

南極産オキアミの酸性プロテアーゼに関する研究

木元 幸一

(昭和55年9月30日受理)

Studies on Proteolytic Enzymes of Antarctic Krill

Koichi Kimoto

(Received September 30, 1980)

緒 言

人類にとって将来の食糧資源の確保は、今や世界的な問題であり、そのためには、未開発資源の食糧化を積極的に行なう必要がある。南極産オキアミは、その蛋白質栄養価が高い事と、その資源量の豊富な事から、将来の動物性蛋白源として各国から注目されている¹⁾。しかし、南極産オキアミの食糧化の障害の一つは、その品質が急速に劣化する事である。この事は、南極で捕獲したオキアミを、新鮮な状態で、市場へ運ぶ事の困難さであり、食用に供する場合の、風味、栄養価の維持、また、食品に加工する場合の品質やコスト上の問題となる。この原因は、オキアミ蛋白質の自己消化が急速に進むためと考えられるが、その詳細は未だ不明である。さらに南極という温度の低い所で、約2年というライフサイクルで成長するという生物的な特徴からもその生化学的な興味を持たれている。本研究では、オキアミの自己消化に重要な役割を演じていると思われる蛋白分解酵素を同定し、その酵素を単離精製する事を試みた。さらにそれら酵素の生化学的性質を明かにし、従来報告されている種々の酸性プロテアーゼとの比較を行なった。

実験方法

材料：南極で捕獲したオキアミ(体長5—6cm)を -60°C で冷凍保存したものを使用した。

粗酵素液の調製：冷凍オキアミ1kgを、10倍量の冷アセトン中で粉碎して脱脂を行ない、120gのアセトンパウダーを得た。アセトンパウダーに、10倍量の0.02

M phosphak buffer, pH 6を加え、約1時間攪拌抽出を行なった。この抽出液を、10,000g, 30分間遠心分離を行ない、上澄液を得た。この上澄液をpH 3.0に調節して生じた沈殿を遠心分離して除き、上澄液のpHを6.0に戻した。次に、硫酸を80%飽和になるまで加え、生じた沈殿を遠心分離して集めてのち最少量の0.02 M phosphate buffer, pH 6に溶解し、同様のbufferに対して1晩透析を行ない粗酵素液を得た。

カラムクロマトグラフィー：DEAE-celluloseは、whatman社製のDE 52を、大量の0.02 M phosphate buffer, pH 6で平衡化して、直径5cm長さ40cmのカラムに充てんして使用した。CM-celluloseは、whatman社製CM 52を、0.02 M Acetate buffer, pH 5.5で平衡化し、直径1.5cm長さ30cmのカラムに充てんして使用した。ゲル濾過は、pharmacia社製のSephadex G 100を0.1 M NaClを含む0.02 M phosphate buffer, pH 6で一夜膨らばせさせた後、直径5cm長さ100cmのカラムに充てんした。

電気流動：Disc電気泳動は、Davis²⁾らの変法によった。蛋白質バンドの染色は、coomusie brilliant blue Rを用いた。等電点電気流動は、Svensson³⁾の変法によった。

プロテアーゼ活性の測定：Anson⁴⁾らの変法によった。酵素液0.2mlと0.2 M クエン酸 buffer, pH 3.0に溶かした1%ヘモグロビン液1mlを1時間 32°C で酵素反応を行なった後、5% TCA 1.5mlを加えて反応を停止した。その反応停止液を遠心分離し、その上澄液の280nmの吸光度を測定した。

結 果

南極産オキアミ中のプロテアーゼ：アセトンパウダー

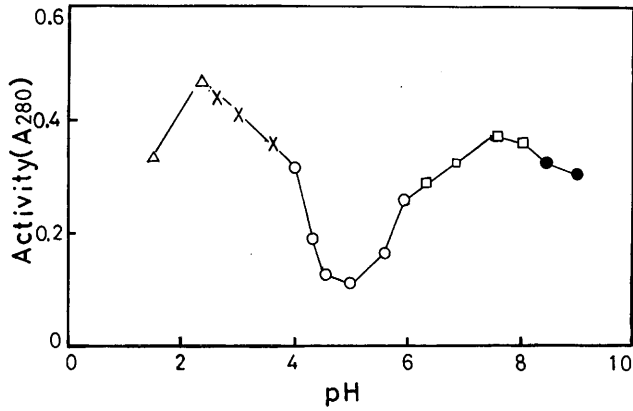


Fig. 1 Effect of pH on Proteolytic Activity of Crude Enzyme Solution. A reaction mixture (0.2 ml of enzyme solution, 0.5 ml of each buffer and 0.5 ml of 2% hemoglobin in distilled water) was incubated at 32°C for 1 hr. and the reaction was stopped and assayed as described in "Method". The following buffers were used: △-△ HCl, ×-× Gly-HCl, ○-○ Acetate, □-□ Phosphate, ●-● Tris-HCl.

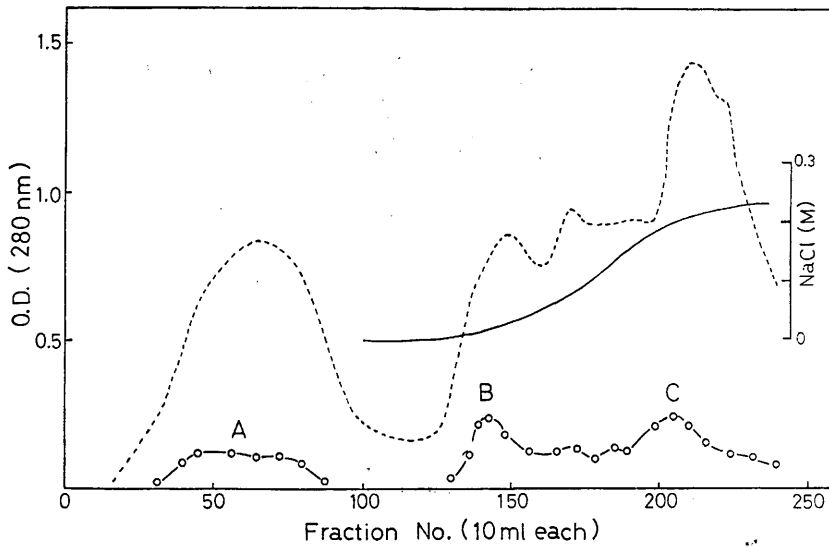


Fig. 2 Elution Profile of Acid Protease on DEAE-Cellulose Column. Crude enzyme solution was applied on the DEAE-cellulose column (5 × 30 cm), equilibrated with 0.02 M phosphate buffer pH 6, washed with the same buffer and eluted with a linear gradient of NaCl. The flow rate was 60 ml/hr and 10 ml each was fractionated. ○ —○ protease activity, --- protein, — NaCl.

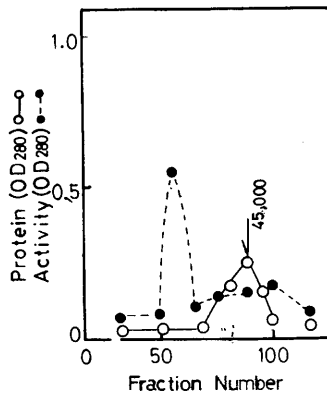


Fig. 3 Elution Profiles of Acid Protease-A, on Sephadex G-100 Column.

Each active fraction on DEAE-cellulose column was collected, concentrated with Toyo Ultra Filter UK-10 and applied on Sephadex G-100 column (5 × 100 cm) equilibrated with 0.02 M phosphate buffer, pH 6.0, containing 0.1 M NaCl. The flow rate was 30 ml/hr and 10 ml each was fractionated. --- protein, ○—○ protease activity.

Table I Enzymatic Natures of Protease A

Protease-A	
opt. pH	2.5—3
opt. temp.	40°C
stabilty	pH 2.5—6 30°C

Table II. Effect of Inhibitors

Substance	Mole	Activity(%)
None		100
Pepstatin	1.8×10^{-8}	9.96
	1.8×10^{-7}	6.51
MIAA	1.7×10^{-4}	95
	1.7×10^{-3}	71
PCMB	1×10^{-4}	98
	1×10^{-3}	27
DFP	1×10^{-4}	84
	1×10^{-3}	51
DTT	1.7×10^{-5}	81
	1.7×10^{-4}	89
Cysteine	1×10^{-4}	78
	1×10^{-3}	78
EDTA	1.7×10^{-4}	100
	1.7×10^{-3}	100

Table III. Purification of Protease A

Step	Total protein 1	Recovery %	Total activity 2	Recovery %	Specific activity 3	Purification
Crude extract	28,855	100	10,965	100	0.38	1
Acid treatment	9,839	34.1	7,675	70.0	0.78	2.1
Salting out	3,582	12.4	3,404	31.0	0.95	2.5
DEAE- Cellulose	2,459	8.5	1,642.4	15.0	0.84	2.2
Sephadex G-100	55.1	0.2	217.1	1.98	3.94	10.4
CM-Cellulose						
peak A ₁	15.9	0.06	78.6	0.72	4.93	13.0
peak A ₂	2.3	0.01	127.1	1.16	54.32	143.0
peak A ₃	5.7	0.02	244.5	2.23	42.60	112.1

1 : Absorbance at 280 nm/ml

2 : Absorbance at 280 nm/ml

3 : Total activity / Total protein

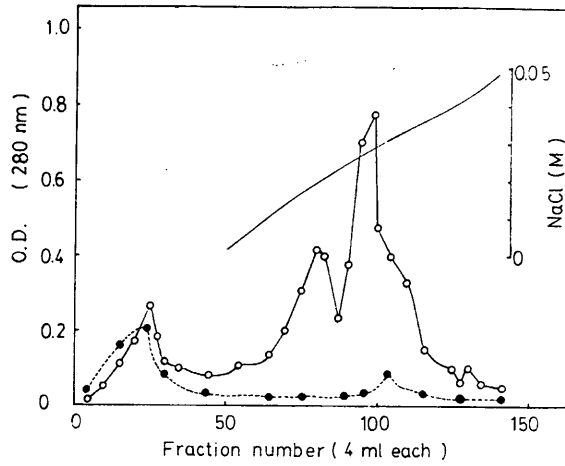


Fig. 4 Elution Profile of Acid Protease-A on CM-Cellulose Column. Acid protease-A fraction on Sephadex G-100 column was collected, concentrated with Toyo Ultra Filter UK-10, dialyzed against 0.02 M acetate buffer, pH 5.5 and applied on the CM-cellulose column (2.5×27 cm) equilibrated with the same buffer. The column was washed with the same buffer and eluted with a linear gradient of NaCl. The flow rate was 25 ml/hr and 4.3 ml each were fractionated. --- protein, ○—○ protease activity.

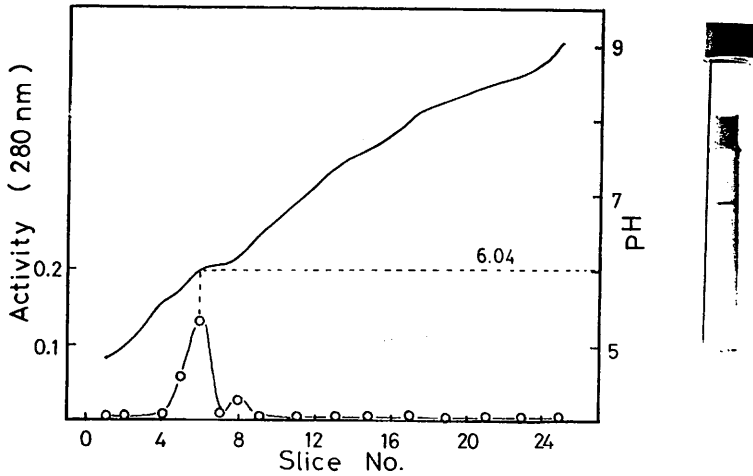


Fig. 5 Isoelectric Focusing (left) and Disc Electrophoresis (right, photograph) of Acid Protease-A₂. The gel was sectioned for determination of the pH gradient and of protease activity after 4 hrs running of isoelectric focusing.

から得られた粗抽出液には、フリーのペプチドや、アミノ酸が多く、酵素活性を測定できないので、透析した後に、種々の pH におけるプロテアーゼ活性を測定した。Fig. 1 に示したように、pH 3 付近と、pH 7-8 付近に強いヘモグロビン分解活性が見られた。この事よりオキアミ中には、酸性プロテアーゼと中性プロテアーゼが存在する事が示唆された。以下、酸性プロテアーゼについて本研究を進める事とした。

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー：粗酵素液を、0.02 M phosphate buffer, pH 6 で平衡化した DEAE-セルロースカラムにかけた。Fig. 2 に示すように、酸性プロテアーゼは、3 成分に分離された。各々を酸性プロテアーゼ A、B、C と命名した。そのうち酸性プロテアーゼ C の活性は、試料種による変動が大きかった。DEAE-セルロースカラムにより分離された酸性プロテアーゼのうち、酸性プロテアーゼ A についてまず精製を行なった。

ゲル濾過：DEAE-セルロースカラムによる酸性プロテアーゼ A 画分を集め、Toyo Ultra Filter UK-10 により N₂ ガス加圧濃縮を行なった。濃縮液を Sephadex G 100 にかけるゲル濾過を行なった。溶出パターンは Fig. 3 に示した。活性画分の所は、約分子量 45,000 であった。

酸性プロテアーゼの酵素的性質：酸性プロテアーゼ A のゲル濾過による 45,000 の分子量の所を集め、種々の酵素的性質を調べその結果を Table I に示した。至適 pH は、2.5-3 であった。至適温度は、40°C であった。5°C 24 hr あるいは、30°C 30 分の preincubation において、pH 2.5-6 の範囲で、安定であった。また、結果には示さなかったが、50°C、20 min の preincubation では、pH 6 でのみ安定であった。

阻害剤の影響：酸性プロテアーゼ A のヘモグロビン分解活性に及ぼす種々の阻害剤等化学試薬の影響を調べたのが、Table II である。動物、及び、微生物起源の酸性プロテアーゼの代表的阻害剤である、Pepstatin によりよく阻害された。PCMB (P-chloromercuri benzoate) や MIAA (monoiodo acetate) のような SH 酵素の阻害剤では阻害されず、また、シスラインや DTT (Dithiothreitol) のようなチオール化合物での活性化は見られなかった。DFP (diisopropyl phosphate) のようなセリン残基の阻害剤や、EDTA のような金属キレート試薬では、阻害されなかった。セリ

ン酵素や金属酵素ではないと考えられる。

酸性プロテアーゼ A の multiple form：次に、ゲル濾過により得られた、酸性プロテアーゼ A 画分を 0.02 M Acetate buffer, pH 5.5 に対して透析の後、同様の緩衝液で平衡化した。CM-セルロースカラムによりイオン交換クロマトグラフィーを行なった。Fig. 4 に示されるように、酸性プロテアーゼ A は、A₁、A₂、A₃ の 3 成分に分離された。そのうち、酸性プロテアーゼ A₂ については、Fig. 5 に示したように、ディスク電気流動的に単一なバンドとして得られたので、その等電点を求めた。Fig. 5 に示されるように、等電点は、pH 6.05 であった。ここまでの課程を精製倍率として表に示したのが Table III である。A₂、A₃ は、100 倍以上に精製された。

考 察

南極産オキアミ体組織中には、数種の酸性プロテアーゼが存在する事が明らかになった。このうち酸性プロテアーゼ A については、pH 2 以下では、活性を失う事から、Pepsin type ではなく、組織内プロテアーゼである事が予測された。また決定された分子量も、従来の哺乳動物の Pepsin⁵⁾ よりも大きなものであった。組織内プロテアーゼとしては、カテプシン D、E などがあり、それらと本酵素との異同は、今後に残された問題であるが、阻害剤などに対する挙動では、両者は、よく類似していると思われる。

しかしながら、本研究において最初に pepstatin-sepharose の Affinity column chromatography を試みた所オキアミの酸性プロテアーゼは回収率が悪かった。山本ら⁶⁾の報告によると、カテプシン D や E の精製に pepstatin-sepharose の Affinity column chromatography を利用する事により高収率でカテプシン D と E を得ている。この事からオキアミより得られた酸性プロテアーゼは、動物のカテプシン D や E と異なる点が多いようである。

今後は、オキアミの酸性プロテアーゼだけでなく、中性プロテアーゼも精製してその性質も明らかにする。そして、これらの酵素がオキアミの自己消化にいかに関与するかを生化学レベルで明確にしていく予定で。

要 約

1. オキアミ体組織中には、酸性プロテアーゼと中性プロテアーゼの存在が示唆された。
2. 酸性プロテアーゼは、DEAE-セルロースにより A、

B, C, 3種に分離された。

3. 酸性プロテアーゼAは, Sephadex G-100 によるゲル濾過により, 分子量4万5千前後と推定された。
4. 酸性プロテアーゼAの, 至適 pH は, 2.5-3, 至適温度は, 40°Cであった。
5. 酸性プロテアーゼAは, pH 2.5-6 の範囲で安定であった。
6. 酸性プロテアーゼAは, pepstatin でよく阻害された。
7. 酸性プロテアーゼAは, CM-セルロースカラムにより, A₁, A₂, A₃ の3成分に分離された。

謝 辞

本研究は, 1980年度農芸化学会大会(於筑波研究センター)において発表されたものの一部であり, 又, 本研究は, 東京家政大学特別研究費によって行なわれた事を表し, 東京家政大学関係者名位に感謝いたします。

研究に際し, 材料の南極産オキアミの御便宜をはかって下さった. 農林省食品総合研究所野口博士に深謝いたします. また本研究を行なうにあたり, ご鞭撻を賜った筑波大学応用生物科学村上教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 三輪勝利: 農林水産業研究成果発表会発表要旨, 23頁, S 53, 11, 14.
- 2) 宇井信生, 宮崎香: 生化学実験講座—タンパク質の化学 I p. 222 東京化学同人
- 3) 宇井信生, 宮崎香: 生化学実験講座—タンパク質の化学 I —p. 262 東京化学同人
- 4) M. L. Anson; Methods in Enzymology, **19**, 286, (1971)
- 5) J. S. Fruton; The Enzymes, **3**, 119, (1971)
- 6) K. Yamamoto, N. Katsuda, M. Himeno & K. Kato; Eur. J. Biochem., **95**, 459, (1979)