

## ミクロソームのアスピリンエステラーゼの性質 (I)

小笠原 八十吉\*・草間 正 夫\*\*

(昭和59年9月30日受理)

## Properties of Microsomal Aspirin Esterase from Hog Liver (I)

Yasokichi OGASAWARA and Masao KUSAMA

(Received September 30, 1984)

### 実験方法

### 緒 言

著者らはすでに、基質 p-ニトロフェノール酢酸エステル (p-NPA) から分解生成する p-ニトロフェノール (p-NP) を、315nmの紫外部で測定するエステラーゼ活性測定法 (p-NP法) は、微弱なエステラーゼ活性を検出できる極めて優れた方法であることを明らかにした<sup>1)~3)</sup>。しかしながら、この方法は pH8.1以上のアルカリ側では、p-NPAの自然分解が速やかに起るので、基質として p-NPAを用いることはできにくい。いっぽう、基質としてアセチルサリチル酸 (ASA) すなわちアスピリンを用いるエステラーゼ活性測定法 (SA法) は、以上の p-NP法の欠点を補足できる長所をもっている<sup>4),5)</sup>。けれども、豚肝エステラーゼ活性に対するSA法は必ずしも未だ十分には検討されていないので、その応用については不明の点も多い。

1971年奥村らは、ASAすなわちアスピリンを基質とするエステラーゼをアスピリンエステラーゼ (AE) と略す) と命名し、AEを中心に臨床実験を重ねていった。その結果、このAE活性法が、形態異常をほとんど伴わない兎肝の機能異常をあらわす敏感な一新肝機能検査法であることを指摘している<sup>6)</sup>。

そこで本報においては、まず、豚肝のライソソーム分画などの調製過程におけるAEの挙動を追跡後、さらに分離したAE分画を用いて、いくつかの性質を比較検討した。以下それらの結果について報告する。

### 1 AEの調製法

既報<sup>7),8)</sup>の表1に示す操作に準拠して、去勢した豚の肝臓から調製した。

### 2 酵素活性の測定法

AE活性<sup>1),4)</sup>、p-NP法によるエステラーゼ活性<sup>1),4)</sup>およびカタプシン活性<sup>8)</sup>は既報の方法に準拠して測定した。

### 3 蛋白量の測定法

既報<sup>9)</sup>の方法に準拠して測定した。

### 4 セファデックスによる分画法

DEAE-セファデックスA-50による蛋白質、エステラーゼおよびAEの分画は Barrett 法に (Column size: 2.5×50cm)<sup>10)</sup>、またセファデックスG-100によるそれらの分画は Determann 法<sup>11)</sup>と Whittaker 法<sup>12)</sup> (Column size: 2.8×80cm) に準拠して行なった。

### 5 デスク電気泳動法

ポリアクリルアミドゲルのデスク電気泳動および蛋白質ピークの検出は Ornstein 法<sup>13)</sup>に、またエステラーゼとAE活性ピークの検出は Rudolph 法<sup>14)</sup>やSA法<sup>4),5)</sup>に準拠して行なった。

### 結果と考察

#### 1 調製過程におけるAE活性

表1<sup>7)</sup>に従ってライソソーム、ミトコンドリアおよびミクロソームなどの顆粒に富む各分画を調製した。分離した各分画に含まれるそれら顆粒の膜を破壊し、その内部に存在するAEの総活性を測定し、ホモジネートのそれに対する比率であらわした。図1はその結果である。

\* 化学第一研究室

\*\* 栄養第四研究室

これによれば、ホモジネートのA E総活性の84%はライソソーム、ミトコンドリア、マイクロソームなどを含む上澄液Iに、残りの16%は核を含む沈殿物Iに移行した。また、ホモジネート総活性の64%はおもにマイクロソームを含む上澄液IIに、そして、その20%はライソソームとミトコンドリアとマイクロソームを含む沈殿物IIに移行した。マイクロソームに富み、ミトコンドリアをも含む分画Iには11%が、そして、ミトコンドリアに富み、ある程度のライソソームを含む分画IIには6%が移行した。分画IIIのそれは3%であったが、これはライソソームに富む分画であり、しかも、ある程度のミトコンドリアをも含んでいる<sup>15), 16)</sup>。さらに分別精製操作を反復し、分画IV, VおよびVIを得たが、これらにはホモジネートのA E総活性の僅か4, 0.5および0.2%がそれぞれ移行しているに過ぎなかった。

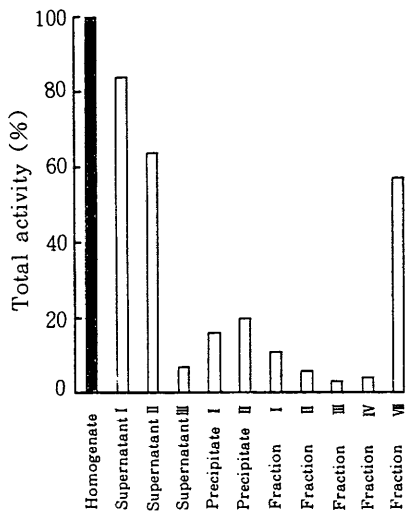


Fig. 1. Total activity of aspirin esterase in each fraction.

いっぽう、上澄液IIを超速心分離(100,000×g, 30分)して得られた分画VIIと上澄液IIIには、ホモジネートのA E総活性の57および7%がそれぞれ移行したが、この場合の求むる分画VIIはマイクロソーム分画である。

図2には、各分画の調製過程におけるA Eの純度を示した。ホモジネートの比活性度を10であらわしたものに対して、分画IIIおよびVIのそれは6および2へとそのA Eの純度は急速に低下していった。この場合、ライソソームの純度は、ホモジネートに対して、5および13倍へと上昇した<sup>8)</sup>。これから見れば、A Eはライソソーム顆粒内に存在しているものとは考えられない。

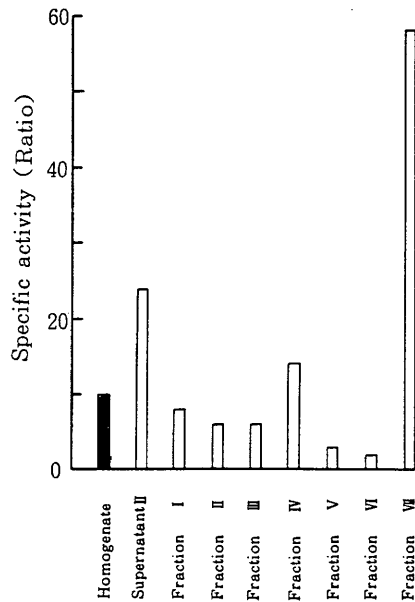


Fig. 2. Specific activity of aspirin esterase in each fraction.

いっぽう、上澄液IIおよび分画VIIのA Eの純度は、ホモジネートの比活性度を10であらわしたものに対して、24および58へと上昇したが、この場合の分画VIIはマイクロソーム分画である。これから見れば、A Eはマイクロソーム顆粒内に存在しているものと考えられる。分画IIから分画Vへとミトコンドリア顆粒の純度が高まったものでは、A Eの純度は逆に約1/2に低下した。また、分画Iよりも分画IVはマイクロソーム顆粒の純度はやや高まったものであるが、このときのA Eの純度も前者の1.8倍へとやや上昇した。以上の諸結果から見ても、ミトコンドリア分画やライソソーム分画内に存在するA E活性はマイクロソーム顆粒から由来したA Eが混在したものと考えられる。すでにUnderhayら<sup>17)</sup>はもともとエステラーゼはマイクロソーム顆粒内に局在していることを指摘している。著者らもすでに、p-NP法によるエステラーゼはマイクロソーム顆粒内に存在していることを明らかにした<sup>8)</sup>。本実験におけるA Eもこれらとよく一致している。

## 2 A Eの分離

表1<sup>7)</sup>で調製した新鮮な分画VII(マイクロソーム分画)を磨砕器(Glass pestle)で10回磨砕処理後<sup>7)</sup>, 100,000×gで30分間超速心分離した。得られた上澄液のA EをDEAEセファデックスA-50で分別し、図3を得た。これによれば、塩濃度0.19M付近に唯一つの高い

活性ピークを分離した(分画A)。分離した分画Aをデスク電気泳動にかければ、Rm 0.27付近にAEの唯一の活性ピークを分離した(図4)。

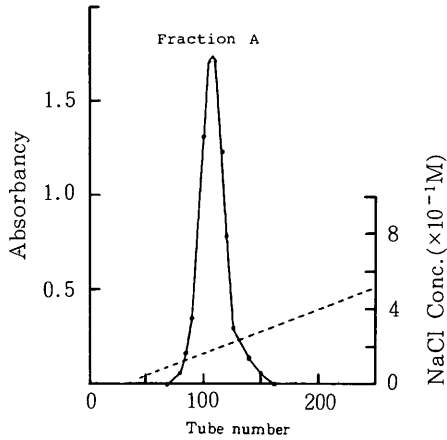


Fig. 3. DEAE-Sephadex A-50 Chromatogram of aspirin esterase in fraction VII.

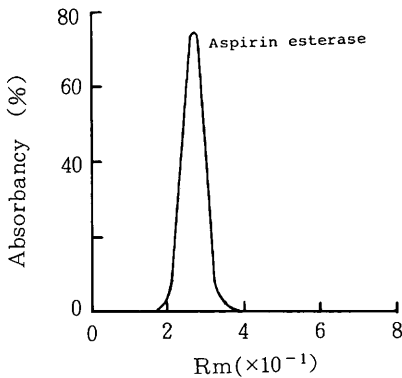


Fig. 4. Disc Electrophoretogram of aspirin esterase in fraction A.

### 3 AEの分子量

Whitaker のセファデックスG-100のゲル濾過法<sup>12)</sup>によりAEの分子量を測定した。既知分子量の蛋白質として、 $\gamma$ -Globulin(分子量:160,000), Bovine serum albumin(同:67,000), Ovalbumin(同:45,000),  $\alpha$ -Chymotrypsinogen(同:25,000)およびCytochrome c(同:12,400)を用いて図5の検量線を得た。いっぽう、分画Aの濃縮液を、セファデックスG-100のゲル濾過にかけ、図6を得た。これによれば、溶出量138ml付近にAEの活性ピークを分離した。このときの溶出量を、図5の検量線に当てはめ、分子量160,000を得た。すでに Horgan ら<sup>18)</sup>は、豚肝エステラーゼは分子量

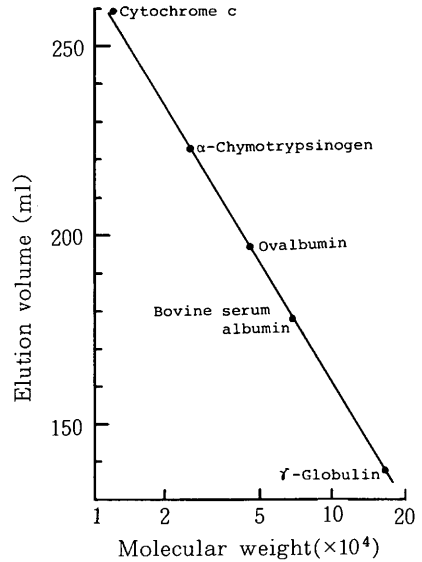


Fig. 5. Molecular weight of each protein by gel filtration on Sephadex G-100.

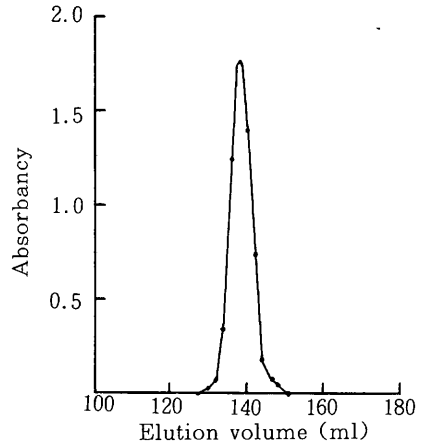


Fig. 6. Sephadex G-100 Chromatogram of aspirin esterase in fraction A.

163,000の会合体として存在し、8 M尿素で分子量40,000のサブユニットに解離することを報告している。さらに Webb らは<sup>19)</sup>、豚肝エステラーゼは分子量54,000~59,000の3つのサブユニットから構成されていることを明らかにしている。本実験で分離した豚肝のAEも、いくつかのサブユニットからできているものと考えられるが、これらについては、詳細に検討の上、改めて報告する。

### 4 AEのpH曲線

図3で分離した分画Aを用いて、AE反応に対するpH曲線を作成し、図7を得た。これによれば、AE作用では、7.4付近に至適pHをもつ一つの大きなピークを

あらわした。著者らはすでに、p-NP法による豚肝エステラーゼ作用の至適 pH は8.0付近に存在することを明らかにしている<sup>8)</sup>。これから見れば、AE作用の場合には、やや低い部位に至適 pH をあらわしている。いっぽう、ミトコンドリアまたはライソソーム顆粒に富む分画V<sup>7)</sup>または分画VI<sup>7)</sup>のAE作用についても測定し、全く同様に至適 pH 7.4付近に一つの低いピークをもった pH 曲線をあらわした。このことは、この測定条件から見たAEはただ1種類のみであることを示すものである。さらにまた、ミトコンドリアやライソソーム分画内のAEは、ミクロソーム顆粒内のAEから由来し、混在した遊離型であることを示唆するものでもある。

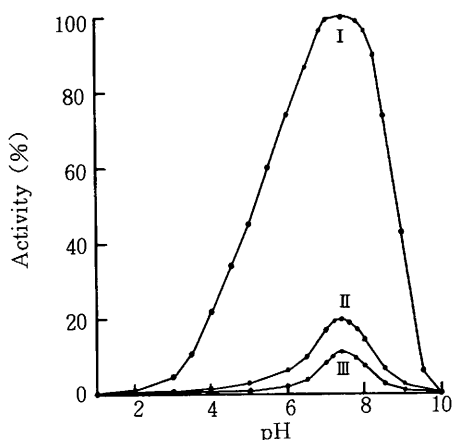


Fig. 7. Effect of pH on reaction of aspirin esterase in fraction A (I), fraction V (II) or fraction VI (III).

図3で分別した分画Aを用いて、AEの安定性に及ぼす pH の影響も検討した(図8)。6から8付近までの pH 値では極めて安定であった。9以上のアルカリ側でも、11以下の pH 値であれば、AEの大きな失活は認められなかった。けれども、4以下の酸性側 pH では、急速にAEは失活していき、著しく不安定になった。

### 5 熱とカテプシンによるAEの失活

一般に、温度が昇れば、ライソソームやミクロソーム顆粒膜の崩壊が強まっていく<sup>15), 20)</sup>。いっぽう、高温下では酵素の失活もおこり、それらの顆粒膜内から散逸した遊離型酵素量を的確につかむことが困難になる。図9は、図3で分離した分画Aを用いて、またはそれにライソソーム分画(分画VI<sup>7)</sup>)を加えたものを用いて、pH 7.0の条件下で、80℃にいたるまでの高温下で6時間インキュベートした場合のAE活性を示したものである。

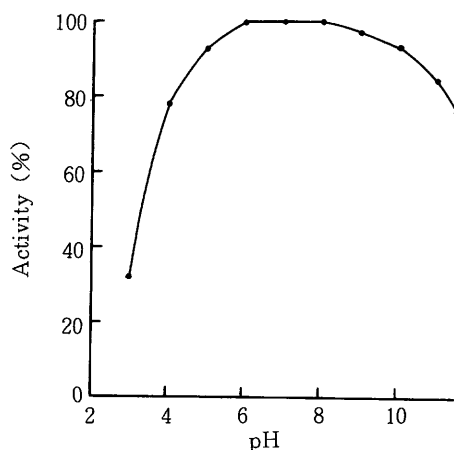


Fig. 8. Effect of pH on stability of aspirin esterase in fraction A.

分画Aのみをインキュベートしたものでは、0から80℃へと昇温するにつれて、AEは次第に失活していき、やがて活性を認めがたくなった(図9のI)。いうまでもなく、このときの失活は熱変性による失活を示すものである。いっぽう、分画Aにライソソーム分画を加えたものでは、温度が昇るにつれて、曲線Iよりもさらに一層AEの失活を促進していった(図9のII)。このときの失活は、熱変性による失活に、さらに、ライソソーム作用によるAEの失活を加えたものである。ライソソーム作用によるAEの失活は、いうまでもなく、ライソソーム顆粒内に存在するカテプシン作用によるAEの失活と考えてよい。このことは、以下の検討からも明白である。

図9における曲線Iと曲線IIとの差を求めれば、その温度におけるカテプシン作用によるAEの失活量を得る。この場合、最高値をあらわした59℃における失活量を100にとり、これに対する比率で各温度における失活をあらわした。図9のIIIはその結果である。59℃をピークとして、温度が0または80℃へと遠ざかるにつれて、ライソソームのカテプシン作用によるAEの失活率は減少していった。

図10は、図9のIIと同一条件下の pH 7.0、0~80℃で6時間、分画Aにライソソーム(分画VI<sup>7)</sup>)を働かせた場合の氨基酸遊離量から、カテプシン活性を測定した結果である。このときのカテプシン活性を示す曲線は、図9のIIIに示すAEの失活曲線と完全に一致した。図10から、0から59℃へと昇るにつれて、ライソソーム

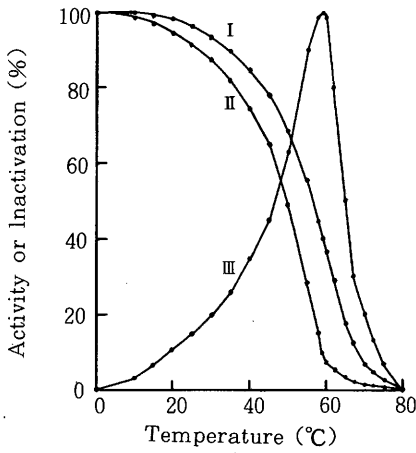


Fig. 9. Activity (I or II) or inactivation (III) of aspirin esterase after incubation of fraction A (pH 7.0) without (I) or with (II) fraction VI at each temperature (0°~80°C) for 6 hours.

のカテプシン活性は次第に強まっていくことは明白である。けれども、59°C以上に昇れば、熱変性によるカテプシン自身の失活も促進されて、カテプシン活性は急速に低下していった。図9のⅢに示すライソソーム作用によるA Eの失活は、以上のようなカテプシンの活性傾向に基因するものである。著者らはすでに、p-NP法によるエステラーゼに対するカテプシン作用や熱安定性についても明らかにしている<sup>8)</sup>。これらエステラーゼに比較しても、本実験で検討したA Eの特性はよく一致した傾向をあらわした。

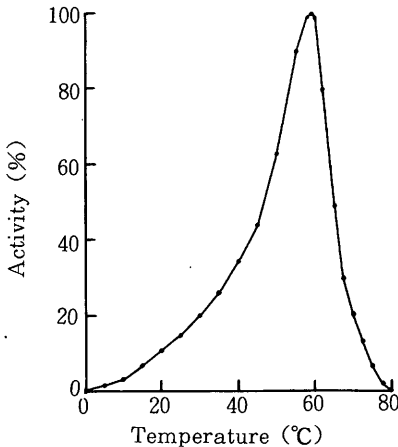


Fig. 10. Activity of cathepsin after incubation of fraction A (pH7.0) with fraction VI at each temperature (0°~80°C) for 6 hours.

本実験で分離したA Eは、ミクロソーム顆粒に由来する分子量160,000の酵素蛋白体と考えられた。2種類のセファデックス分別法からも、そして、デスク電気泳動法からも、調製直後の新鮮なA Eそのものは単一の活性ピークをあらわした。それ以外の活性ピークを示すA Eも、ミクロソーム顆粒内に存在することも十分に考えられる。いっぽう、インキュベーションやその他の処理を加えれば、いくつもの活性ピークに解離したA E蛋白体も期待できる。これらについては、さらに十分に検討の上、改めて報告する。

要 約

- (1) 豚肝のライソソーム顆粒の調製過程におけるA Eの挙動を比較検討した。豚肝A Eの大部分はミクロソームに由来するものと考えられた。
- (2) DEAEセファデックスA-50でA Eを分別すれば、塩濃度0.19M付近に唯一つの高い活性ピークを分離し、それはデスク電気泳動的にはRm0.27付近に唯一つの活性ピークをあらわした。そのA Eの分子量は160,000付近であった。
- (3) A E反応の至適 pH は7.4付近に、また、A E安定性に対する至適 pH は6~8付近にあった。
- (4) 熱変性によるA Eの失活も検討された。ライソソームのカテプシン作用によるA Eの失活は、pH7.0の条件下では、59°C付近で最高値に達し、その温度よりも遠ざかるにつれて、その失活率は低下していった。

文 献

- 1) 小原哲二郎・小笠原八十吉：農化誌，32，861，867 (1958)
- 2) C. Huggins and J. Lopides：J. Biol. Chem.，170，467 (1947)
- 3) 木村敏雄：生化学，29，351 (1957)
- 4) 小原哲二郎・小笠原八十吉：農化誌，33，53 (1959)
- 5) H. J. Hofstee：Science，114，128 (1951)
- 6) 奥村英正・磯田教二：最新医学，26，No 1，162 (1971)
- 7) 小笠原八十吉：東京家政大学研究紀要，24 (2)，1 (1984)
- 8) 小笠原八十吉：食工誌，18，191 (1971)

- 9) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 10) A. J. Barrett: *Biochem. J.*, **104**, 601 (1969)
- 11) H. Determann: *Gel Chromatography*, 2nd, 1 (1969)
- 12) J. R. Whitaker: *Analy. Chem.*, **35**, 1950 (1963)
- 13) L. Ornstein and B. J. Davis: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
- 14) K. Rudolph and M. A. Stahmann: *Plant Phys.*, **41**, 389 (1966)
- 15) A. V. S. DE Reuck and M. P. Cameron: *Lysosome*, 1~427 (1963)
- 16) S. Shibko and A. L. Tappel: *Biochem. Biophys. Acta*, **73**, 76 (1963)
- 17) E. Underhay, S. J. Holt, H. Beaufay and C. DE Duve: *J. Biophys. Biochem. Cyto.*, **2**, 635 (1956)
- 18) D. J. Horgan: *Biochim. Biophys. Res. Com.*, **23**, 18 (1966)
- 19) E. C. Webb: *Biochemistry*, **8**, 2013 (1969)
- 20) 小笠原八十吉: *農化誌*, **40**, 371 (1966)

### Summary

Behavior of the aspirin esterase which was considered to be existing in microsomal particles, was investigated during the preparation of lysosomes from hog liver.

Microsomal aspirin esterase was fractionated with DEAE-Sephadex A-50. Activity peak of the enzyme was observed in the fraction eluted by 0.19M NaCl and this peak showed single band at around Rm 0.27 by disc electrophoresis. Molecular weight estimated by Sephadex G-100 gel filtration was about 160,000.

The enzyme was stable at pH 6.0~8.0. The pH optimum for its reaction was observed at about 7.4. Heat denaturation or lysosomal cathepsin gave some inactivation to this enzyme during the procedure. When pH 7.0, heat treatment on the enzyme at 59°C showed maximum inactivation and the rate of inactivation gradually decreased toward 0°C or 80°C from this temperature.