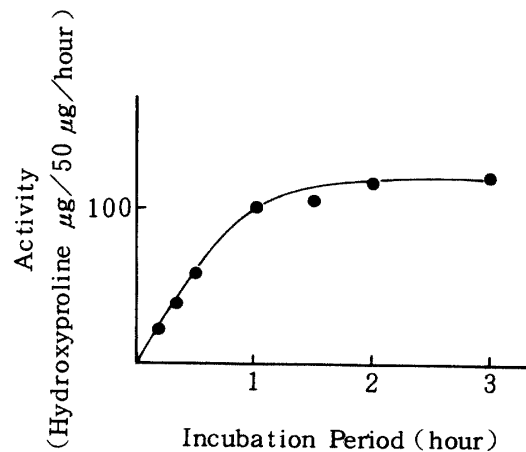


Fig. 6 Habu Venom Collagenase Activity as a Function of Incubation Time.

5) 酵素濃度の影響

最後に基質15 mgに、酵素液として1 ml当り、粗毒10 μg から200 μg まで種々変えて調整したものを加えたのち、反応 pH を8.0に調整したのち、反応温度60 $^{\circ}\text{C}$ で60分間反応を行ない酵素濃度と本酵素活性との関係調べた。その結果、Fig. 7に示したように、本酵素活性は、酵素量200 μg までは、本酵素活性に比例し、直線的に増した。

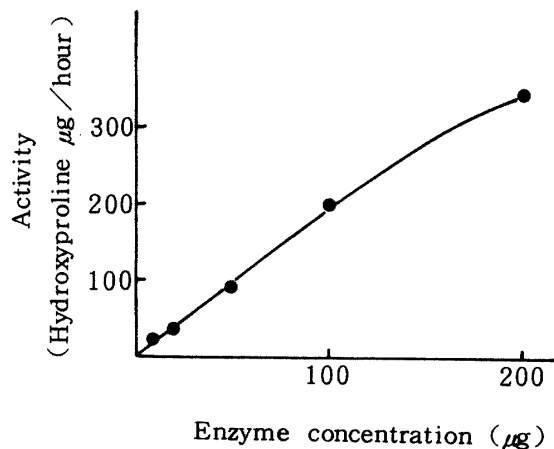


Fig. 7 Effect of Enzyme Concentration on Habu Venom Collagenase Activity.

4. 精製

1) アフィニティクロマトグラフィー

Fig. 8に示したように、基質として用いている不溶性コラーゲンとハブ毒を同図のように加え、反応を行ない、遠心し、得られるSup Iについて、本

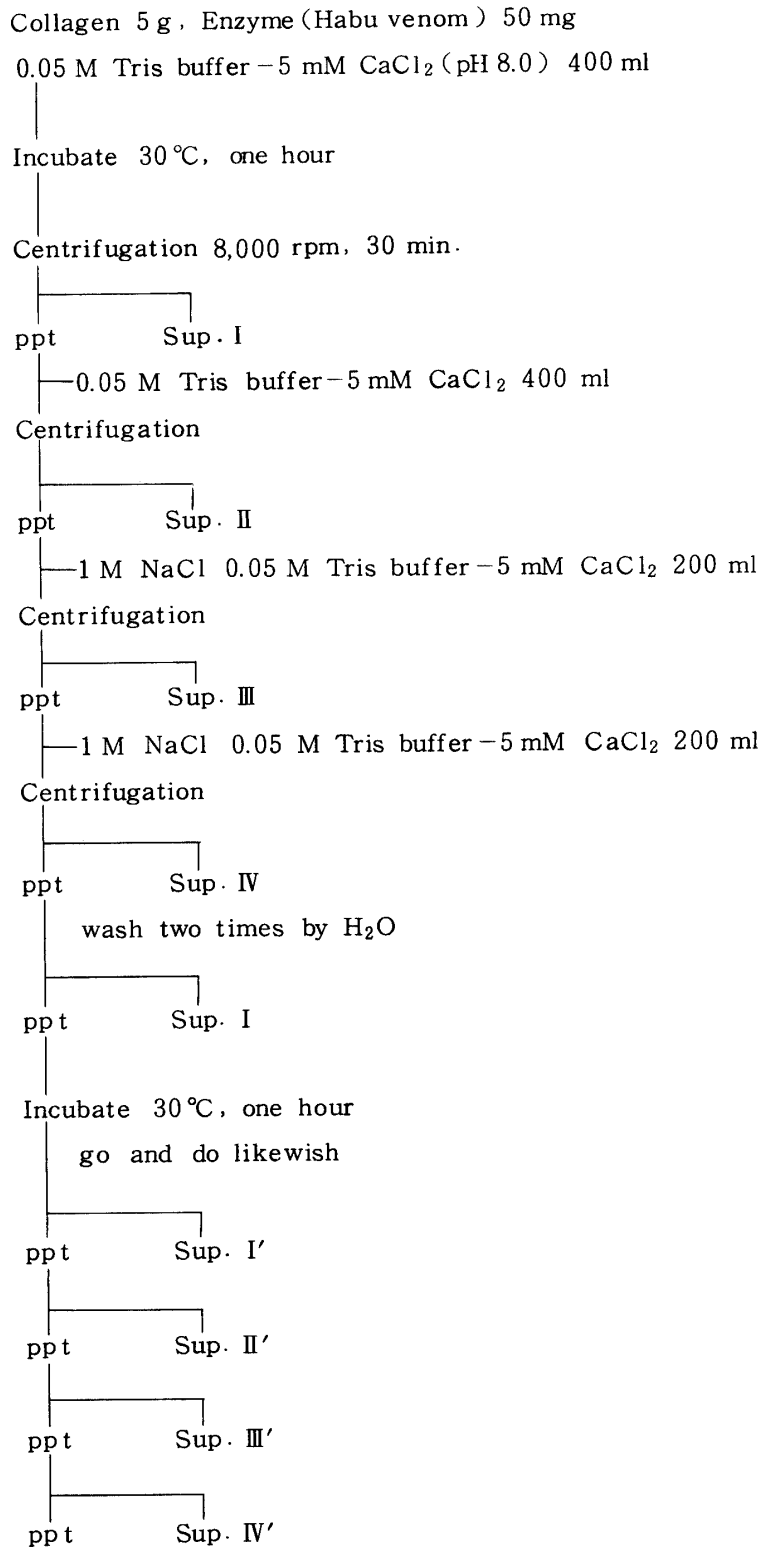


Fig. 8 Purification of Collagenase by Batch Method

酵素活性を測定した結果、本酵素活性は、粗毒の約20%であった。またその時得られる沈殿物を同図のように1M塩化ナトリウムを加えた緩衝液で溶出すると、Sup. IIIが得られるが、この分画を透析し、脱塩し、濃縮したのち本酵素活性を測定した結果、本酵素活性は、粗毒の約80%であった。また本酵素を基質に吸着させる際の反応温度の影響を調べた結果、反応温度25℃から60℃の範囲では、吸着率の有意差は、殆んど見られないため、本研究では、本酵素及び基質の安定上、その吸着反応温度は、30℃で行なった。また吸着反応を行う際の基質濃度の影響についても検討した結果、ハブ毒を用いる場合は、その基質量は、酵素量の300倍が適当であった。本研究では、基質、酵素量を節約するため、基質量は、酵素量の約100倍を用いた。また本研究では、実験の都合上Sup III', Sup IV'混合分画について、さらに以下のような精製を行なった。

2) セファデックスG-75ゲルカラムクロマトグラフィー

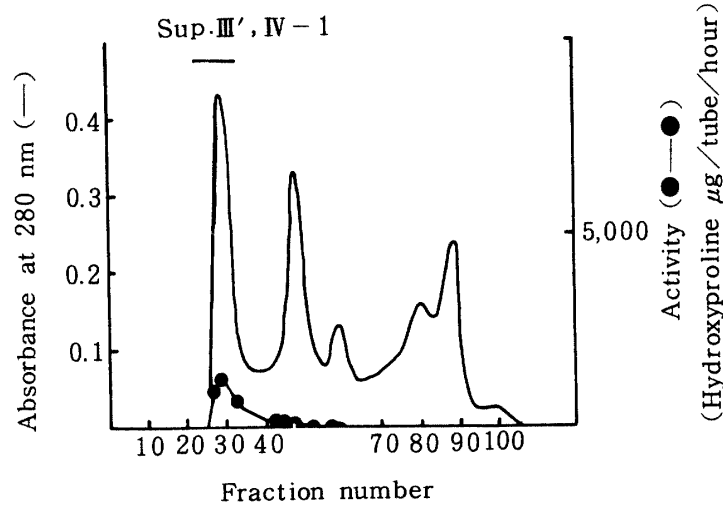


Fig. 9 Sephadex G-75 Column Chromatography of Sup. III', IV'. Elution buffer: 0.05 M Tris buffer-5 mM CaCl (pH 8.0) Column size: 15 ml/hour, One fraction: 5 ml.

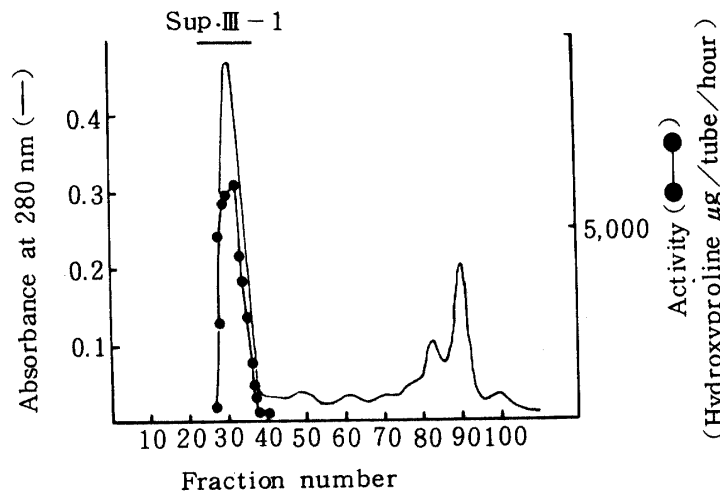


Fig. 10 Sephadex G-75 Column Chromatography of Sup. III. Elution buffer: 0.05 M Tris buffer-5 mM CaCl (pH 8.0) Column size: 2.2×114 cm, Flow rate: 15 ml/hour, One fraction: 5 ml.

先に得た Sup. III', Sup. IV' 混合分画をセファデックス G-75 ゲルカラムにのせ溶出した結果, 主要タンパクピークが5個見られたが, 本酵素活性は, このカラムを素通りしたと思われる最初の大きなタンパク質ピークのみで見られた。その結果は, Fig. 9 に示した。一方 Sup. IV 分画を同カラムにのせ, 溶出した結果, タンパクピークは, 素通りと思われる部分で大きく現われ, また最後の部分でも2つ現われた。また最後の部分でも2つ現われた。ところが本酵素活性は, 先に行なったカラムと同様に, 素通りと思われる大きなタンパク質ピークで見られた。その結果は, Fig. 10 に示した。

3) セファデックス G-150 ゲルカラムクロマトグラフィー

セファデックス G-75 ゲルクロマトグラフィーにかけて得られた活性分画をさらに精製する必要上, 今度は, セファデックス G-150 ゲルカラムクロマトグラフィーを行なった。先に得た活性分画 Sup. III, IV'-1 を同カラムにのせ, 溶出した結果, タンパク質ピークは, 全般的に低くなり, 素通りと思われるピークとその直後で主要タンパク質ピークが見られた。本酵素活性は, 両タンパク質ピークの間で見られた。その結果は, Fig. 11 に示した。同カラムクロマトグラフィーによって得られた活性部分は, 主要活性分画 Sup. III', IV'-1 A (Fr 33~42) と Sup. III' IV'-1 B (Fr 43~52) に分けておき, 次にこれらについて純化度, 基質特異性を調べた。また Sup. III-1 も同カラムにのせ溶出した結果, 素通りと思われる部分で主要タンパク質ピークがあらわれた。本酵素活性も同ピークの後部に現われた。その結果は, Fig. 12 に示した。この活性分画 (Fr 32~40) についても同様に純化度, 基質特異性を調べた (後述)。以上記述してきた精製過程をまとめると Table 2 のようになる。ハブ毒中の本酵素をアフィニティクロマトグラフィーを行ない, セファデックス G-75, 150 ゲルカラムクロマトグラフィーにかけて精製した結果, 2つの活性分画が得られた。アフィニティクロマトグラフィーを行ない得られる最も活性の高い分画 Sup. III は, 順次セファデックス G-75, 150 カラムクロマトグラフィーを行うことにより, 活性を示す部分のタンパク質含量は, 6.5% まで減少した。また本酵素活性も同様に減少した。また本酵素活性も同様に減少しているため, 純化率は低く 1.13 倍であった。一方 Sup. III', IV' 分画の場合は, 同様にゲル透過を行なうことにより, タンパク質量は減少したが, 酵素活性は, Sup. III' 分画の場合のように, 減少が著しくないので, その純化率は, わずかながら高くなった。

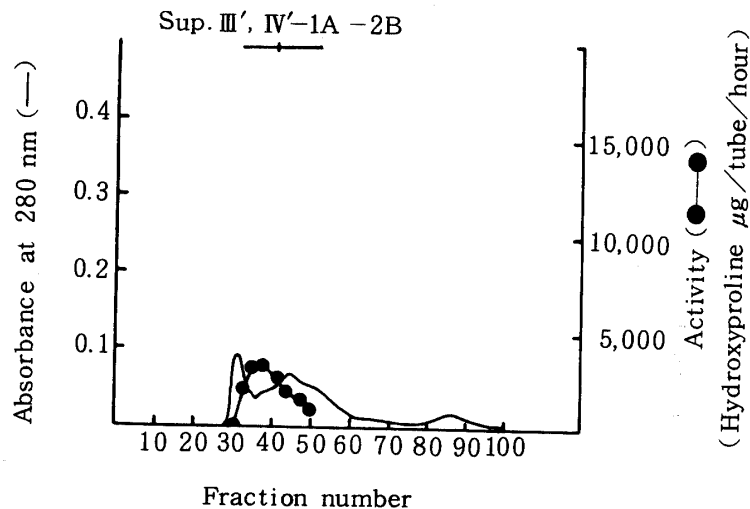


Fig. 11 Sephadex G-150 Column Chromatography of Sup. III', IV'-1
 Elution buffer: 0.05 M Tris buffer - 5 mM CaCl (pH 8.0)
 Column size: 2.2 × 114 cm, Flow rate: 15 ml/hour, One fraction: 5 ml.

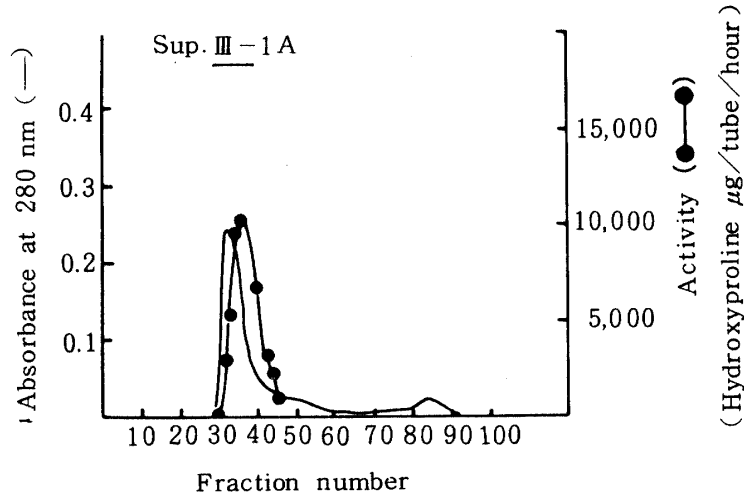


Fig. 12 Sephadex G-150 Column Chromatography of Sup. III-1. Elution buffer: 0.05 M Tris buffer-5 mM CaCl (pH 8.0) Column size: 2.2 \times 114 cm, Flow rate: 15 ml/hour, One fraction: 5 ml.

Table 2 Summary of Purification of Collagenase from *T. flavoviridis* venom

	Protein mg	%	Total Activity	%	Specific Activity (Hydro. $\mu\text{g}/100\mu\text{g}/1\text{hr.}/60^\circ\text{C}$)	Purification
Crude Habu Venom	100	100	1,346,400	100	1,346.4	1.0
Sephadex G-75 Sup. III Fr. 27 - 36	15.58	15.6	27,651.28	20.5	1,773.11	1.32
Sephadex G-75 Sup. III/IV' Fr. 26 - 35'	11.30	11.3	61,561.39	4.6	544.79	0.40
Sephadex G-150 Sup. III-1 Fr. 32 - 40	6.49	6.5	98,477.55	7.3	1,517.37	1.13
Sephadex G-150 Sup. III, IV-1 Fr. 33 - 42	2.76	2.8	36,159.24	2.7	1,310.11	0.97
Sephadex G-150 Sup. III, IV-1 Fr. 43 - 52	3.36	3.4	18,192.03	1.4	541.43	0.40

5. 基質特異性

ハブ毒をアフィニティクロマトグラフィーおよびゲル透過法にかけて精製し、得られたコラゲナーゼ活性分画 Sup. III-1A, Sup. III', IV'-1A および Sup. III', IV'-1B 分画についてコラーゲン、カゼイン、ヘモグロビンに対する基質特異性を調べた。その結果は、Table 3 に示した。コラゲナーゼ活性

は, Sup.Ⅲ-1A分画で最も高い値を示した。カゼイン活性は, Sup.Ⅲ', IV'-1B分画では, 高い値を示したが, Sup.Ⅲ-1Aは, 低い値であった。ヘモグロビン消化活性は, いずれの分画でも活性を示さなかった。

Table 3 Substrate Specificity of Partially Purifying Collagenase in Habu Venom

	Crude	Sup.Ⅲ-1a	Sup.Ⅲ', IV'-1a	Sup.Ⅲ', IV'-1b
Collagen (Hydroxyproline $\mu\text{g}/50 \mu\text{g}/\text{hour}$)	673.20	758.69	655.06	270.72
Casein (O. D. 660/ $50 \mu\text{g}/30 \text{min}$)	0.324	0.093	0.114	0.201
Hemoglobin (O. D. 660/ $50 \mu\text{g}/30 \text{min}$)	-	0	0	0

6. ディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動

ハブ毒を上述の様に精製し得られるコラゲナーゼ活性3分画について, その純度を知るため, ディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。Sup.Ⅲ-1A分画は, ゲルの上部で, 2個のタンパク質バンドが見られた。Sup.Ⅲ', IV'-1Aも上部付近で2~3個のタンパク質バンドが見られた。Sup.Ⅲ', IV'-1Bの場合は, 上部で薄いバンドが, 中央部付近で濃いタンパク質バンドが見られた。これらの結果は, Fig. 13に示した。また精製したこれら3活性分画について, 同電気泳動法により, カゼイン消化活性を調べた。前報¹⁾で述べたように分離用ゲルには, 0.8%カゼインを加えて調製した。これらの3活性分画は, Fig. 14に示したように, いずれの分画ともカゼインを消化し, 5項で述べたようにカゼイン消化活性を有することが再確認することが出来た。

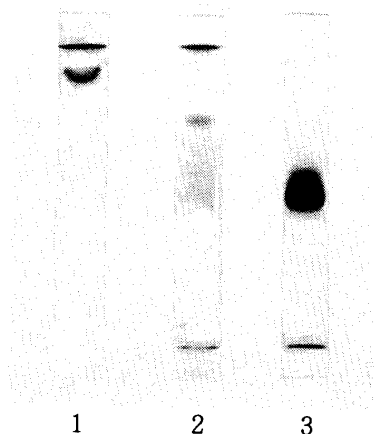


Fig. 13 Disc Gel Electrophoresis Pattern of Purified Enzyme

1: Sup.Ⅲ-1a,
2: Sup.Ⅲ', IV'-1a
3: Sup.Ⅲ', IV'-1b

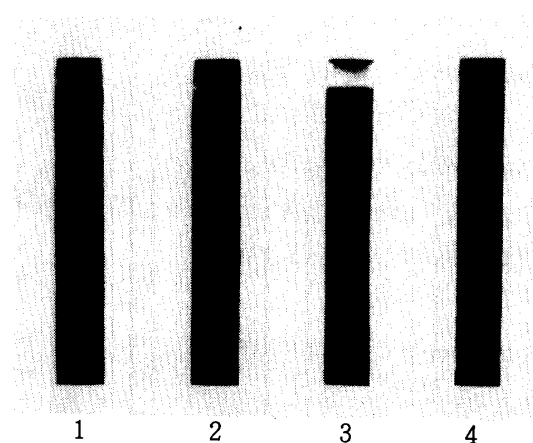


Fig. 14 Disc Gel Electrophoresis Pattern of Sup.Ⅲ-1A, Sup.Ⅲ', IV'-1A and Sup.Ⅲ', IV'-1B in Casein Gel

1: Sup.Ⅲ', IV'-1A, 2: Sup.Ⅲ', IV'-1B,
3: Sup.Ⅲ-1A, 4: Blank

次に精製したコラゲナーゼ活性分画 Sup.Ⅲ-1A を基質として用いる不溶性コラーゲンに作用した場合の水解生成物の組成を調べるため、前述の酵素反応と同様に、不溶性コラーゲン 15 mg とこの活性分画 (50 μ g) 溶液を 60°C で 60 分間反応を行い、遠心し、上清を得、これを同電気泳動にかけた。この結果は、Fig. 15 に示した。酵素液だけの場合は、タンパク質量が少ないため、バンドは、見られなかった。基質液のみの場合は、ゲルの上部で、バンドが見られ、そのバンドは次に示した可溶性コラーゲンのバンドとその組成が、よく類似していた。その活性分画を作用させた場合は、中央部で、数多くのバンドが見られた。同様に粗毒を作用させた場合にも、数多くのバンドが見られ、その組成は、その活性分画を作用させた場合と類似していた。

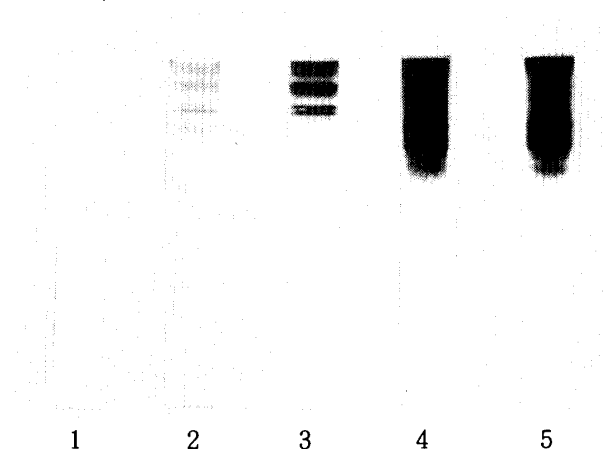


Fig. 15 Disc Gel Electrophoresis Pattern of Enzyme, Substrate and Reaction Products

1: Crude enzyme (Habu venom), 2: Bovine Achilles Tendon insoluble collagen, 3: Calf Skin soluble collagen, 4: Reaction mixture of Bovine Achilles Tendon insoluble collagen (15 mg) with crude enzyme (50 μ g), 5: Reaction mixture of Bovine Achilles Tendon insoluble collagen (15 mg) with purified enzyme (50 μ g).

IV 考 察

本研究では、コラゲナーゼ活性を測定する際、基質として不溶性コラーゲンを用いた。村松・垣花等⁹⁾もヒゲナガエビの肝臓中のコラゲナーゼ活性を測定するのに同不溶性コラーゲンを用いている。この様に酵素活性を測定する際、不溶性基質を用いることには、いろいろ長所短所があると思われるが、本研究では、前述の様に、本酵素を精製する段階で、酵素基質間の親和性を利用し、アフィニティクロマトグラフィーを行う目的であえて不溶性コラーゲンを用いている。また本酵素性を測定するために用いた基質量は、村松・垣内等の用いた量とは、異なり、著者等の方が多し。その量は、酵素濃度等に左右されるが、恐らくは、ハブ毒の方が本酵素濃度が高いため、その基質量も多くなっているものと思われる。また酵素源のちがいで異なるものと考えられる。

J. Jeffrey, Gross²⁾や佐藤、池田¹²⁾および村松・垣内等⁹⁾の報告しているコラゲナーゼの至適 pH は 7.5~8.5 である。このハブ毒コラゲナーゼの場合も、その pH は、8.0 であり一致している。

コラゲナーゼの至適温度は、ヒゲナガエビ肝臓の場合、40°C であるのに対し、ハブ毒の場合は

60℃であることから、この値は、動物によって異なって来るものと思われる。また一方コラーゲン分子は、溶液状態では、30℃以上に加熱すると急激に変性し、ゼラチンに変わることも知られているところから、この基質の場合も60℃で60分間反応を行なっているため、ゼラチン様に変性しているとも考えられる。またこの基質は、60℃で1時間加温し、遠心し、得られる上清では、ヒドロキシプロリン含量が著しく低いこと、またこの上清をデスクゲル電気泳動にかけても、可溶性コラーゲンのバンドが濃くならないことから、この様な加温処理では、殆んど可溶化しないものと思われる。

Sup.ⅢおよびSup.Ⅲ'、Ⅳ分画を各々セファデックスG-75カラムクロマトグラフィーにかけた結果、溶出してきたタンパク質ピークは、Fig. 9とFig. 10に示したように著しい差異が見られた。これは、吸着支持体として用いているコラーゲンが、1M食塩溶液で処理しているため、それにより、このコラーゲンが或る程度可溶化等をひきおこし、その組成が変化し、それにより、その支持体の親和性も異なってきたと思われる。またこの両溶出分画の基質特異性を調べた結果でも、Sup.Ⅲ分画は、カゼイン活性が低い値であったのに対し、Sup.Ⅲ'Ⅳ分画は、この値が高い値を示していることからこの支持体として用いているコラーゲンに上述の様な変化がおこっているものと思われる。一方この親和力の点では、問題があり、このコラーゲン使用量は、酵素源としてハブ毒を用いる場合、この毒の300倍量が適当であるのに対し、この実験の場合は、用いたコラーゲンの節約上100倍用いているために、この毒の量が過剰になっているとも考えられる。また、このアフィニティクロマトグラフィーによって得られたSup.分画とSup.Ⅲ'Ⅳ分画をさらに精製してもこの酵素の純化倍率は低い値を示しているが、これは、次の精製過程でこの両分画をSephadex G-75カラムにかけるとFig. 10と11で示したように素通りと思われるタンパク質ピーク付近で活性ピークが見られ、また前報で述べたサキシマハブ毒の場合は、同カラムにかけた場合、比較的后部で、コラゲナーゼ活性ピークが見られていることなどから、恐らくは、この場合、本酵素は、支持体として用いているコラーゲンと或種の親和力で結合し、結合したまま1M食塩溶液で溶出されており高分子化しているのではないかと思われる。この結合体が解離してはじめてその純化倍率も高くなるものと予想される。現在検討中である。

V 要 約

ハブ毒を不溶性コラーゲンに作用し、生成してくる可溶性ペプチド中のヒドロキシプロリン含量を定量することにより、ハブ毒コラゲナーゼ活性を求めた。この酵素の至適pHは、8.0であり、至適温度は、60℃であった。この不溶性コラーゲンにこの酵素を吸着させ(30℃, 60分反応)、遠心し、1M食塩溶液で溶出し、本酵素を精製した。本酵素の吸着率は、80%であった。また溶出率も80%であった。このコラーゲンと粗毒の添加割合は、300:1の時本酵素の吸着率は、最大であった。

この精製酵素をさらにセファデックスG-75, G-150ゲルカラムクロマトグラフィーにかけ純化した結果、その純化倍率は、約1.13倍になった。この純化酵素は、ディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動的に2個以上のバンドが見られ、またコラゲナーゼ活性以外にカゼイン水解活性も見られた。

VI 引 用 文 献

1. 知念 功, 真栄田義昭, 保良和政, 四方治五郎 1978 サキシマハブ毒のプロテアーゼに関する研究 琉球大学農学部学術報告 25: 203-216
2. Donoff, R. B. McLendon, J. E. and Grillo, H. C. 1971 Wound healing: biochemical events and potential role of collagenase Biochim. Biophys. Acta. 227 639-653.

3. Eisen, A. Z. Jeffrey, J. J. and Gross, J. 1968 Human skin collagenase - isolation and mechanism of attack on the collagen molecule. *Biochim. Biophys. Acta.* **151** 637 - 645.
4. Evanson, J. M. Jeffrey, J. J. and Kran, S. M. 1967 Human collagenase: identification and characterization of an enzyme from Rheumatoid Synovium in culture. *Science* **158**, 499 - 502.
5. Gross J. and C. M. Lapiere, 1962 Collagenolytic activity in amphibian tissues - tissue - culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1014 - 1022.
6. Grotto, L. et. al 1963 Isolation of *Vipera palaesin* hemorrhagin and distinction between its hemorrhagic and proteolytic activities. *Biochim. Biophys. Acta.* **133**, 356 -
7. Jeffrey J. J. and Gross, J. 1970 Collagenase from rat uterus. Isolation and partial characterization. *Biochem.* **9**, 268 - 273.
8. Kaiser E. and H. Michel 1958 *Die Biochemie der Gift* Franz Deutcke,
9. 村松 毅, 垣内宏通 1978 ヒゲナガエビ肝臓中のタンパク質分解酵素, 水大研究報告 **44** 171 - 174
10. Murata, Y. Satake, M. and Suzuki, T. 1963 Studies on snake venom XII. Distribution of proteinase activities among Japanese and Formosan snake venoms. *J. Biochem. (Tokyo)* **53**, 431
11. Ohsaka, A. 1960 Proteolytic activities of Hubu venom and their separation from lethal toxicity. *Japan, J. Med. Sci. Biol.* **13**, 33 -
12. Satake, M. Murata, Y. and Suzuki T. 1963 Studies on snake venom XIII, Chromatographic separation and properties of three proteinases from *Agkistrodon halys blomhoffii* venom. *J. Biochem. (Tokyo)* **53**, 438 -
13. Tokoro, Y. Eisen, A. Z. and Jeffrey, J. J. 1972 Characterization of a collagenase from rat skin. *Biochim. Biophys. Acta.* **258** 289 - 302
14. Yoshinaka, R. Sato, M. and Ikeda, S. 1973 Studies on collagenase of fish - I. Existence of collagenolytic enzyme in pyloric caeca of *Seriola quinqueradiata*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* **39**, (3) 275 -
15. Woessner, J. R. Jr. 1961 The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch. Biochim. Biophys.* **93** 440 - 447

Summary

Collagenase activity of Habu venom was measured the amount of hydroxyproline of soluble peptide liberated by reaction of the venom and insoluble collagen (60°C, 30 min).

The enzyme activity was maximum at pH 8.0 and at 60°C.

The purification of the enzyme was carried out by being adsorbed onto insoluble collagen (30°C, 60 min), centrifuged, and eluted with 1 M sodium chloride solution. Rate of adsorption of the enzyme was maximum, 80 % for total activity, when ratio of insoluble collagen to the enzyme

was 300 : 1, and the elution also 80 % for activity of the enzyme adsorbed.

Further purification of the enzyme fraction by Sephadex G-75 and G-150 column chromatography was found to be a 6.5 % over all yield and a 1.13 fold increase in specific activity.

The purified enzyme revealed two more bands by disc gel electrophoresis and hydrolysed casein.