

琉球大学学術リポジトリ

オニヒトデ胃部の蛋白質分解酵素に就いて(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, 平良, 悦子, 仲間, 由信, 安富, 雅之, Yomo, Harugoro, Taira, Etsuko, Nakama, Yushin, Yasutomi, Masayuki メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4297

オニヒトデ胃部の蛋白質分解酵素に就いて

四方治五郎* 平良悦子* 仲間由信*
安富雅之**

Harugoro YOMO, Etsuko TAIRA, Yushin NAKAMA, and Masayuki
YASUTOMI : Studies on proteases in cardiac and pyloric stoma-
ch of *Acanthaster planci*

I 結 言

ヒトデは貧慾な食習性を有して居るので、その消化酵素に興味が持たれ、古くよりこれに関する研究がなされてきた。1936年 Sawano⁽⁶⁾ は *Distolasterias nipon* の有する主なプロテアーゼはトリプシン様酵素であり、他に pH 4.6 で H₂S 又は HCN に依り活性が増強されるカテプシン様プロテアーゼが存在するが、ペプシン様酵素は存在しないと報じて居る。最近 Kozlovskaya と Eyakova⁽⁵⁾ は6種類のヒトデのプロテアーゼを調べ、トリプシン様酵素、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ A, B は存在するが、ペプシン様酵素は存在しないと報じて居る。

著者等はヒトデの一種オニヒトデ (*Acanthaster planci*) の胃部に pH 2.0, 6.5 及び 9.0 附近に於いて活性極大を有するプロテアーゼを見出したので報告する。

II 材料及び方法

(1) 材料： オニヒトデ (*Acanthaster planci*) は沖縄本島海岸で昭和50年8月と9月に採取し、直ちに -20°C に凍結、保存したものを用いた。カゼインは和光純薬工業1級、ヘモグロビンは生化学工業(酵素基質用)、ペプシンは和光純薬特級(1:10000)、ミルクは雪印スキムミルク、p-Chloromercuribenzoate (PCMB), Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) は共に和光純薬工業特級を用いた。

(2) 粗プロテアーゼ標品の調製： -20°C で凍結、保存したオニヒトデを氷上に於て融解し、幽門及び噴門胃部 (Pyloric and cardiac stomach) をピンセットとメスを用い氷冷ビーカー中に集めた。これを Fig. 1 に示す方法に依りアセトン粉末とし、これを以て粗プロテアーゼ標品として用いた。

(3) 緩衝液： pH 1.5 - 3.0 に於ては醋酸ソーダ-塩酸, pH 4.0 - 8.0 に於てはクエン酸-第二リン酸ソーダ, pH 8.0 - 10.0 に於てはアンモニア-塩化アンモニウムを用い作成した。特記せぬ限り酵素液、基質溶液は共に 0.05M の上記緩衝液を用い作成した。

(4) プロテアーゼ酵素液の作成： 特記せぬ限りオニヒトデ胃部 8g に相当するアセトン粉末粗プロテアーゼ標品を 15 ml の所定 pH の緩衝液に溶かし、20,000 × g で 20 分日立 18 PR-3 にて遠心分離を行い、得たる上清をプロテアーゼ酵素液とし、各種条件下でそのプロテアーゼ活性を調べた。

* 琉球大学農学部農芸化学科
琉球大学農学部学術報告 23 : 177 ~ 183 (1976)

** 沖縄県金武村 400 番地

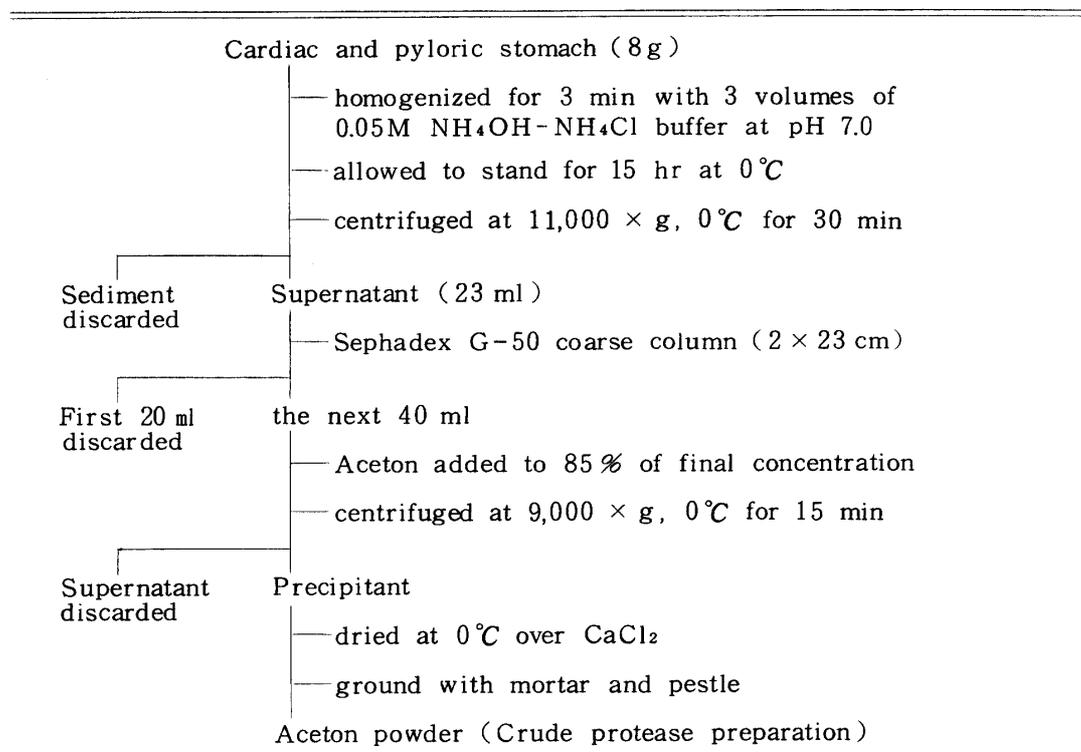


Fig. 1 Preparation of crude proteases of acetone powder from cardiac and pyloric stomach of *A. planci*

(5) プロテアーゼ活性測定： 2%カゼイン又は2%ヘモグロビンを基質とした。適当に希釈した酵素液1mlをインキュベーター（ヤマト科学BT-21）中で30°C、15分間保った後、基質1mlを加え、30°C、2hr振盪して反応せしめた後、2mlの0.4Mトリクロール醋酸（TCA）を加えて反応を停止せしめ、25,000 × g、30分遠心分離を行い、その上清の280nmに於ける吸光度（OD₂₈₀）を日立139分光光度計にて測定した。この値のブランク値（酵素液に先ずTCAを加え後基質を加えた場合のOD₂₈₀の値）に対する増加（ΔOD₂₈₀）に希釈度を乗じた値を以てその酵素液のプロテアーゼ活性（Protease Activity/ml）とした。

(6) 各種試薬のプロテアーゼ活性に及ぼす影響の試験： 基質に予め各試薬を所定最終濃度になる様に加えた。

(7) 至適温度の決定： pH 2.0, 6.5, 9.0 に於けるプロテアーゼ活性を通例の30°Cの代りに、20°C, 40°C, 50°C, 2hr反応せしめて活性を測定した。

(8) Milk-clotting活性の測定： Fortmann⁽²⁾の方法を若干改変して行った。30°Cに設定したインキュベーター中で、12%スキムミルク溶液2mlに、0.1M pH5.3の醋酸ソーダー醋酸緩衝液に溶かしたペプシン溶液1ml又はオニヒトデ胃部8gに相当するアセトン粉末標品を同上緩衝液3mlにとかして得たプロテアーゼ酵素液1mlを加え、凝固が始まるまでの時間(分)を以て、Milk-clotting timeとする。

III 結 果

1. 至適pH： Fig.2に見られる如く、pH 2.0, 6.5附近に活性極大が見られ、又pH 7.5から9.5の

間に巾広い活性極大領域が見られた。特にpH 2.0に於ける活性は他のpH極大に於ける活性の倍近い値を示した。

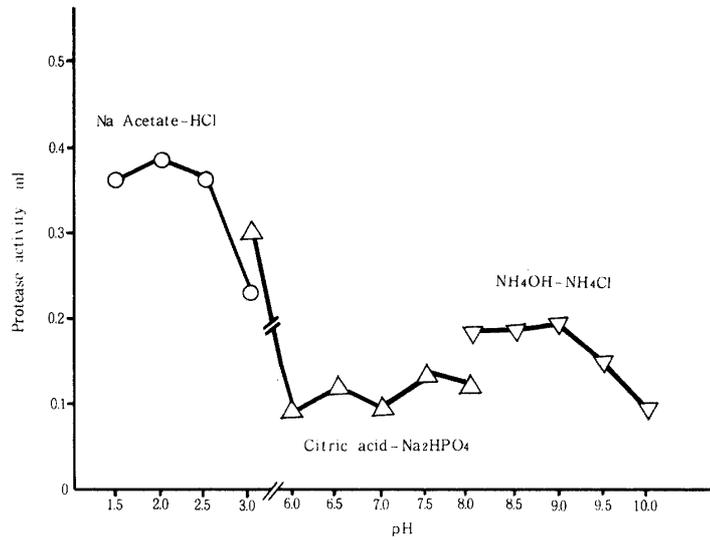


Fig. 2 Effect of pH on activity of proteases from *A. planci* (casein as a substrate at 30°C for 2 hr)

2. 至適温度： Fig. 3に見られる如く pH 2.0に於て測定したプロテアーゼ活性は40°Cに於て極大値を示した。pH 6.5に於ても40°Cに於て極大値を示したが、pH 2.0の場合程には明瞭ではなかった。pH 9.0に於てはプロテアーゼ活性は50°Cまで温度が上がる程上昇した。従ってpH 9.0に於けるプロテアーゼの至適温度は50°C又はそれ以上にあると思われる。

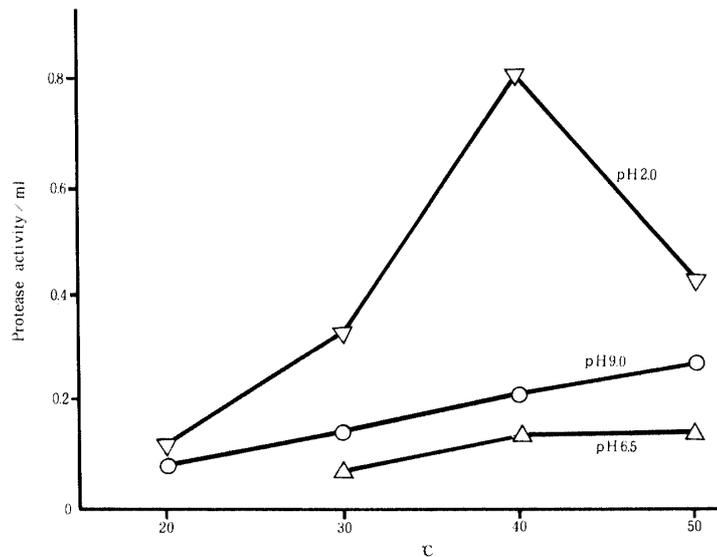


Fig. 3 Temperature effect on activity of proteases from *A. planci* (casein as a substrate)

3. プロテアーゼ試薬の影響 (Table 1) : 最終濃度 1mM の PCMB は pH 2.0 に於ては阻害を示さなかったが, pH 6.5 に於ては完全に, pH 9.0 ではかなり強くプロテアーゼ活性を阻害した。メルカプトエタノールは 10mM の最終濃度で, いずれの pH に於ても酵素活性を増加する事はなかった。又 EDTA は 1mM の最終濃度ではいずれの pH に於てもプロテアーゼ活性に著しい変化を与えなかった。

Table 1. Effect of several reagents on activity of proteases from *A. planci*

Reagents	Final Concentration (mM)	Relative Activity (% Control)		
		2.0	pH 6.5	9.0
PCMB	1	91	0	36
Mercaptoethanol	10	95	108	75
EDTA	1	96	92	107

PCMB : p-Chloromercuribenzoate

EDTA : Ethylenediaminetetraacetate

4. 金属イオンのプロテアーゼ活性に及ぼす影響 (Table 2) : pH 9.0 に於て 0.5mM の塩化カルシウムは添加しない対照に比し約 32% のプロテアーゼ活性の増加を示したが, pH 6.5, pH 2.0 ではプロテアーゼ活性の増加は見られなかった。アセトン粉末溶液の粗プロテアーゼ酵素液を一晩 0°C で 0.01M の EDTA に対し透析を行うとプロテアーゼ活性は pH 9.0 に於て約 35% 下がったが, この酵素液に塩化カルシウムを最終濃度 0.5mM になる様に添加するとプロテアーゼ活性 (pH 9.0 に於ける) は EDTA に一晩透析した, 塩化カルシウムを加えない対照に比し 55% 増加した。従って pH 9.0 に於てはこのプロテアーゼは Ca^{+2} イオンに依り活性が増大するものと思われる。

Table 2. Effect of various metal ions on activity of proteases from *A. planci*

	Final Concentration (mM)	Relative Activity (% Control)			
		2.0	6.5	pH 9.0	9.0**
None		100	100	100	100***
CaCl ₂	5 × 10 ⁻¹	76*	111	132*	155
ZnCl ₂	5 × 10 ⁻¹	68*	—	—	—
CoCl ₂	5 × 10 ⁻¹	80*	121	—	135
MnCl ₂	5 × 10 ⁻¹	—	116	—	135

* Final metal concentration ; 10 mM

** Activity after overnight dialysis against 0.01 mM EDTA at 0°C

*** Activity of a protease at pH 9.0 after overnight dialysis against EDTA is about 65% that before the dialysis.

5. pH 2.0に極大活性を有するプロテアーゼについて： このプロテアーゼは他の pH に極大活性値を有するプロテアーゼに比し活性も大で又今までにヒトデに於て報告されて居ないペプシン様酵素とも考えられるのでこの酵素について次の2点よりその性質を調べた。

(1) 2%ヘモグロビンを基質とした場合 (Fig. 4) : この場合やはり30°C, 2 hr の測定で pH 2.0 に活性の極大を認めた。但し pH 1.5, 2.5 に於ける活性の落ち込みはカゼインを基質とする場合よりも大であった。又 pH 2.0 に於けるプロテアーゼ活性値 ($\Delta OD_{280} / 2 \text{ hr} / \text{ml}$) はカゼインの場合に比しヘモグロビンを用いた場合約2倍の値を示した。

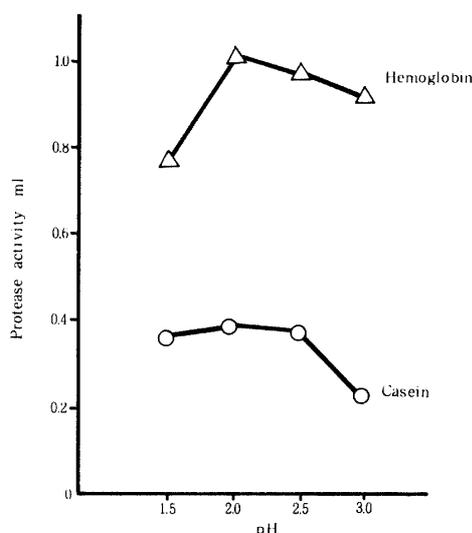


Fig. 4 Protease activity measured in different substrates at pH 2.0

(2) Milk-clotting活性： 動物起源のペプシンは pH 5.3 に於て常温に於てミルクを凝固する性質 (Milk-clotting activity) を有すると云われる^(4,5)、著者等はオニヒトデ胃部 8 g より得たるアセトン粉末の粗プロテアーゼ標品を通常の場合より少量の緩衝液に溶かして高活性のプロテアーゼ溶液 (pH 2.0 に於けるカゼインを基質とするそのプロテアーゼ活性は、10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ のペプシン溶液のその約20倍である) を作成し、pH 5.3 に於てこの Milk-clotting の性質を対照ペプシン溶液と比較した。ペプシン溶液 (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) は30°Cで12分後に Milk-clotting を起したが、オニヒトデ・プロテアーゼ溶液は30°C, 3hr 後にも Milk-clotting を起さなかった (Table 3)。

Table 3. Milk-clotting activity of a protease from *A. planci*

	Conc. ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Milk-clotting time (min)	Protease activity / ml ($\Delta OD_{280} / 2 \text{ hr} / \text{ml}$)
Pepsin	100	1	-
	10	12	0.043
Starfish protease*		> 180	0.808

Milk-clotting assay at pH 5.3, 30°C
Protease assay at pH 2.0, 30°C

* Aceton powder preparation equivalent to 8 g of stomach part of *A. planci*, dissolved in 3 ml of buffers

IV 考 察

著者等はオニヒトデ胃部より作成したアセトン粉末粗プロテアーゼ標品のpH9.0に於けるプロテアーゼ活性はEDTAに対し透析するとその活性が下り、 Ca^{++} を加えるとその活性を増加する事を見出した。この様な性質はKozlovskayaとElyakova⁽⁵⁾が*Lethasterias anthostica*に於て見出したプロテアーゼ活性と類似して居るが、彼等はこの活性はペプチダーゼ活性と考えて居る。又Camacho等⁽¹⁾は*Dermasterias imbricata*のpH8.0に活性極大を有するトリプシン様酵素は Ca^{++} に依り活性が増大しないと述べて居る。

本研究に於てpH6.5に活性極大を有するプロテアーゼはPCMBで完全に阻害されたが、メルカプトエタノールでは活性は増大しなかった。従つてこのプロテアーゼはSH酵素であると考え難い。又このpH6.5に活性極大を有するプロテアーゼは、pH2.0に活性極大を有するプロテアーゼと同じく40°Cに於て至適温度を有する。然し乍ら両者は上述の如くPCMBに依る阻害に於て明瞭な差を有するので、別の酵素と考えられる。

pH2.0に於て活性極大を有するプロテアーゼはメルカプトエタノールで活性が増大しないので、Sawano⁽⁶⁾が報じたpH4.6で硫化水素又はシアン化水素で活性が増大されるカテプシン様酵素ではないと思われる。pH2.0附近で活性極大を有するプロテアーゼであるペプシンはpH5.3に於てMilk-clottingの作用を有する^(3,4)然し乍ら本研究に於てオニヒトデ胃部より作成した粗プロテアーゼ標品はpH2.0に於て比較に用いたペプシンの約20倍のプロテアーゼ活性を有するにも拘らず、pH5.3に於てMilk-clotting活性を示さなかった(対照のペプシン溶液は12分でMilk-clottingを起した)。勿論使用したプロテアーゼ標品は純粋なものではないので、pH2.0に活性極大を有するプロテアーゼがMilk-clotting活性を有しないと結論するには問題がある。然し乍らこの試験に於て影響があると見られるpH6.5に於て活性極大を有するプロテアーゼはその活性が低いので、pH2.0に活性極大を有するプロテアーゼのMilk-clotting活性を妨げるとは考え難い。

古くからヒトデのプロテアーゼが研究されて居るにも拘らずペプシン様酵素が報告されなかった一つの理由は、今まで研究されたヒトデは殆どが有棘目(オニヒトデはこれに属する)以外の目に属して居た故かも知れない。尤もKozlovskayaとElyakova⁽⁵⁾は同じ有棘目に属する*Patiria pectinifera*に於てもペプシン様酵素は存在しないと述べて居るが原報が入手出来ないので詳しい事は不明である。

V 結 論

- (1) オニヒトデ(*Acanthaster planci*)の噴門及び幽門胃部より得たアセトン粉末粗プロテアーゼ標品はカゼインを基質とした場合、pH2.0, 6.5, 及び9.0附近に於て活性の極大を示した。
- (2) この標品はヘモグロビンを基質とした場合にもpH2.0に於てプロテアーゼ活性の極大を示した。
- (3) この粗プロテアーゼ標品はpH5.3に於てMilk-clottingの性質を示さなかった。
- (4) この標品のpH9.0附近に活性極大を示すプロテアーゼは Ca^{++} イオンに依り活性が増大した。

謝 辞

オニヒトデ採取に御協力戴いた沖縄県島尻郡知念村漁業協同組合の方々に謝意を表します。

引用文献

1. Camacho Z., Brown J. R. and Kitto G. 1970 Purification and properties of trypsin-like proteases from the starfishes *Dermasterias imbricata*. J. B. C. 245 : 3694~3972.
2. Fortmann B. 1970 Method of Enzymology 19 : 422 New York Academic Press.
3. Fruton J. S. 1970 The Enzymes 3 : 125 New York Academic Press.
4. Herriot R. M. 1938 J. Gen. Physiol. 21 : 501.
5. Kozlovskaya E. P. and Elyakova L. A. 1973 Proteinases of starfishes Khim Proteoliticheskikh Ferm. Simp. 67 ~ 68, Chem. Abst. 1975 83 : #5427.
6. Sawano E. 1936 Contributions to the knowledge on the digestive enzymes in marine invertebrates 2. Proteolytic enzymes in the starfish, *Distolasterias nipon* (Doederlein) Sci. Rep. Tokyo Bunrika Univ. Sec. B 2 : 179 ~ 199.

Summary

A crude protease preparation of acetone powder obtained from cardiac and pyloric stomach of *Acanthaster planci* showed protease activity maxima at pH 2.0, 6.5, and 9.0.

This crude protease preparation did not show milk-clotting activity at pH 5.3, suggesting that the protease which has an activity optimum at pH 2.0 may differ from pepsin. Protease activity at pH 9.0 was enhanced by Ca^{++} ion.