

ハス種子蛋白分解酵素に関する研究

—— ハス種子蛋白分解酵素の精製法の検討 ——

信濃 栄, 福島 和雄, 田村 五郎

(栄養食品化学研究室)

Sakae SHINANO, Kazuo FUKUSHIMA and Gorō TAMURA : Studies on Lotus

Seed Protease : On the Purification of Lotus Protease

緒 言

ハス (*Nelumbo nucifera* Gaertn) 種子は植物種子中で最も長命であることが W.F.Liby¹⁾ や大賀^{2,3)} の実験で知られている。一般に植物種子は多量の貯蔵蛋白や糖蛋白の如き粘質物を含み、これらが酵素精製を非常に困難ならしめるためか、パパイン、フィチンなどのような果実中のプロテアーゼに比して種子中のプロテアーゼに関する酵素化学的研究は少なく、落花生種子中のアラカイン⁴⁾、大豆種子中のソイン⁵⁾、小豆種子プロテアーゼ⁶⁾に関する高木らの研究がその代表的なものとしてあげられるにすぎない。

著者らは、先に、ハス種子中に酸性プロテアーゼの存在を認め、その二三の性状を報告した⁷⁾ が、今回、前報での酵素活性測定方法を再検討し、それに基づきハス種子プロテアーゼの精製を行つたので報告する。

実験材料及び方法

(1) 使用材料:

市販ビルマ産ハス種子より種皮及び幼芽を除いた子葉部を粉砕機にて粉砕して使用した。

(2) 酵素活性度の測定:

後述の実験の結果、本酵素は尿素変性カゼインを熱変性のものよりも数倍よく加水分解することが判明したので、基質には尿素処理したカゼイン(メルク製 Hammarstein)を使用、Folin試薬による呈色法⁸⁾を用い活性の測定を行つた。従来の測定方法の不備な点を正し、次のような測定方法に改変した。即ち、6 M尿素変性1.2%カゼイン溶液(0.2 Mクエン酸-0.189 Mリン酸2カリ, McIlvaine緩衝液に最終濃度が、カゼイン1.2%, 尿素6 Mとなるよう溶解し、pH4に調製)1 mlに、酵素液1 mlを加え40℃、1時間反応させる。次いでTCA溶液2 mlを加え反応を止め、30分放置後口過する。口液1 mlに0.4 M Na₂CO₃溶液5.0 ml、5倍稀釈Folin試薬1 mlを加え、40℃、20分間発色させ、エルマ光電比色計

を用い660m μ に於ける吸光度を測定する。同時に酵素液-TCA-基質の順に反応させ、同じように処理したものの吸光度をブランクとして差引き、60分間に生成するTCA可溶性Folin呈色物質の増加(660m μ の吸光度)を以て活性を表わした。

(3) 蛋白量の測定:

O.H. Lowry らのCu-Folin法⁹⁾に従つて行つた。標準曲線は結晶牛血清アルブミンを用いて描き、0~200 γ /mlの範囲で測定した。

実験結果及び考察

I 活性測定方法の再検討

(1) 熱変性-及び尿素変性-カゼインを基質にした場合の最適pH:

前報⁷⁾に於て熱変性カゼインに対する粗酵素標品の最適pHは2.5であることを報じたが、今回は前報⁷⁾の方法で調製したSephadex G-100ゲル処理段階の部分精製酵素液(比活性:3.6)を用い、熱変性カゼイン及び6 M尿素変性カゼインに対するハス種子プロテアーゼの最適pHを調べた。

熱変性カゼイン溶液は、カゼインを各pHの緩衝液に2%となるように溶かし、沸騰水中に30分浸漬して完全に溶解させた。緩衝液はHCl-NaCl緩衝液(pH1.5~2.5)、乳酸緩衝液(pH2.5~3.5)を用いた。

尿素変性カゼイン溶液は、カゼイン及び尿素を各々終濃度、2%、6 Mになるよう各pHの緩衝液に溶かし、40℃温水中に1時間浸漬して完全に透明としてから使用した。緩衝液はHCl-KCl緩衝液(pH2.0~3.0)、McIlvaine緩衝液(pH3.0~5.2)、リン酸カリ緩衝液(pH6.0~7.0)を用いた。

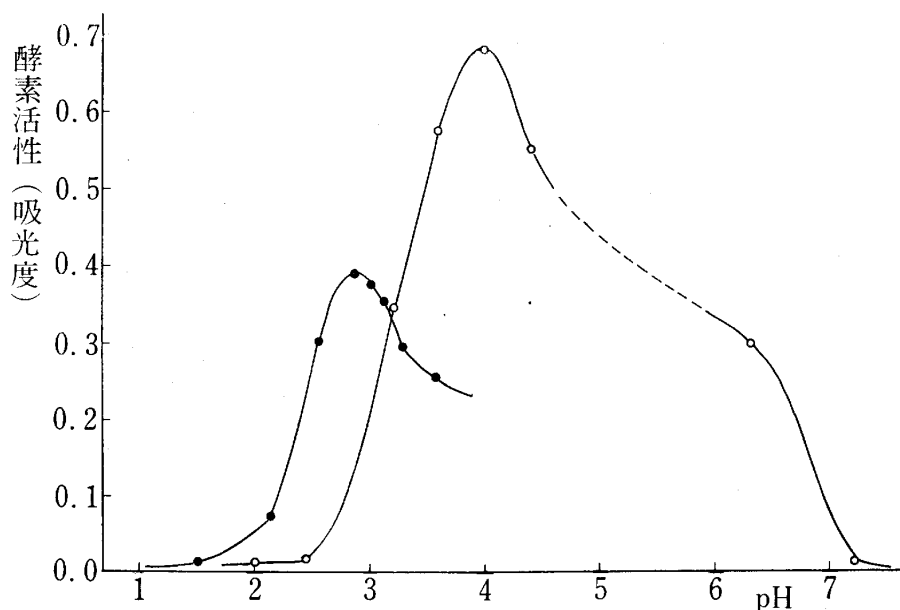
上記のようにして調製した各基質溶液1 mlに酵素液1 mlを加え、40℃、1時間反応させ、常法通りFolin呈色値を比較した。

第1図にその結果を示す。熱変性カゼインに対しての最適pHは若干ずれて2.8附近であつたが、6 M尿素変

性カゼインに対しての最適 pH は 4.0 であった。しかも、熱変性のものよりかなり高い被加水分解性を示した。

(2) 酵素活性と時間との関係

そこで 6 M 尿素変性処理のものが熱変性のものに比

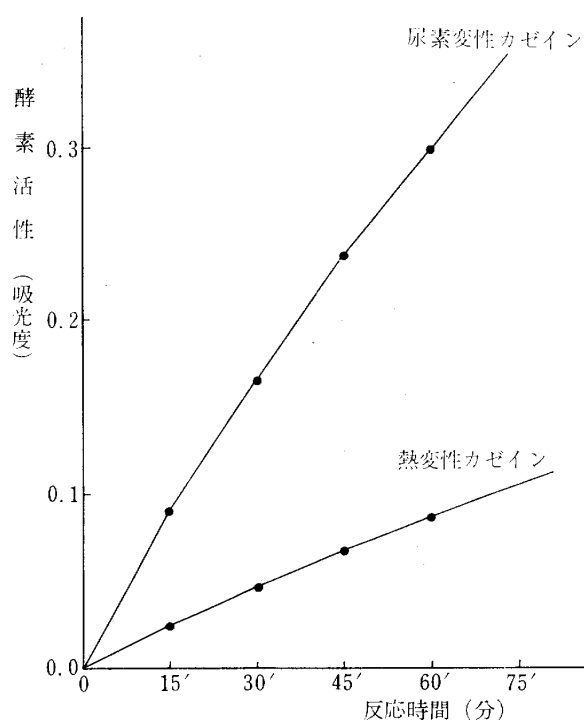


第1図 活性とpHとの関係

—●—●—熱変性カゼイン
—○—○—尿素変性カゼイン

蛋白濃度：500 γ /ml

べ、どの程度水解されやすいかを反応時間を変えて調べた。反応は各々、最適 pH である 4.0 及び 2.8 で行つた。その結果を第 2 図に示す。ハス種子プロテアーゼは熱変性処理のものに比べ、尿素変性カゼイン基質とした場合に 4 倍程度高い活性を示した。



第2図 尿素変性区と熱変性区の被水解性

基質：1.2%熱変性及び 6 M 尿素変性カゼイン
蛋白濃度：75 γ /ml

尿素は蛋白分子の水素結合形成に関する部分に結びつき、蛋白の 2 次構造を変化させる¹⁰⁾ことが知られているが、尿素処理されたカゼインの被水解性の増大はこうゆう解離剤としての尿素的働きに負うところが大きいと思われる。尿素処理のものを未処理のものより良く分解するという性質は、Lineweaver が結晶パペイン¹¹⁾で、高木らが小豆プロテアーゼ⁶⁾で認めている。

そこで今後の酵素活性測定には、基質に 6 M 尿素変性カゼインを用いる前述したような測定条件を使用した。

Ⅱ ハス種子プロテアーゼの精製

流水透析処理を除き、すべての処理は 2～5℃の低温室中で行つた。

(1) 部分精製製品の調製

④ 粗酵素の抽出

ハス種子子葉部粉末を 4 倍量の 10mM リン酸カリ緩衝液 (pH 7.0) に懸濁、20 時間マグネティック・スタラーにて攪拌抽出を行つた。懸濁液を 3,400 $\times$ g、20 分で遠心分離し、なお残査は同条件で再度抽出を行い、各々の上澄液を合してこれを酵素液とした。

⑤ 透析及び pH 処理

粗酵素液を流水に対して 20 時間透析し、生じた多量の沈澱を 3,400 $\times$ g、20 分の遠心分離で除去する。更に上澄液を pH 3.0 の McIlvaine 緩衝液 (10mM クエン酸—6.25 mM リン酸 2 カリ) に対して 20 時間透析、同様、生じた

沈澱は遠心分離で除いた。

② 第1回及び第2回硫安分画

pH3.0の非透析液に硫安を添加し、25%飽和とし、30分放置後12,000×g、20分の遠心分離で多量の不活性沈澱を除いた。上澄液に更に50%飽和まで硫安を加え、pHを3.5に調製し、30分放置後遠心で沈澱区分を集める。この沈澱は少量の10mMリン酸カリ緩衝液(pH7.0)に溶解された。このものに更に硫安を添加し、pH7.0にて同様にして30%~70%飽和の区分に生じる沈澱を集め、同一緩衝液に溶解、24時間透析した。

③ エタノール分画

得られた非透析液に硫安を加え3%硫安溶液とした。これに、0℃以下に保ちながら、その2倍量の-20℃冷エタノールを加えて最終濃度66%とした。生じた沈澱をす早く3,400×g、3分の遠心分離で集め、少量の10mMリン酸カリ緩衝液(pH7.0)に溶解、同一緩衝液に対し24時間透析した。

第1表に試料200gを用いて精製を行つた場合の各段階に於ける比活性及び収率を示した。

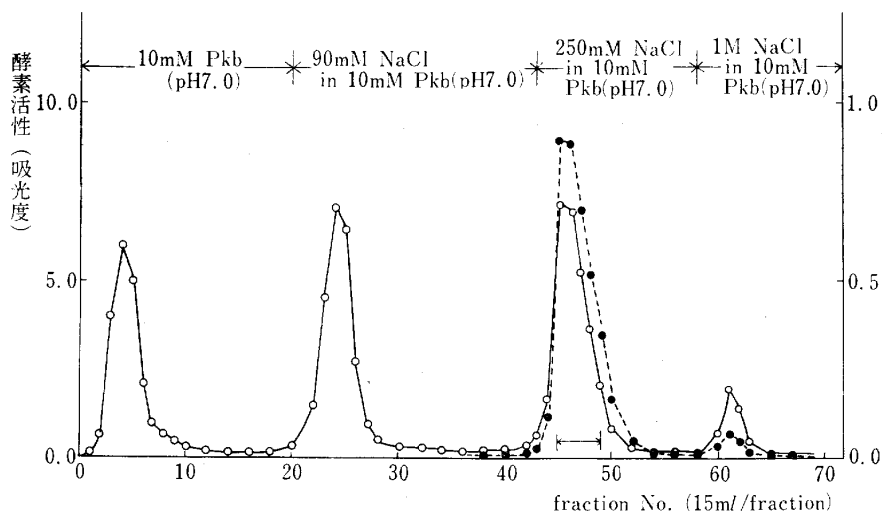
第1表 部分精製の概要

	総容量 (ml)	総活性 (吸光度)	総蛋白 (mg)	比活性 (吸光度/ 蛋白mg)	収率 (%)
粗 酵 素 液	1300	7040	28600	0.246	100
透 析・pH 処 理	1340	4020	4290	0.94	61
硫 安 分 画	100	3300	645	5.12	47
エタノール分画	120	2560	257	10.00	36

以上の操作により、CM セルロースクロマトグラフィー、Sephadex G-100 ゲルろ過処理を経て得られた前報⁷⁾の部分精製標品より精製度に於て高いと思われる比活性10~12のエタノール分画標品を25~35%の収率で得ることができた。

(2) DEAE セルロースのカラムクロマト処理及びバッチ処理

上述の操作により得られたエタノール分画標品(比活性11.0) 120ml を硫安濃縮し、10mMリン酸カリ緩衝液(pH7.0)に対し透析して得られた酵素液 15ml を同一緩衝液で緩衝化した 2.7×15cmのDEAE セルロースカラム



第3図 DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー

カラム: 2.7×15cm, 10mMリン酸カリ緩衝液(pH7.0)にて緩衝化

試料: エタノール分画標品(比活性11.0), 蛋白量205mg

●●●●● 酵素活性, —○—○— 蛋白濃度

に吸着させた。次ぎにNaCl濃度を90mM, 250mM, 1M (10mMリン酸カリ緩衝液中) と上げstepwiseに溶出させた。溶出液は15ml ずつ集め酵素活性及び蛋白量を測定した。

第3図にそのクロマト図を示す。活性の高い画分(矢印で示した範囲)を集め、硫安濃縮を行い10mMリン酸カリ緩衝液(pH7.0)に対し透析した。

第2表にクロマト処理の概要を示したが、2倍弱の比活性の上昇しか見られず、しかも収率は35.4%と低かつ

第2表 DEAEセルロースカラムクロマト処理の概要

	総活性 (吸光度)	総蛋白 (mg)	比活性 (吸光度/ 蛋白mg)	収率 (%)
エタノール分画標品	2250	205.0	11.0	—
クロマト処理活性部硫安濃縮液	797	41.0	19.3	35.4

た。これは、活性部の再クロマトを行うと比活性は13.8と逆に低下することから、DEAE セルロースによつてハ

ス種子プロテアーゼは若干失活するためではないかと考えられる。

そこでクロマト処理に比べ短時間に行えるバッチ処理を検討した。

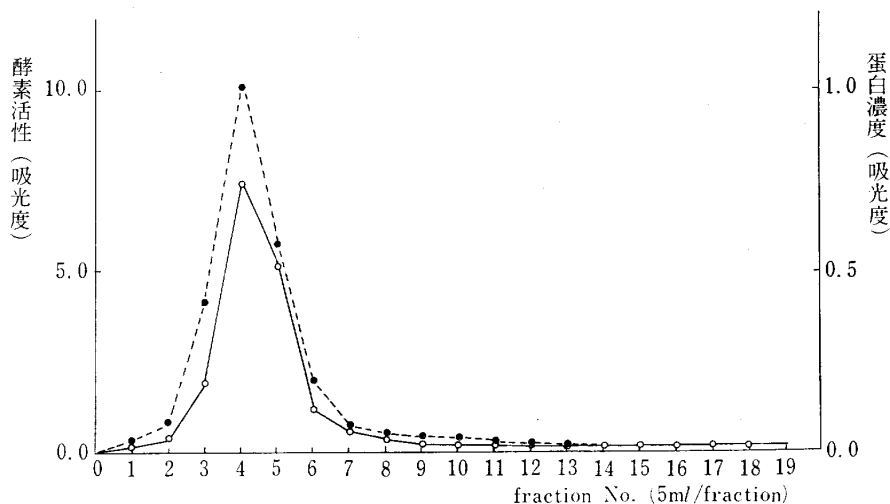
エタノール分画標品(比活性10.0) 120mlに10mM リン酸カリ緩衝液(pH7.0)で緩衝化した少量のDEAEセルロースを加え、攪拌しながら10分間保つた後、クロマト管に注入し、圧搾口過で口液を除く。酵素蛋白はほぼ完全にDEAEセルロースに吸着された。次ぎに同一緩衝液中60mMのNaCl液で懸濁し圧搾口過を数回繰返して洗滌後、同一緩衝液中500mMのNaCl液で同様に処理して活性酵素を溶出させた。溶出液は硫酸濃縮を行い、同一緩衝液に対して24時間透析した。第3表にその概要を

示す。収率は処理前後に関する限り68%で、比活33.5と約3倍精製度を高めることができ、クロマト処理に比し非常に有効であることが分つた。この濃縮・透析を行つた酵素は-20℃に保存した場合、少なくとも1ヶ月間は酵素活性に変化は見られない。

第3表 DEAEセルロースバッチ処理の概要

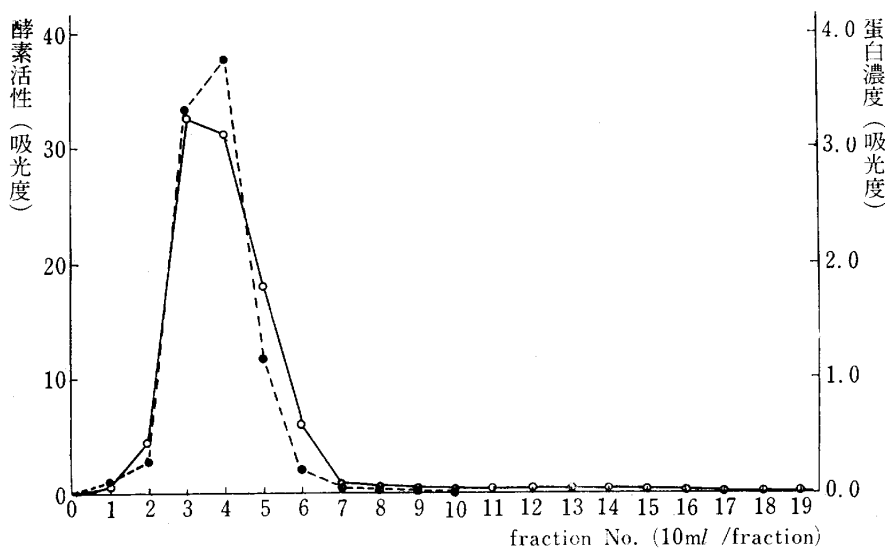
	総活性 (吸光度)	総蛋白 (mg)	比活性 (吸光度/ 蛋白mg)	収率 (%)
エタノール分画標品	2560	257.0	10.0	—
バッチ処理活性部硫酸濃縮液	1750	52.5	33.5	68

(3) Sephadex G—100及びG—200ゲル口過



第4図 Sephadex G—100ゲル口過

カラム: 1×28cm, 10mMリン酸カリ緩衝液(pH7.0)にて緩衝化
試料: DEAEセルロースカラムクロマト標品(比活性20.2), 蛋白量5.4mg
●●●●● 酵素活性, —○—○— 蛋白濃度



第5図 Sephadex-G200ゲル口過

カラム: 1.8×30cm, 10mMリン酸カリ緩衝液(pH7.0)にて緩衝化
試料: DEAEセルロースカラムクロマト標品(比活性20.2) 蛋白量・62mg
●●●●● 酵素活性, —○—○— 蛋白濃度

DEAE クロマト処理の活性ピークを硫酸濃縮し, 10mMリン酸カリ緩衝液 (pH7.0) に対し透析した (比活性20.0). これを同一緩衝液で緩衝化した Sephadex G-100 カラム (1.0×28cm) 及び G-200 カラム (1.8×30cm) に添着し, 同一緩衝液を用いゲル口過を行った. 第4図, 第5図に各々の溶出パターンを示すが, いずれも, 活性と蛋白とがほぼ重なって, しかもす早く溶出されてしまい, 精製の目的は全く達せられなかった.

(4) CM セルロースカラムクロマトグラフィー

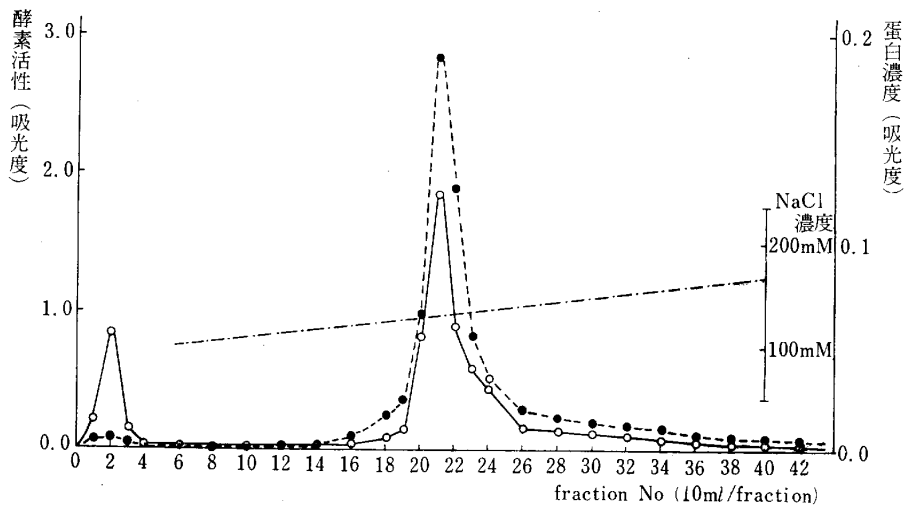
DEAE セルロースバッチ処理後, 硫酸濃縮によつて得

られた酵素標品(比活性33.5) 5mlを, 2mMクエン酸-1.25mMリン酸2カリ Mcllvaine緩衝液 (pH5.0) に対し24時間透析した. これを同一緩衝液にて緩衝化したCMセルロースカラム (1.5×7cm) に吸着させた. 溶出は同一緩衝液中のNaCl濃度を100mM~200mMに連続的に上昇させる gradient elution 法によつて行った. 溶出液は10mlずつ集め, 溶出後直ちに1Mリン酸緩衝液 (pH7.1) を0.5ml添加してpHを7.0に調製した.

第6図にそのクロマト図を示す.

酵素活性はNaCl濃度, 125mM附近に単一ピークとし

第6図 CM セルロースカラムクロマトグラフィー



カラム: 1.5×7cm, Mcllvaine緩衝液(pH5)で緩衝化

試料: DEAEセルロースバッチ処理標品 (比活性33.5) 蛋白量・7.5mg

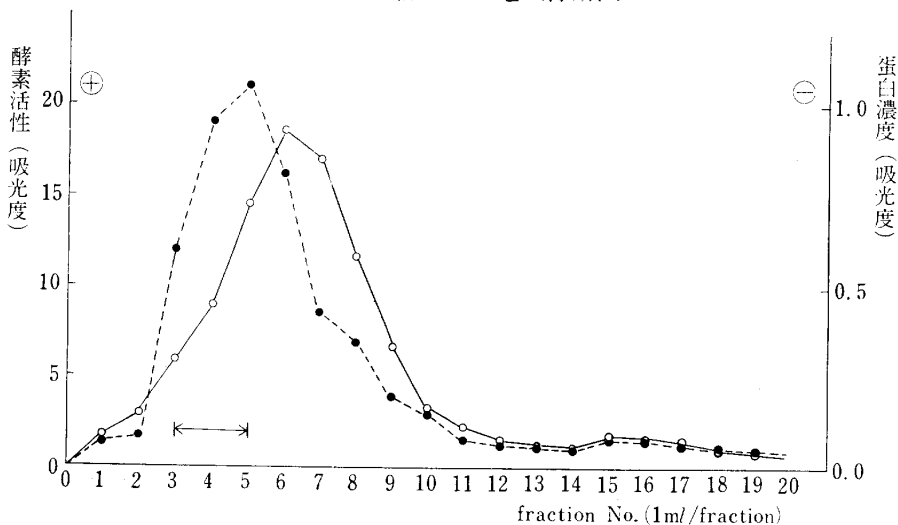
泳動条件: 600V (3.0~3.5mA) 30時間

●●●●●●●●●● 酵素活性, —○—○— 蛋白濃度

て溶出される. しかし活性と蛋白のパターンが完全には一致しないので, このピークが蛋白的に均一であるとは

考え難い. この処理で比活性は37.6と若干上がるが, 収率は処理前の30%前後で思わしくない. 又CMセルロース

第7図 澱粉ゾーン電気泳動図



カラム: 1.2×55cm, 使用緩衝液: 50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.6)

試料: DEAEセルロースバッチ処理標品 (比活性33.5), 蛋白量4.5mg

泳動条件: 600V (3.0~3.5mA), 30時間

●●●●●●●●●● 酵素活性, —○—○— 蛋白濃度

カラムから溶出する活性フラクションはかなり不安定になつており、pH 5 の溶出液そのままの条件下では 1 日後に約 50% 失活してしまい、リン酸カリ緩衝液で pH 7.0 調製後でも若干の失活が起きる。安定性については現在検討中である。

5 澱粉ゾーン電気泳動

DEAE セルロースバッチ処理により得られた酵素標品(比活性 33.5) 3 ml を硫酸濃縮で 1 ml とし、50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) に対し 24 時間透析した。この非透析液を同一緩衝液で緩衝化した馬鈴薯澱粉カラム (1.2×40cm) に添着後、更に同一緩衝液にて緩衝化した澱粉を注入し、1.2×55cm のカラムを作成した。これを緩衝液管に接続し、U 字型に装置し、氷を浮かせた水槽中に垂直に浸す。電極を挿入した 5% KCl 溶液槽と寒天橋で連結し、定電圧 600V (3.0~3.5mA) の条件下で 30 時間泳動を行った。泳動終了後、同じ 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) にて溶出を行う。溶出液は 1 ml ずつ集め活性及び蛋白量を測定した。第 7 図にその泳動パターンを示す。

全体として陽極側に動くが、活性と蛋白のパターンがかなりずれて現出し、この精製段階ではまだかなりの不純蛋白を含むことを認めた。図中の矢印範囲の画分を集めると、比活性は 52.0、この処理での収率は 42%、粗酵素液からエタノール分画、DEAE セルロースバッチ処理、電気泳動まで全操作を通しての収率は 10.5% であった。

今後の検討次第では、十分、精製手段として用い得ると考えられる。

要 約

ハス種子プロテアーゼの活性測定条件及び精製法の検討を行った。

(1) 6M 尿素変性カゼインに対する最適 pH は 4.0 で、この条件下では熱変性のものを基質とした場合に比して、約 4 倍の高活性を示した。そこで、酵素活性の測定は、尿素処理したものを基質として使用した。

(2) ハス種子から抽出した酵素液を、透析、pH 処理、硫酸分画、エタノール分画などで処理し、前報に於ける Sephadex G-100 ゲル口過処理段階のものより精製度において若干高い部分精製酵素標品を得た。

(3) 更に精製された酵素標品を得るため、DEAE セルロースのクロマト及びバッチ処理、Sephadex G-100 及び G-200 ゲル口過、CM セルロースカラムクロマトグラフィー、澱粉ゾーン電気泳動の検討を行った。DEAE セルロースバッチ処理及び澱粉ゾーン電気泳動の使用により部分精製標品を精製し、5 倍程精製度を高めることが

できたが、しかし、この精製酵素はまだ相当の不純蛋白を含むことを認めた。

文 献

- 1) W.F.Libby : Science, 114, 291 (1951).
- 2) 大賀一郎 : 植物及動物, 4, 1505 (1936).
- 3) // : 採集と飼育, 13, 206 (1951).
- 4) G.W.Irving Jr. et al : Arch. Biochem., 6, 351 (1945).
- 5) H. Tauber : "The Chemistry and Technology of Enzymes" John Wiley & Sons, New York (1945).
- 6) 阿久根了, 高木茂明 : 日農化誌, 34, 352 (1960).
高木茂明 : 日農化誌, 34, 357 (1960).
// : // , 34, 926 (1960).
// : // , 34, 929 (1960).
- 7) 信濃栄, 島田洋子, 田村五郎 : 日農化誌, 投稿中
- 8) O.Folin, V.Giocalteu : J. Biol. Chem., 73, 627 (1927).
- 9) O.H.Loury et al : J. Biol. Chem., 193, 256 (1951).
- 10) F.Haurowitz : "Chemistry and Biology of Proteins" Bloomington, Indiana, (1950).
- 11) H.Lineweaver, S.R. Hoover : J. Biol. Chem., 137, 325 (1941).

Summary

(1) The lotus seed protease showed the maximum activity at pH 4.0 for 6M urea denatured casein. The degree of hydrolysis for this urea denatured substrate was higher than that for heat denatured substrate (about 4 times).

Accordingly, the enzyme assay system, using urea denatured casein as the substrate, was employed in order to determine the proteolytic activity.

(2) The partially purified preparation, obtained by dialysis and pH treatments, and fractional precipitations with ammonium sulfate and ethanol, showed relatively higher purification degree than that of the Sephadex G-100 gel filtration state reported in the previous paper.

(3) In order to obtain further purified preparation, the purification procedures of chromatography and batch separation on DEAE cellulose, Sephadex-G-100 and G-200 gel filtrations, CM cellulose column chromatography, and starch zone electrophoresis, were examined.

By uses of DEAE cellulose batch separation and electrophoresis, about 5 folds increase, in specific activity, compared with the partially purified preparation, was obtained. It seems, however, that this purified enzyme was not so homogenous on starch electrophoresis and also on CM cellulose column chromatography.