



Title	オニヒトデ ¹ 幽門垂プロテアーゼの精製に関する研究(農芸化学科)
Author(s)	四方, 治五郎; 神谷, 和子; 知念, 功
Citation	琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(24): 231-241
Issue Date	1977-12-01
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4240
Rights	

オニヒトデ幽門垂プロテアーゼの精製に関する研究

四方 治五郎*・神谷 和子**・知念 功*

Harugoro YOMO, Kazuko KAMIYA and Isao CHINEN:
Studies on purification of proteases in pyloric cae-
cum of *Acanthaster planci*

I 緒 言

オニヒトデは、硬タンパク質を多く含むサンゴを常食としていることから、そのヒトデの消化作用、消化酵素については非常に興味もたれる。本研究室では、四方らがこのオニヒトデの胃部の蛋白質分解酵素について研究しており、その胃部のその酵素には、pH 2.0, pH 6.5, pH 9.5 作用酵素が存在すると報告¹⁾している。また、Sawano²⁾は、*Distolasterias nipon* には、トリプシン様酵素とカテプシン様プロテアーゼが存在すると報告している。さらに、KozlovskayaとElyakova³⁾はヒトデには、トリプシン様酵素の外にアミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼA, Bが存在すると報告している。

本研究では、幽門垂もヒトデの主要消化器官であることから、その幽門垂に存在するプロテアーゼを抽出し、それをカラムクロマトグラフィー等によって部分的にそのプロテアーゼの精製を行ったので、その精製酵素について以下にこれらの結果を記述する。

II 材料および方法

1. 材 料

沖縄近海で採取したオニヒトデを、 -20°C で凍結し、 0°C で解剖し、幽門垂(幽門盲囊)を取り出した。

2. 粗酵素の抽出

凍結したオニヒトデを氷上で幽門垂を取り出し、これを0.05Mリン酸緩衝液を2倍量加えた後、3分間ホモジナイズし、さらに1時間半室温で放置した後、 $13,000 \times g$ で30分間遠心分離した。次にその上清にアセトンを経最終濃度85%になるように加えたのち、 $9,000 \times g$ で20分間遠心を行なった。次に、その沈澱物を乾燥し、乾燥粉末にしたものを、アセトン粉末粗酵素標品として用いた。

3. プロテアーゼ活性の測定法

その活性測定するに際し、基質溶液として2%カゼイン、およびヘモグロビンを用いた。酵素溶液として、アセトン酵素粉末を用い、それを随時、必要に応じてpH 2.0, pH 7.0, pH 10.5等の緩衝液に溶かし、 $13,000 \times g$ で20分間遠心したのち、その得られる上清を用いた。反応するにあたっては、適当に希釈した酵素液1mlに基質2mlを加え、 40°C で、pH 2.0作用酵素の場合は、2時間、pH 7.0,

* 琉球大学農学部農芸化学科

** うるま産業K.K

pH 10.5作用酵素の場合は1時間反応せしめたのち、1.5 mlの15%トリクロール酢酸(TCA)を加えて反応を停止せしめ、そのろ液をLowry法⁴⁾でチロシン含量を測定し、プロテアーゼ活性を求めた。TAME水解酵素活性の測定はSato et al⁵⁾の方法によった。

4. カラムクロマトグラフィー

1) DEAEセファロースカラムクロマトグラフィー

一定量のセファロースを蒸留水で洗浄したのち、0.5 M塩酸溶液、蒸留水(pH 7.0)、0.5 M水酸化ナトリウム溶液、蒸留水(pH 7.0)と順次洗浄して活性化した。その後、使用する緩衝液(0.01 Mリン酸緩衝液)で平衡化し、それを使用するカラム(主として2.6 × 85 cmカラムを用いた)につめ、試料をのせたのち、0.01 Mリン酸緩衝液濃度から1 M食塩/0.01 Mリン酸緩衝液濃度までのグラジエント法により溶出を行った。その溶出液は、1フラクション5 mlずつ分取し、各分画については、波長280 nmで吸光度を測定しタンパク含量を求めるとともに、カゼイン消化法、およびヘモグロビン消化法によりそのプロテアーゼ活性も測定した。なおカゼイン消化法はpH 7.0、pH 10.5作用酵素を測定する際に用いた。

2) セファデックスG-100ゲルクロマトグラフィー

セファデックスG-100ゲル一定量を水に浸したのちよく煮沸したウォーターバス中で膨潤させた。これを先述のセファロースカラムクロマトグラフィーで用いた同じカラムにつめ、使用する緩衝液(0.1 M食塩/0.01 Mリン酸緩衝液)で平衡化し、その緩衝液で溶出した。その溶出液については、先のDEAEセファロースカラムクロマトグラフィーと同様にタンパク含量とプロテアーゼ活性を測定した。

3) ミルク凝固活性測定法

0.01 M塩化カルシウムを含む0.1 M酢酸緩衝液(pH 4.7)を用いて12%スキムミルク溶液を作成し、この溶液2 mlに0.01 M酢酸緩衝液(pH 4.7)で調製した酵素液1 mlを加え、30°Cでインキュベイトを行い、スキムミルクが凝固するまでに要する時間を測定した。

III 結 果

1. DEAEセファロースカラムクロマトグラフィーによる幽門垂アセトン粉末プロテアーゼの分離

先述の方法により洗浄したDEAEセファロースを2.0 × 24 cmのカラムにつめ、幽門垂アセトン粉末500 mgを、0.01 Mリン酸緩衝液に溶解した試料液5 mlをのせ、実験方法の項で述べた様にグラジエント法で溶出した。その結果Fig. 1が得られた。波長280 nmの吸光度で求めたタンパクは、5個のピークがみられた。フラクション番号(以下F-no.と略す)62で最も高いピークがみられ、次にF-no. 33で次に大きいピークがみられた。この両ピークが主要ピークであった。また各フラクションについてpH 2.0、pH 7.0、pH 10.5作用酵素活性について調べた結果、何れのpH作用酵素もF-no. 62付近のタンパクピーク部で最も高い活性値を示した。最初のF-no. 33付近のタンパクピーク部でもわずかながらこれらのプロテアーゼ活性がみられた。その他のタンパクピーク部では、これらのプロテアーゼ活性はみられなかった。

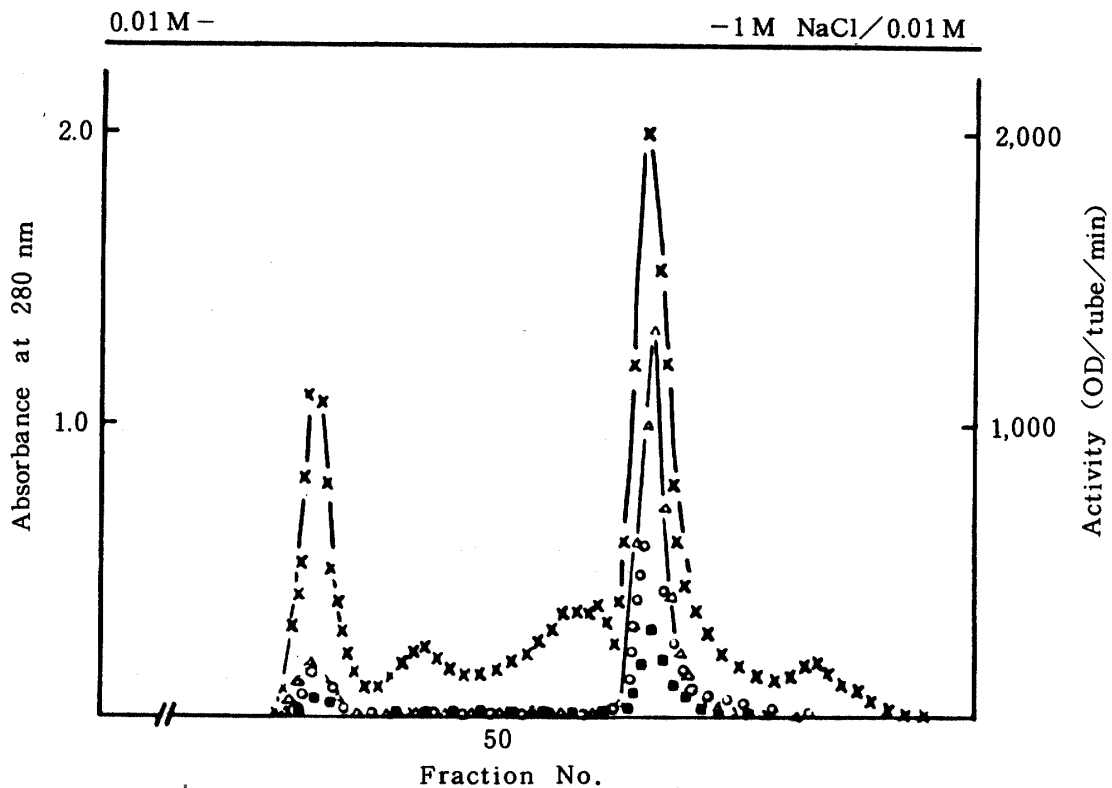


Fig. 1. Chromatogram of Pyloric caecum acetone powder of *A. planci* on DEAE-sepharose column, Column size; 2.0×24 cm, Sample; 500 mg, One fraction; 5 ml, Elution buffer; 0.01 M phosphate buffer; (pH 7.0), (x—x) Protein concentration, (■—■) pH 2.0 Protease activity, (○—○) pH 7.0 activity, (△—△) pH 10.5 activity,

2. セファデックスG-100 カラムクロマトグラフィーによる幽門垂アセトン粉末粗酵素標品の分離

実験方法の項で述べた様に、操作を行い、つめたセファデックスG-100 カラムに、幽門垂アセトン粉末 150 mg を 0.01 M リン酸緩衝液に溶解した試料 5 ml をのせ、そのリン酸緩衝液で溶出を行いその溶出液から得られたタンパク含量と各々のプロテアーゼ活性値の結果を Fig. 2, Fig. 3 に示した。その結果、このクロマトグラフィーでは F-no. 70 付近と F-no. 20 付近で大きなタンパクのピークがみられた。しかしそれらのプロテアーゼ活性は、pH 10.5 作用酵素が最も高い活性値を示し、F-no. 42 付近で大きなピークがみられた。pH 7.0, pH 2.0 作用酵素も同様に F-no. 20 付近でピークがみられた。また、トリプシンの合成基質としてよく知られている Tosyl-Arginine-O-Methyl Ester (以下 TAME と略す) を用いて、その水解酵素活性を測定した結果 F-no. 39 付近にピークがみられた。このクロマトグラフィーでは最も大きなタンパクピークを示した F-no. 70 付近では、何れのプロテアーゼもその活性値が低かった。

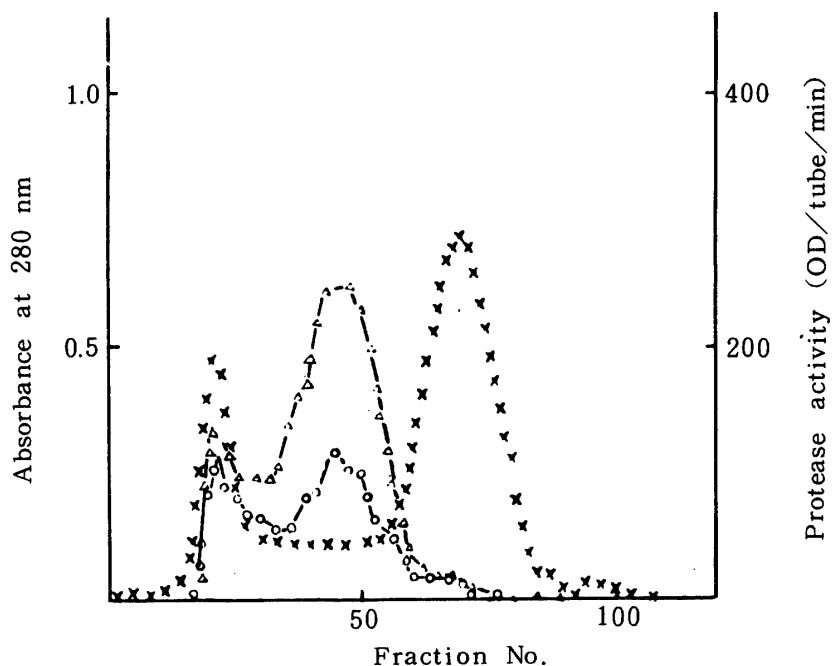


Fig. 2. Sephadex G-100 fractions of Pyloric caecum acetone powder of *A. planci*, Column size; 1.6×85 cm, Sample; 150 mg, One fraction; 2.5 ml, Elution buffer; 0.1M NaCl in 0.01M Phosphate buffer, (\times — \times) Protein concentration, (\circ — \circ) pH 7.0 activity, (Δ — Δ) pH 10.5 activity,

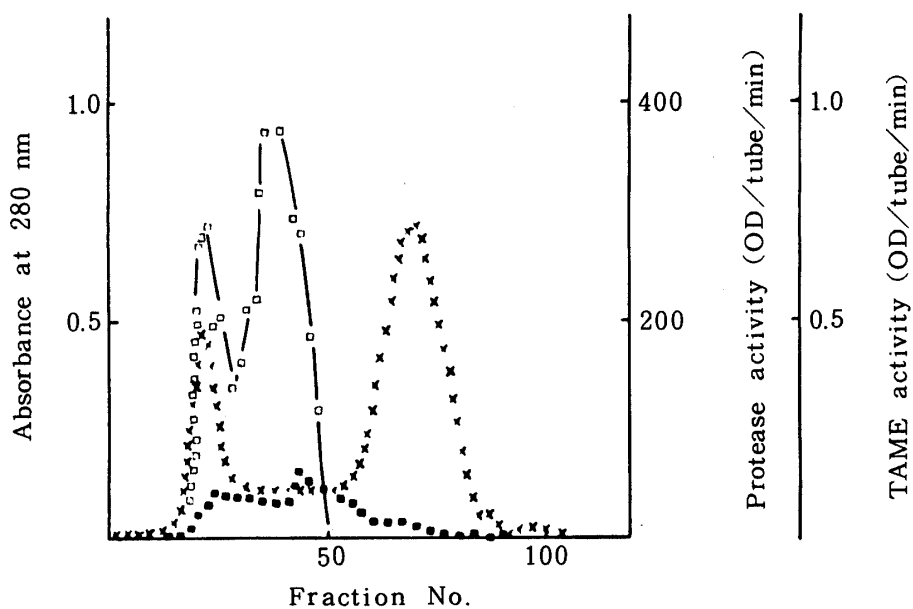


Fig. 3. Sephadex G-100 fractions of Pyloric caecum acetone powder of *A. planci*, Column size; 1.6×85 cm, Sample; 150 mg, One fraction; 2.5 ml, Elution buffer; 0.1M NaCl in 0.01M Phosphate buffer, (\times — \times) Protein concentration, (\blacksquare — \blacksquare) pH 2.0 activity, (\square — \square) TAME hydrolyzing enzyme activity,

3. カラムクロマトグラフィーによる幽門垂アセトン粉末プロテアーゼの精製

前項のDEAEセファロースおよびセファデックスG-100カラムクロマトグラフィー等で、この幽門垂アセトン粉末が十分に分離可能であると思われるため、今回は、DEAEセファロースカラムクロマトグラフィーにかけて得られるプロテアーゼ活性部分をセファデックスG-100カラムクロマトグラフィーにかけて精製することにした。まず、最初に実験方法の項で述べた様に処理したDEAEセファロースを 2.6×85 cmのカラムにつめ、アセトン粉末1.3 gを溶解した試料液5 mlのせて、前述と同様に溶出を行った。その結果Fig. 4が得られた。同図ではタンパク含量のみについて波長280 nmで吸光度を測定したが、その結果はFig. 1で得られたクロマトグラフィーの結果と同パターンを示した。そのためこのタンパクピークにそってF-I~F-Vの分画を、作成した。

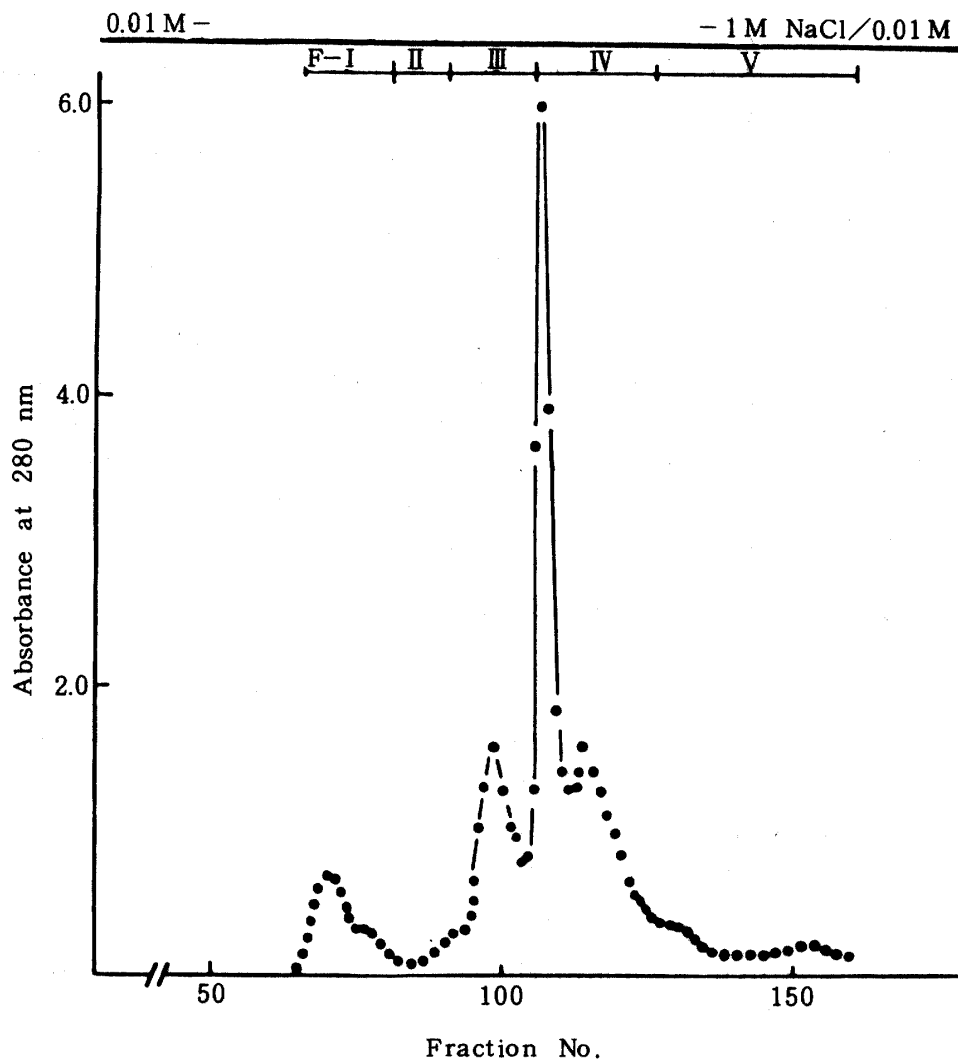


Fig. 4. Chromatogram of Pyloric caecum acetone powder of *A. planci* on a DEAE-sepharose column, Column size; 2.6×85 cm, Sample; 1.3 g, One fraction; 5 ml, Flow rate; 57 ml/hr, Elution buffer; 0.01 M Phosphate buffer (pH 7.0)

プロテアーゼ活性が存在するF-IVを中心として、F-III、F-VについてpH 2.0, pH 7.0, pH 10.5作用酵素のプロテアーゼ活性を測定した。その結果が、Table 1である。何れのpH作用酵素もF-IVでプロテアーゼ活性は高い値を示した。そのため、本研究では、F-IVの部分を集め得られた試料100

Table 1. Protease activity of the fractions obtained by Sepharose column chromatography

	pH 2.0		pH 7.0		pH 10.5	
	Activity (OD/mg/min)	Purification	Activity (OD/mg/min)	Purification	Activity (OD/mg/min)	Purification
Crude	3.33	1	6.53	1	9.45	1
F-III	7.16	2.18	27.30	4.18	24.98	2.66
F-IV	38.93	11.80	145.50	22.30	133.50	14.24
F-V	17.48	5.30	39.90	6.11	60.98	6.50

略をセファデックスG-100のカラムにかけた。その結果Fig. 5, Fig. 6が得られた。同クロマトグラフィーでは、F-no. 160付近に大きなタンパクピークがみられ、次に、F-no. 50付近で小さなタンパクピークがみられた。

また、このクロマトグラフィーについて、前回と同様にpH 2.0, pH 7.0, pH 10.5作用酵素活性およびTAME活性を測定した。この場合も、同様にpH 10.5作用酵素が高い値を示し、F-no. 50, F-no. 70, F-no. 90, F-no. 105, F-no. 120, 付近でピークがみられた。また、pH 2.0, pH 7.0作用酵素ではF-no. 50, F-no. 65, F-no. 120付近でピークがみられた。TAME活性はF-no. 90付近でピークがみられた。そのため、プロテアーゼ活性が最も高いpH 10.5作用酵素の活性ピークにそってフラクションをF-IV-1~F-IV-6まで作成した。

4. 精製各フラクションのプロテアーゼ活性の精製度

先に作成した各プロテアーゼ活性フラクションF-IV-1~F-IV-5について精製度を調べた結果がTable 2である。この表ではpH 10.5作用酵素はF-IV-4で最も純度が高く、比活性は粗酵素の160倍になっていた。次に、F-IV-2で高い値を示し115倍になっていた。また、pH 7.0作用酵素は、F-IV-2とF-IV-3で最も精製され約30倍であった。

Table 2. Purification of the fraction separated by Sephadex G-100 column chromatography

	pH 7.0		pH 10.5	
	Activity (OD/mg/min)	Purification	Activity (OD/mg/min)	Purification
Crude	6.53	1	9.45	1
F-IV	133.50	22.30	133.50	14.13
F-IV-1	28.80	4.41	589.95	62.44
F-IV-2	205.20	31.45	1098.90	116.29
F-IV-3	183.60	28.14	524.55	55.48
F-IV-4	0	0	750.75	158.89
F-IV-5	35.10	5.38	606.45	64.17

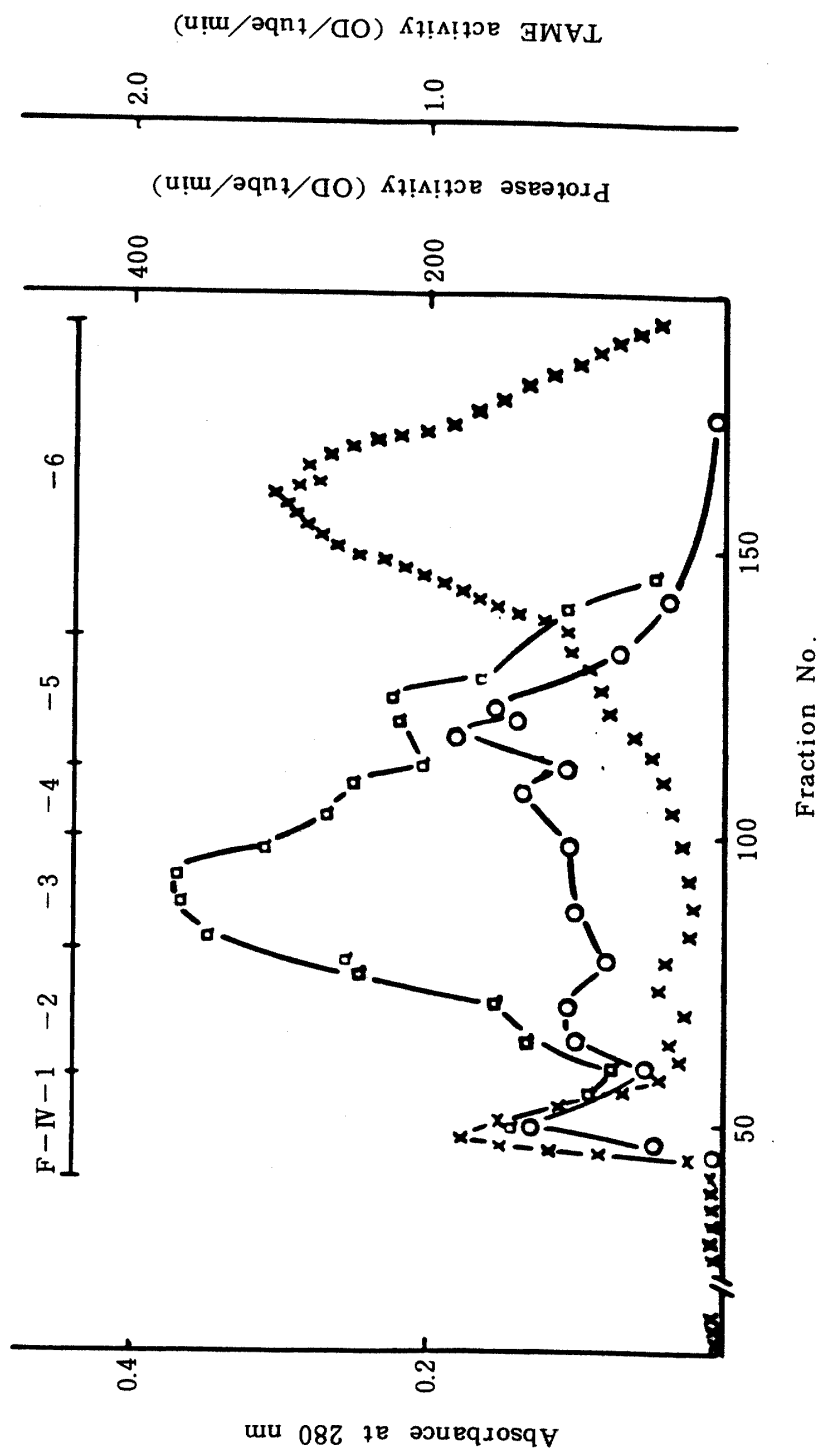


Fig. 5. Sephadex G-100 fractions of F-IV obtained by DEAE-sepharose column, Column size; 2.6×85 cm, Sample; 100 mg, One fraction; 2.5 ml, Flow rate; 60 ml/hr, Elution buffer; 0.1M NaCl in 0.01M phosphate buffer (see legend to Fig. 2 and 3)

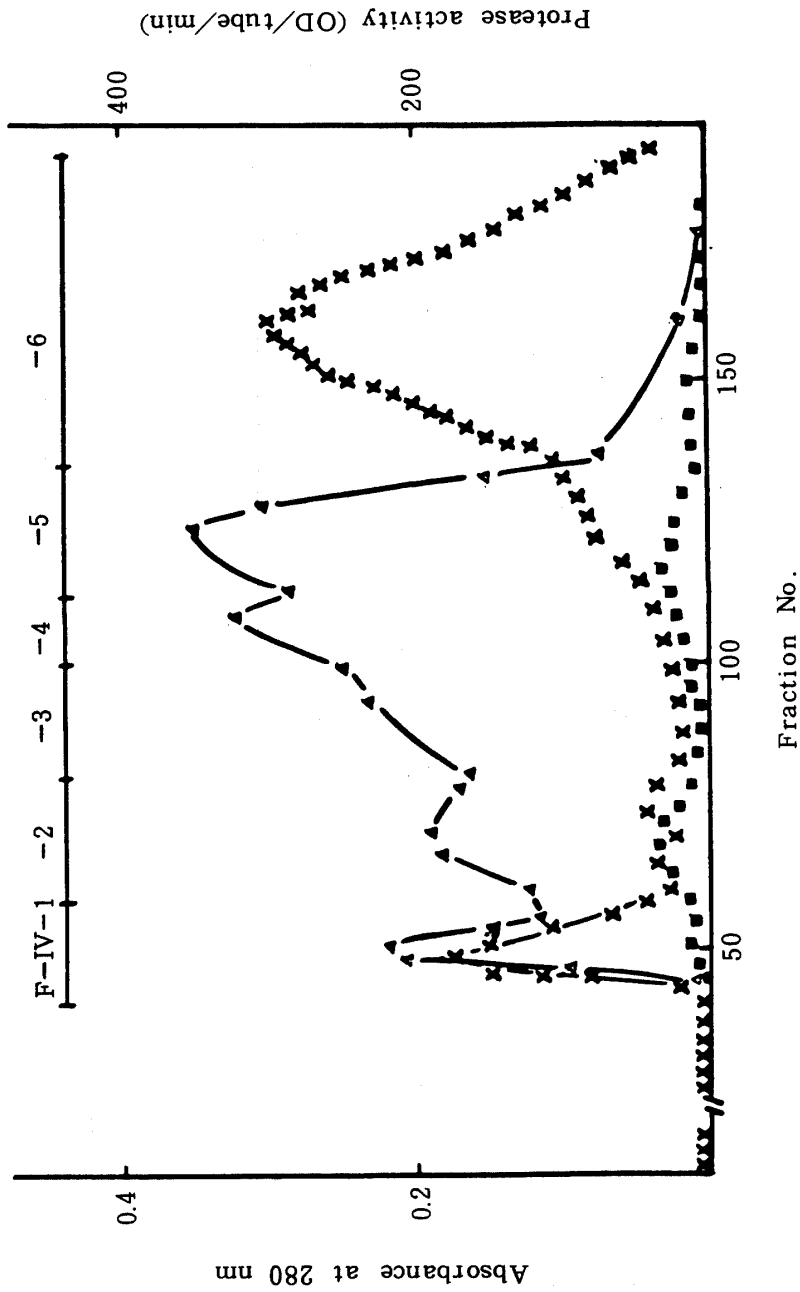


Fig. 6. Sephadex G-100 fractions of F-IV obtained by DEAE-sepharose column, Column size; 2.6×85 cm, Sample; 100 mg, One fraction; 2.5 ml, Flow rate; 60 ml/hr, Elution buffer; 0.1 M NaCl in 0.01 M phosphate buffer, (See legend to Fig. 2 and 3)

5. 精製した各プロテアーゼ活性フラクションのミルク凝固活性

ペプシンにはカゼイン消化活性の他にミルク凝固活性が存在することがよく知られている。本研究でも精製各フラクションについて、ミルク凝固活性を調べることにした。

Table 3 は市販のペプシンによるミルク凝固活性を調べた結果であるが、この場合1 mlあたりの濃度が5 $\mu\text{g/ml}$ でも12%スキムミルクを150秒で凝固させた。同様な操作で、精製した各フラクションについてもミルク凝固活性を調べた。その結果が、Table 4である。この場合F-IV-3で最も速く凝固が起り37分を要した。F-IV-2では49分を要した。他のフラクションでは反応を3時間行ったが凝固は起らなかった。尚、オニヒトデ幽門垂アセトン粉末をセファロースカラムクロマトグラフィーにかけて得られた各フラクションF-I~F-Vの分画についてもそのミルク凝固活性を調べた。その結果がTable 5である。この場合各フラクションとも濃度は50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ で行った。その結果、F-IVで凝固が起り、200 $\mu\text{g/ml}$ で25分、100 $\mu\text{g/ml}$ で50分、50 $\mu\text{g/ml}$ で100分を要した。他の各フラクションでは凝固が起らなかった。

Table 3. Milk clotting activity of pepsin

Conc.	Clotting time					
	30	60	90	120	150	180 (sec)
0	-	-	-	-	-	-
5 (mg/ml)	-	-	-	-	+	++
10 (")	-	-	-	+	++	+++
20 (")	-	-	+	++	+++	+++

Milk clotting assay at pH 4.7, 30°C

Table 4. Milk clotting activity of fractions obtained by Sephadex G-100 column chromatography

Fraction.	F-IV-1	F-IV-2	F-IV-3	F-IV-4	F-IV-5	F-IV-6
Activity (min)	-	49	37	44	-	-

Time required for clotting of 1 ml of 12% skim milk by 1 ml of purified fractions (200 μg) at 30°C

Table 5. Milk clotting activity of fractions obtained by Sepharose column chromatography

Conc.	F-I	F-II	F-III	F-IV	F-V
200 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-	+++ (25)	-
100 "	-	-	-	++ (50)	-
50 "	-	-	-	+ (100)	-

IV 考 察

結果においてのべたように、オニヒトデ幽門垂アセトン粉末粗酵素標品を用いて DEAE-Sephrose カラムクロマトグラフィーを行った後、そのカゼイン水解酵素が集るピークの所をさらに Sepharose G-100 のカラムにかけた所：TAME 水解酵素は3つのピークに、pH 10.5 に活性極大を有するカゼイン水解酵素は4つのピークにおいて現われ、前者の2つのピークは後者の最後に現われる2つのピークの位置とおのおの一致した。

pH 7.0 に活性極大を有するカゼイン水解酵素の活性は、カゼイン水解酵素 (pH 10.5) の2つのピークの間中に1つのピークとして現われた。

カゼイン水解酵素 (pH 10.5) が TAME 水解酵素と同じくトリプシン様酵素か否かをきめるには今一段の酵素精製をまたなければならない。同様に TAME 水解酵素と Milk 凝固酵素がほぼ同一の場所に現われたが、これはおそらく異なる酵素と思われるが、これもその決定には今一段の酵素精製をまたなければならない。

V 要 約

オニヒトデの幽門垂アセトン粉末粗プロテアーゼ標品を順次 DEAE セファロース、セファデックス G-100 を用いてカラムクロマトグラフィーを行って精製を行った。

DEAE セファロースカラムクロマトグラフィーの結果主要プロテアーゼは殆ど1つのピークに集って現われた。このピークの部分を集めて更にセファデックス G-100 のカラムクロマトグラフィーにかけたところ、pH 10.5 にカゼイン水解酵素活性の極大を有するプロテアーゼの主要ピークと TAME を加水分解するトリプシン様酵素の主要ピークとは分離して現われた。ペプシン様酵素はミルク凝固活性を指標として調べたところ上記 TAME 水解酵素のピークの所に活性の極大が見られた。

以上の精製の結果粗プロテアーゼ標品に比し pH 10.5 に極大活性を有するカゼイン水解酵素は159倍にその比活性を増加した。

本研究を終えるにあたり、種々ご協力下さいました琉球大学大学院農学研究科、内原京子嬢に深く謝意を表したい。

VI 参 考 文 献

1. 四方治五郎, 平良悦子, 仲間由信, 安富稚之 1976 オニヒトデ胃部の蛋白質分解酵素について, 琉大農学報 23 117~183
2. 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
3. Kozlovskaya E. and Elyakova L. A. 1973 Proteinases of starfishes, Khim Proteliticheskikh Ferm. Simp. 67~68, Chem Abst. 1975 83 #5427
4. 宇井信生 1967 生化学研究法 II P. 442~443 東京 朝倉書店
5. Sato T., S. Iwanaga, Y. Mizushima, and T. Suzuki 1965 Studies on Snake Venoms, J. Biochem. (Tokyo) 57 380

Summary

Purification of a crude protease preparation of acetone powder obtained from pyloric caeca of *Acanthaster planci* was carried out using DEAE Sepharose column chromatography and Sephadex G-100 column chromatography.

Almost all main proteases appeared in one peak in the DEAE Sepharose column chromatography. When this peak was applied to Sephadex G-100 column, two main active peaks were observed, one containing caseinolytic protease (pH optimum 10.5), the other TAME hydrolysing activity. Milk clotting activity coincided with the peak of the TAME hydrolysing enzyme.

Specific activity of the caseinolytic protease increased 159 times that of the crude enzyme preparation after the two sequential chromatographies.