

琉球大学学術リポジトリ

オニヒトデ胃部のコラーゲナーゼ, 酸性プロテアーゼに関する研究(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: 四方, 治五郎, 江川, 義和, 宮良, 生金, 知念, 功, Yomo, Harugoro, Egawa, Yoshikazu, Miyara, Seikin, Chinen, Isao メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4195

オニヒトデ胃部のコラーゲナーゼ, 酸性プロテアーゼに関する研究***

四方 治五郎*・江川 義和*
宮 良生金**・知念 功*

Harugoro YOMO, Yoshikazu EGAWA, Seikin MIYARA and Isao
CHINEN : Studies on collagenase and acid protease in stomach
of *Acanthaster planci*

I 緒 言

著者等は既にオニヒトデ胃部にコラーゲナーゼ⁵⁾, 酸性プロテアーゼ⁴⁾の存在することを報告したが, 両酵素はその至適pHがいずれも2.0附近にあり, これが異った酵素があるかどうか明かではなかった。今回著者等は両酵素の分離精製を試み, 又その性質を調べた所, 両酵素の性質に著しい類似性が見られたのでここに報告する。

II 材料及び方法

1 材 料

沖縄本島近海で採取したオニヒトデを -20°C で凍結して保存し, 使用時 0°C にて全胃部を切り出し用いた。不溶コラーゲンはSigma社の牛アキレス腱コラーゲンType Iを用いた。ヘモグロビンはMiles社 酵素基質用を用いた。Diaoacetyl-D,L-norleucine methylester (DAN)はSigma社より, 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propane (EPNP)は生化学工業より, p-bromo-phenacyl bromide (BpB), ethylene diaminetetraacetate (EDTA)は半井薬品より購入した。CM-セルロース, DEAE-セルロースはBrown社より, ペプシン(1:10,000)は和光純薬より購入した。

2 粗酵素標品の作成

前報⁴⁾に示す如く胃部をhomogenizeした後抽出し, 85%になる様アセトンを加え, その沈澱を集めて乾燥し, アセトン粉末酵素標品E1を得た。

* 琉球大学農学部農芸化学科
** 沖縄食糧事務所
*** 本研究の一部は文部省科学研究費補助金(課題番号266041)に依る。
琉球大学農学部学術報告 25: 185~193 (1978)

3 プロテアーゼ活性の測定

醋酸-塩酸緩衝液(0.05 M, pH 2.0) に溶かした1%ヘモグロビンを基質とし、この2 mlに酵素液1 mlを加え36°Cにて2 hr 反応せしめた後遊離されたペプチドをLowry 法にて測定した。1 分間にOD₆₆₀ を0.001 増加せしめるプロテアーゼ活性を1 単位(u)とした。

4 コラーゲナーゼ活性の測定

Etherington⁽¹⁾の方法に準じて行った。即ち不溶コラーゲン30 mgに醋酸-塩酸緩衝液(0.05 M, pH 2.5) 10 ml を加え、ガラス・ホモゲナイザーで0°C, 30 秒間ホモジェナイズしたものを基質とした。このホモジェネート2 mlに酵素液1 mlを加え、36°C, 4 hr 反応せしめ、遊離された可溶ペプチド中のヒドロキシプロリンをWoessner⁽³⁾の方法で定量した。コラーゲナーゼ活性の単位(A)は上記条件で1 hr に1 μ gのヒドロキシプロリンを遊離せしめる酵素量とする。

5 CM-セルロース DEAE-セルロースを用いる両酵素の吸着実験(バッチ法)

CM-セルロース又はDEAE-セルロース各10 ml を所定のpHの緩衝液(0.01M)にて平衡化した後吸引濾過して各セルロースのケーキを得る。E1 200 mgを10 mlの同じ緩衝液に溶かしたその遠心澄清を上記のケーキに加え、4°Cにて1 hr 放置した。後吸引濾過を行いその濾液を非吸着酵素液とした。他方濾過した後のケーキに10 mlの同じ緩衝液を加え洗滌し、濾過後のケーキに10 mlの同じ緩衝液に0.5 Mの食塩を加えたものに加え4°C 1 hr 放置後吸引濾過する。その濾液を溶出酵素液とする。使用した緩衝液は次の通りである。

pH 3.0: 醋酸-塩酸, pH 5.0: 醋酸-醋酸ソーダ, pH 6.0: クエン酸-苛性ソーダ, pH 7.5, 8.5: トリス-塩酸, いずれの緩衝液にもCa⁺⁺を5 m M 含有せしめた。

6 セファデックス・カラムクロマトグラフィ

1, セファデックスG-50, 3 \times 130 cmのカラムを用いE1 標品5 gを使用した。0.05 M トリス-塩酸緩衝液(pH 7.0, Ca⁺⁺ 5 m M 含有)で溶出を行った。酵素活性部分(#37-#80)を凍結乾燥しE2 標品として使用した。

2, セファデックスG-150 1.6 \times 95 cmのカラムを用い、セファデックスG-50 で得たE2 標品を使用した。溶出はセファデックスG-50 の場合と同じ緩衝液を用いた。

III 結果及び考察

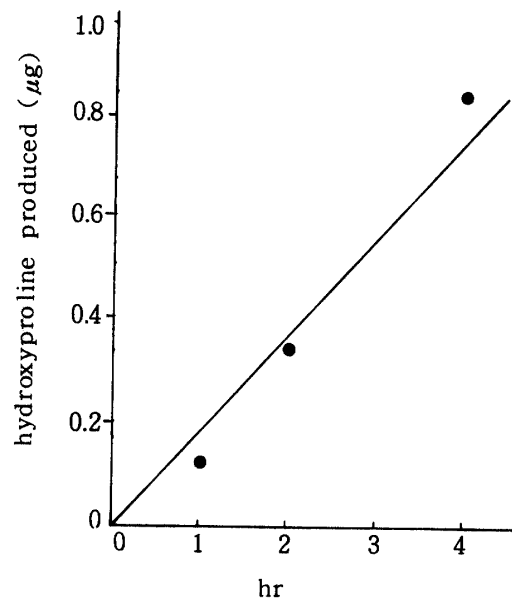
1 コラーゲナーゼ活性について

1, 測定条件 反応時間を1~4 hr の間で変化せしめた所(Fig. 1) その間で略直線関係が得られた。

2, 至適pH 反応時間4 hr で、pH 1.5, 2.0, 2.5, 3.0で酵素活性を調べた所至適pHは2.0においてみられた。

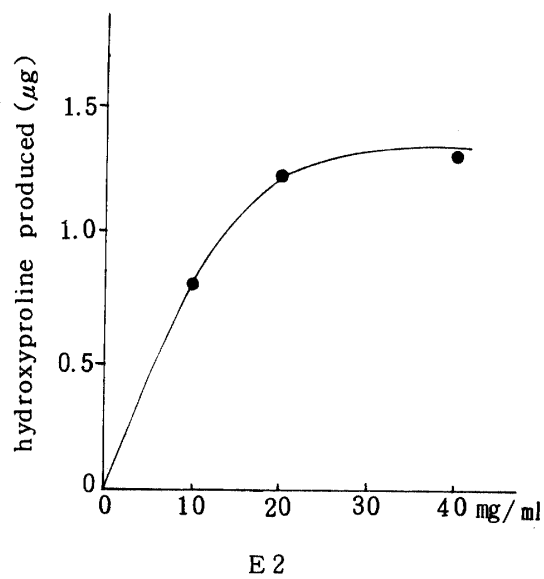
3, 分解限度 E2 酵素標品を用い酵素量を40 mg/ml まで増加せしめた所、20 mg/ml 以上では著しいヒドロキシプロリン量の増加が見られなかった。40 mg/ml の場合生成したヒドロキシプロリン量より、不溶コラーゲンのヒドロキシプロリン含量を10%として計算すると使用した不溶コラーゲンの32%が加水分解されたことになる。(Fig. 2)

Fig. 1. Effect of reaction period in collagenase assay



E2 enzyme preparation 20 mg/ml.
Reaction temperature 36°C.

Fig. 2. Effect of enzyme concentration in collagenase assay



Reaction temperature 36°C.
Reaction period 4 hrs.

2 硫酸アンモニウム分画について

E1 標品 400 mg を 10 ml の トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5, 10mM Ca^{++} 含有) に溶かし, これに硫酸アンモニウムを 0.4, 0.6, 0.9 飽和になる様加え, 遠心分離したその沈澱を同じ緩衝液にとかして, プロテアーゼ, コラーゲナーゼの活性を測定した。結果は Table 1 の如くである。即ちプロテアーゼ活性もコラーゲナーゼ活性も飽和度が高くなると共に酵素活性の収率が高く, 酵素活性がある硫酸アンモニウムの飽和度に集中することがなかった。

Table 1. Fractionation by ammonium sulfate

	relative activities of precipitated enzymes	
	Protease	Collagenase
original	100	100
0.4 sat.	18	20
0.6 sat.	69	45
0.9 sat.	107	76

3 CM-及び DEAE-セルロースに依る吸着実験

CM-セルロースの場合 (Table 2) は pH 5.0, 6.0 のいずれにおいても プロテアーゼもコラーゲナーゼも吸着されなかった。DEAE-セルロースの場合 (Table 3) は, pH 3.0, 5.0, 7.5, 8.5, において非吸着のプロテアーゼの 50% 近くの活性が吸着され 0.5 M 食塩にて溶出された。コラーゲナーゼの場合は非吸着の酵素活性の 50-100% が吸着され, 両酵素活性の性質の間に若干の差が (特に pH 5.0 において) みられた。

Table 2. Adsorption of protease and collagenase of *A. planci* by CM cellulose

Protease	relative activities (original 100)		
	adsorption	not adsorbed	eluted by
	pH		0.5 M NaCl
	5.0	66	6
	6.0	59	8
Collagenase	5.0	92	5
	6.0	81	0

Experimental details are described in the text.

4 セファデックス G-50, G-150 カラムクロマトグラフィに依る精製

1, セファデックス G-50 カラムクロマトグラフィ (Fig. 3) コラーゲナーゼ活性もプロテアーゼ活性も殆ど最初に溶出してくるタンパクのピークに一致した。

2, セファデックス G-150 カラムクロマトグラフィ (Fig. 4) プロテアーゼ活性は最初に溶出するタンパク (OD₂₈₀) のピークの直後に溶出して来た。コラーゲナーゼ活性のピークの 1 つ (II) (フラクション # 32 - # 41) はプロテアーゼ活性のピークと略一致したが, 他のひとつ (I) (フラクション # 20 - # 31) はプロテアーゼのピークの前に出現した。この分画のプロテアーゼ活性は極めて低かった。

Table 3. Adsorption of protease and collagenase of *A. planci* by DEAE cellulose

	adsorption pH	relative activities (original 100)	
		not adsorbed	eluted by 0.5M NaCl
Protease	3.0	56	29
	5.0	78	28
	6.0	73	0
	7.5	43	19
	8.5	21	1
Collagenase	3.0	31	17
	5.0	36	42
	6.0	34	18
	7.5	55	43
	8.5	21	32

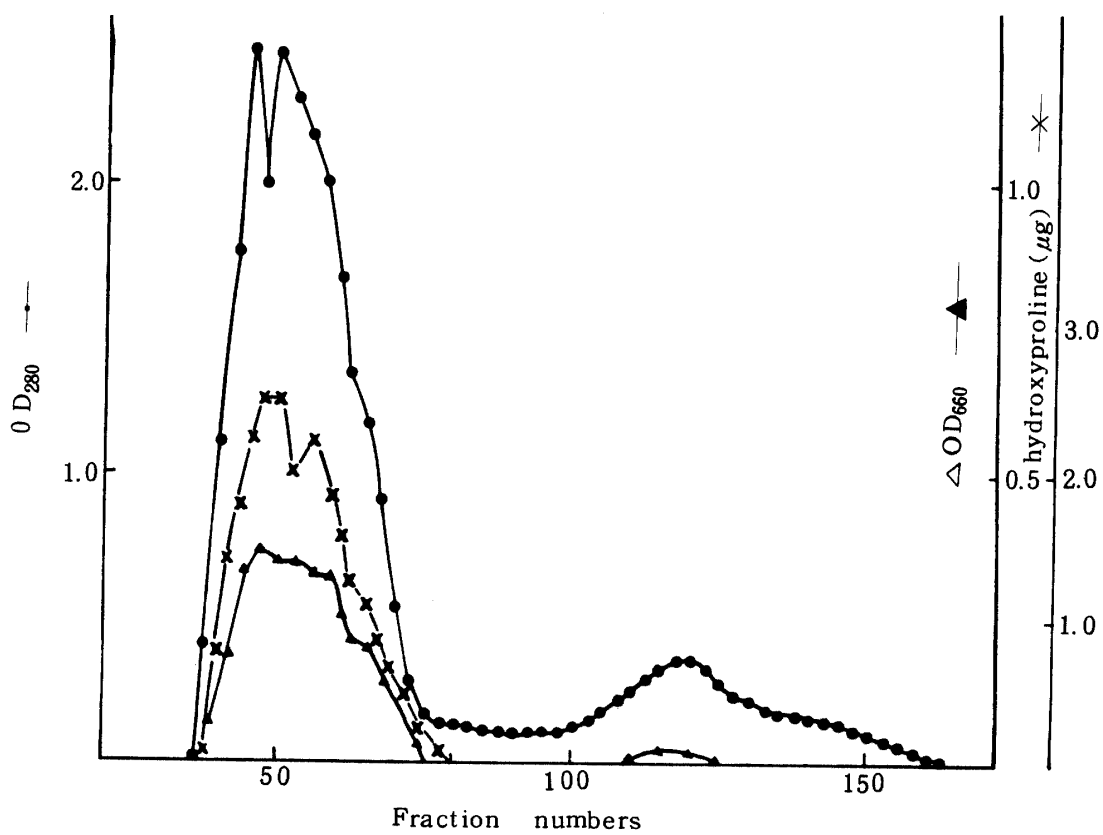


Fig. 3. Sephadex G-50 column chromatography of E1 enzyme preparation of *A. planci*

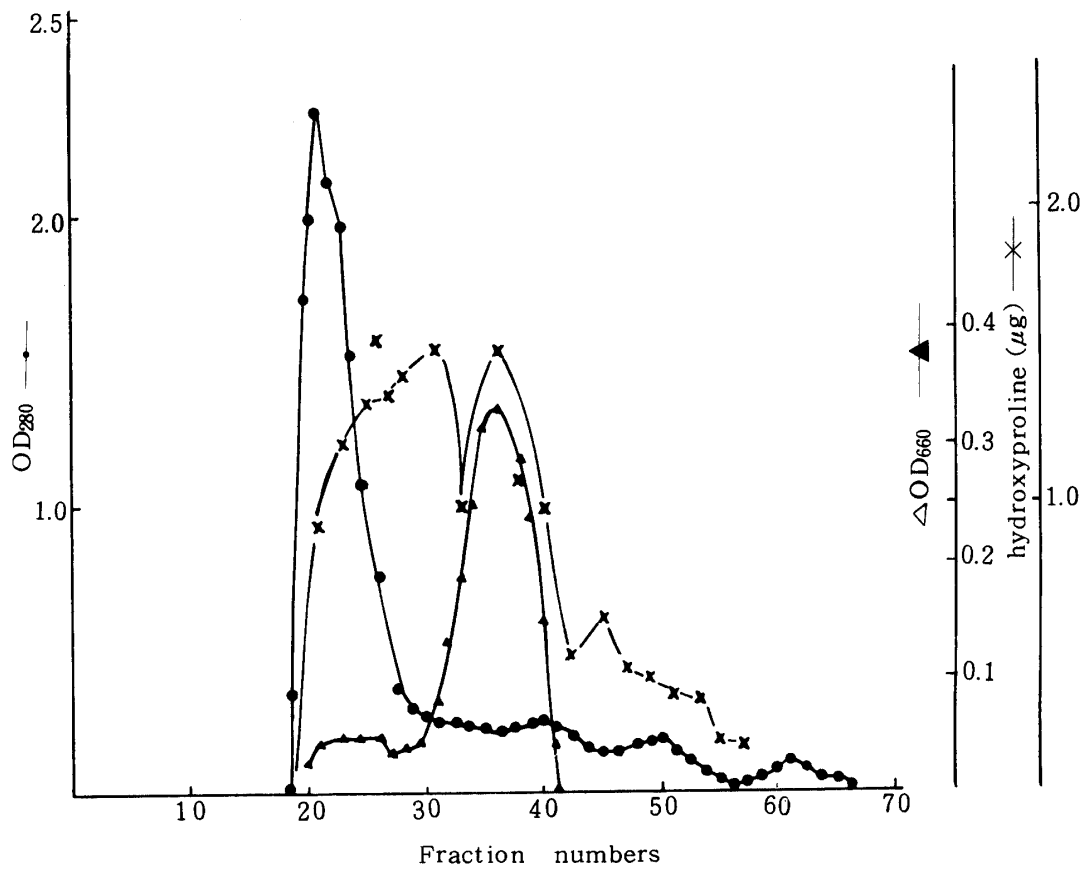


Fig 4. Sephadex G-150 column chromatography of E2 enzyme preparation of *A. planci*

Table 4, Table 5 はファデックス G-150 までの精製の各段階のタンパク量, 比活性, 精製度, 収率を夫夫プロテアーゼ, コラーゲナーゼについてまとめたものである。プロテアーゼの比活性は最終的に約 12 倍に増加し, コラーゲナーゼのそれは約 8 倍となった。又精製の各段階における各標品に含まれるプロテアーゼ活性とコラーゲナーゼ活性の比は E 1 では 2.3, E 2 では 3.1, (II) で 3.1 と殆ど変わりなく, これらの精製を通じて両酵素は殆ど分離しなかった。

Table 4. Protease purification of *A. planci* by Sephadex G-50 and G-150 column chromatography

	Total Protein (mg)	TU	%	U/mg protein	Purifi- cation
E1	925	8550	100	9	1
Sephadex G-50	146	3379	40	46	5.2
Sephadex G-150	39	2379	28	105	12

Table 5. Collagenase purification of *A. planci* by Sephadex G-50 and G-150 column chromatography

	Total Protein (mg)	TA	%	A/mg protein	Purifi- cation
E1	925	3700	100	4	1
Sephadex G-50	146	1540	42	15	3.8
Sephadex G-150 I	117	950	26	12	3.0
II	23	526	14	32	8.0

5 EDTA 透析の両酵素活性に及ぼす影響及び両酵素の金属イオン要求性について

Table 6. Effect of EDTA and metal ions on collagenase and protease of *A. planci*

	collagenase ΔOD_{560}	protease ΔOD_{660}
E2 (10 mg/ml)	0.250	0.242
dialysis against 40 mM EDTA	0.084	0.099
40 mM $CaCl_2$ after EDTA dialysis	0.400	0.192
40 mM $ZnCl_2$ after EDTA dialysis	0.229	0.216
dialysis against distilled water	0.025	0.216

Dialysis was carried out at 4 °C overnight.

Table 6 に示す如くプロテアーゼもコラーゲナーゼもEDTA を外液とする透析の後その活性は夫夫 34%、41%に低下した。この透析後の酵素液に塩化カルシウム、又は塩化亜鉛を最終濃度 40 mM になる様に加えると両酵素活性は共に略透析前の活性に戻った。従って両酵素活性共にその活性の発現の為に Ca^{++} イオン、又は Zn^{++} イオンを必要とするものと思われる。但し水に対し透析した場合コラーゲナーゼ活性は10%にまで低下したが、プロテアーゼの場合は殆ど低下しなかった。即ち両酵素活性の金属イオン要求度においてかなりの差があるものと思われる。

6 プロテアーゼに対するペプシンに特異的な阻害剤の影響

既に述べている如く、オニヒトデ胃部のプロテアーゼの至適 pH は 2.0 でこの酵素は酸性プロテアーゼに属する。この酵素がペプシン様酵素（ペプシンは不溶コラーゲンを可溶化することができる）であるかどうかは、コラーゲナーゼとこのプロテアーゼか同一酵素であるかどうかという観点よりも興味がある。こゝではペプシンに特異的な阻害剤である BpB, EPNP, DAN を用いオニヒトデ酸性プロテアーゼが阻害されるか否かを調べた (Table 7)。結果はいずれの阻害剤もオニヒトデの酸性プロテアーゼを阻害しなかった。従ってこの実験に用いた E2 標品の有するコラーゲナーゼ活性は、ペプシンの有する不溶コラーゲンの可溶化（ペプシンはコラーゲン構成分子であるトロポコラーゲンを加水分解しないが、そのトロポコラーゲン間の結合を切ることに依り不溶コラーゲンを可溶にするといわれて居る⁽²⁾）の作

Table 7. Effect of several pepsin specific inhibitors on activity of pepsin and a protease from stomach of *A. planci*

		Final concentration (mM)	Incubation time	Relative activity (%)
BpB	Pepsin	3×10^{-1}	4 °C 3day	71
	<i>A. planci</i>	3×10^{-1}	4 °C 4day	87
EPNP	Pepsin	4×10^{-1}	4 °C 3day	51
	<i>A. planci</i>	4×10^{-1}	4 °C 4day	100
DAN*	Pepsin	9.5×10^{-3}	25 °C 0 hr	99
			3 hr	11
	<i>A. planci</i>	9×10^{-3}	25 °C 0 hr	95
			3 hr	93

BpB : p-Bromophenacyl bromide

EPNP : 1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propane

DAN : Diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester

* 10^{-4} M (final concentration) of CuSO_4 was used.

用とは別の作用であると考えられる。これは著者等がオニヒトデ胃部コラーゲナーゼがトロポコラーゲンを切ることを見出した事実⁽⁵⁾と一致する。

IV 要 約

オニヒトデ胃部に存在するコラーゲナーゼ，酸性プロテアーゼはいずれもその至適pHは2.0附近にある。両酵素を硫酸アンモニウム沈澱，セファデックスG-150カラムクロマトグラフィに依り分離を試みたが成功しなかった。

又CM-セルロースに依り両酵素活性は吸着されず，DEAE-セルロースに依っては両酵素とも若干吸着され，吸着の程度においてコラーゲナーゼの方が強く（殊にpH 5.0において）吸着された。

EDTAを外液とする透析に依る両酵素活性の失活の程度， Ca^{++} イオン， Zn^{++} イオンに依るその賦活において両酵素において著しい差は認められなかった。然しコラーゲナーゼの方がその金属イオン要求度において強かった。

以上よりして両酵素が同一タンパクではないにしてもその性質が著しく似ていることが明かとなった。

ペプシンに特異的阻害剤によりオニヒトデ胃部酸性プロテアーゼが阻害されない所から，本プロテアーゼはペプシン様酵素ではなく，この酸性プロテアーゼ標品に含まれるコラーゲナーゼ活性は酸性プロテアーゼがペプシン様酵素であるが故のものでないことを明かにした。

V 参 考 文 献

1. Etherington D. J. 1972 The nature of the collagenolytic cathepsin of rat

- liver and its distribution in other rat tissues, *Biochemical J.*, **127** : 685 ~ 692
2. 木村茂 1975 コラーゲン分子の比較生化学—無脊椎動物を中心として—, *皮革化学*, **21** : 62 ~ 79
 3. Woessner J. F. 1961 The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acids, *Archives Biochem, Biophys.*, **93** : 440 ~ 447
 4. 四方治五郎, 平良悦子, 仲間由信, 安富雅之 1976 オニヒトデ胃部の蛋白分解酵素について, *琉大農学報*, **23** : 117 ~ 183
 5. Yomo H. and Egawa Y. 1978 Collagenase in stomach of crown-of-thorns *Acanthaster planci*, *Agr. Biol. Chem.*, **42** : 1591 ~ 1592

Summary

Ammonium sulfate fractionation and sephadex column chromatography did not separate collagenase and acid-protease in stomach of *A. planci*, both of which have an optimum pH at 2.0.

Although CM-cellulose did not adsorb both enzymes, DEAE-cellulose adsorb both enzymes considerably, and more collagenase at pH 5.0.

Dialysis against EDTA solution lowered both enzymes activities to the same extent and both dialysed enzyme activities were recovered by Ca^{++} and Zn^{++} completely, the collagenase being more sensitive to the metal ions than the acid-protease.

These results indicate that both enzymes have strong similarity even though they are not the same protein.

Since pepsin-specific inhibitors did not inhibit the acid-protease activity, the collagenase activity in the enzyme preparation did not appear to be due to pepsin-like protease in the preparation.