HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒトデAsterias amurensisのカルボキシペプチダーゼB様酵素の精製とその性質
Author(s)	岸村, 栄毅; 林, 賢治
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 43(4), 169-176
Issue Date	1992-11
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/24099
Type	bulletin (article)
File Information	43(4)_P169-176.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北 大 水 産 彙 報
43(4), 169-176. 1992.

ヒトデ *Asterias amurensis* のカルボキシペプチダーゼ B 様酵素の精製とその性質

岸村　栄毅*・林　　賢治*

Purification and Properties of Carboxypeptidase B-Like Enzyme from the Starfish *Asterias amurensis*

Hideki KISHIMURA* and Kenji HAYASHI*

Abstract

Carboxypeptidase B-like enzyme was purified from a crude enzyme solution prepared from the pyloric caeca of the starfish *Asterias amurensis* by gel filtration and ion-exchange chromatography. The homogeneity of the enzyme was demonstrated by polyacrylamide gel electrophoresis.

The molecular weight of the enzyme was estimated to be about 34,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and temperature of the enzyme for hydrolysis of benzoyl-glycyl-L-arginine were found to be around a pH of 7.5 and 55°C, respectively, and the enzyme was stable below 45°C and at a pH of 6-10. The enzyme was inhibited by EDTA.

緒　　言

ヒトデ類の消化プロテアーゼについては，比較生化学的観点から主にトリプシン様酵素が研究されており，これまでに数種のヒトデ類からトリプシン様酵素が精製・単離され，それらの性質が検討されている[1~7]。一方，ヒトデ類のトリプシン様酵素以外のプロテアーゼを精製・単離した例は少なく，わずかにヒトデ類 *Dermasterias imbricata* のカルボキシペプチダーゼ B 様酵素[8] およびヒトデ *Asterias amurensis* のカルボキシペプチダーゼ A 様酵素[9] について報告されているに過ぎない。

本報では，ヒトデ *A. amurensis* の幽門盲のうからカルボキシペプチダーゼ B 様酵素を精製・単離したので，その性質について検討した。

材 料 と 方 法

試料　ヒトデ *A. amurensis* は 1991 年に函館沖で捕獲され，数日間－20°C に凍結保存した。

アセトンパウダーの調製　ヒトデ幽門盲のうのアセトンパウダーの調製は前報[7] と同様の方法で行った。

粗酵素液の調製およびゲルろ過　ヒトデ幽門盲のうアセトンパウダーからの粗酵素液の調製お

* 北海道大学水産学部水産化学実習工場
(*Training Factory for Practice in Fisheries Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

よびそのゲルろ過は前報[7]と同様に行った。

イオン交換クロマトグラフィー イオン交換クロマトグラフィーは，DEAE-セルロース (Whatman DE-52) カラムを用いて行った。カラムはあらかじめ 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化し，同緩衝液下で 30 mM NaCl によりタンパク質を溶出させた。

酵素活性の測定 カルボキシペプチダーゼ B 様酵素の活性測定は，ベンゾイル-グリシル-L-アルギニン (Bz-Gly-Arg) を基質として Folk らの方法[10]に準じて行った。カルボキシペプチダーゼ A 様酵素の活性は，ベンゾイル-グリシル-L-フェニルアラニン (Bz-Gly-Phe) を基質として Folk and Schirmer の方法[11]に準じて行った。トリプシン様酵素の活性は，*N*-トシル-L-アルギニンメチルエステル (TAME) を基質として Hummel の方法[12]に準じて測定した。カルボキシペプチダーゼ B 様および A 様酵素の活性単位は 254 nm, トリプシン様酵素の活性単位は 247 nm における吸光度をそれぞれ 1 分間に 1 増加させる活性を 1 ユニットとした。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) は，pH 8.9 の 10% スラブゲル[13]を用いて行った。ゲルの染色は，Coomassie Brilliant Blue R-250 を用いた。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は，Laemmli の方法[14]に準じて行った。ゲルの染色は，Coomassie Brilliant Blue R-250 を用いた。分子量マーカーには MW-SDS-キット (Sigma Chemical Co.) を用いた。

タンパク質の定量 タンパク質の定量は牛血清アルブミンを標準タンパク質とし，Lowry らの方法[15]に準じて行った。

結　　果

カルボキシペプチダーゼ B 様酵素の精製 ヒトデ幽門盲のうから調製した粗酵素液をセファクリル S-200 によるゲルろ過に供した。図 1a に示すように，基質 Bz-Gly-Arg を分解する 1 つのカルボキシペプチダーゼ B 様酵素活性画分が得られた。この活性画分を硫安処理 (75% 飽和) によ

Fig. 1. Chromatography for purification of the carboxypeptidase B-like enzyme from *A. amurensis*.

a: Gel filtration (1st) on Sephacryl S-200 of the crude enzyme solution prepared from the pyloric caeca. The crude enzyme solution was applied to a column (ϕ2.7×45 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). The elution was carried out with the same buffer at a flow rate of 30 m*l*/h. Each 2.5 m*l* fraction was collected.

b: DEAE-cellulose chromatography (1st) of the enzyme fraction obtained from the gel filtration in Fig. 1a. The enzyme fraction concentrated by ammonium sulfate precipitation was applied to a column (ϕ1.2×18 cm) equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). The elution was carried out with the same buffer containing 30 mM NaCl at a flow rate of 20 m*l*/h. Each 4.0 m*l* fraction was collected.

c: Gel filtraion (2nd) on Sephadex G-50 of the enzyme fraction obtained from the ion-exchange chromatography in Fig. 1b. The enzyme fraction concentrated by lyophilization was applied to a column (ϕ3.9×62 cm). All other conditions are the same as in Fig. 1a.

d: Gel filtration (3rd) on Sephadex G-50 of the enzyme fraction obtained from the gel filtration in Fig. 1c. The enzyme fraction concentrated by lyophilization was applied to a column (ϕ3.9×62 cm). All other conditions are the same as in Fig. 1a.

e: DEAE-chromatography (2nd) of the enzyme fraction obtained from the gel filtration in Fig. 1d. The enzyme fraction concentrated by lyophilization was applied to a column (ϕ1.2×18 cm). All other conditions are the same as in Fig. 1b.

——, Protein (A_{280nm}); —•—, carboxypeptidase B-like enzyme activity (ΔA_{254nm}); ----, NaCl (M).

り濃縮した。次に，濃縮された試料は 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に対して透析した後，この試料を DEAE-セルロース (Whatman DE-52) によるイオン交換クロマトグラフィーに供した。10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) であらかじめ平衡化したカラム (ϕ1.2×18 cm) に試料を添加し，同緩衝液下で 30 mM NaCl によりタンパク質を溶出させた。図 1b に示すように，1 つのカルボキシペプチダーゼ B 様酵素活性画分が得られた。次に，この活性画分を凍結乾燥により濃縮した。濃縮された試料は 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に対して透析した後，この試料をセファデックス G-50 によるゲルろ過に供した。50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) であらかじめ平衡

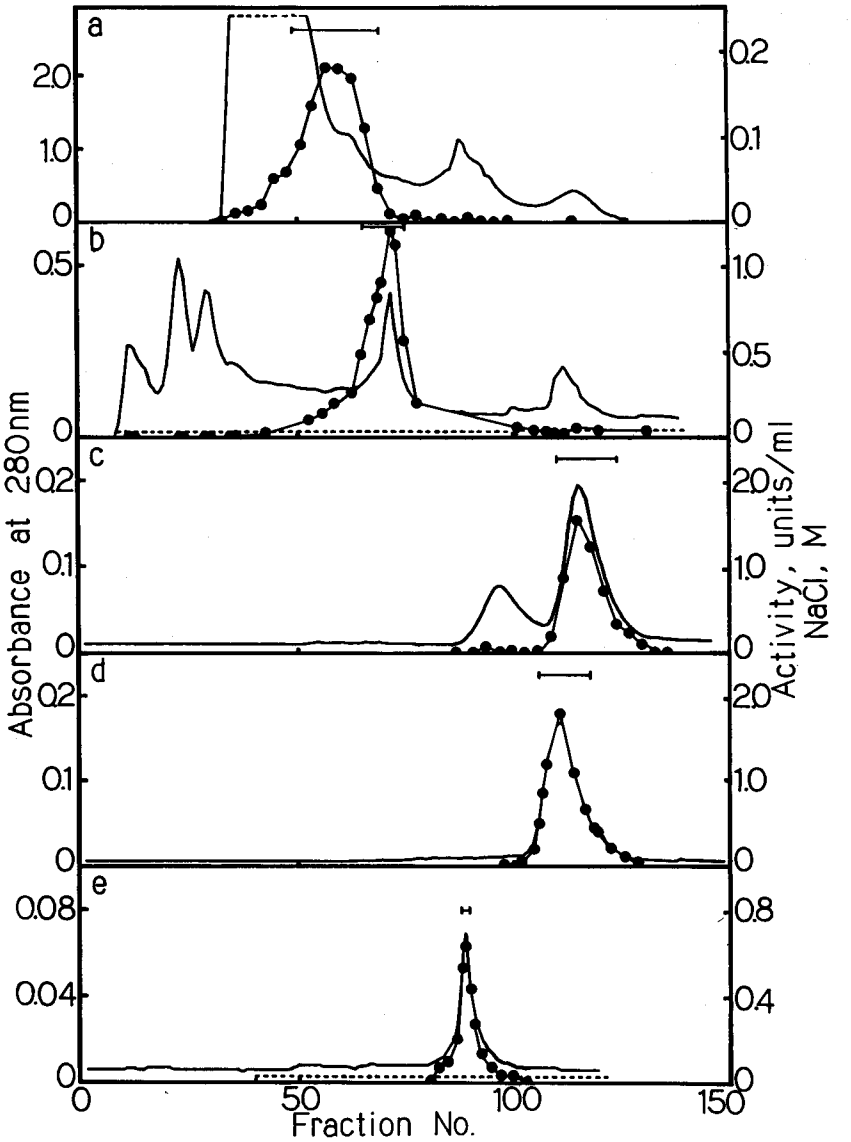

Table 1. Purification of carboxypeptidase B-like enzyme from *A. amurensis*.

Purification stages	Protein (mg)	Total activity (units)*	Specific activity (units/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
Crude enzyme solution	12371	565	0.05	1	100
Gel filtration (1st) on Sephacryl S-200	723	304	0.4	8	54
DEAE Chromatography (1st) on DE-52	12	188	15.7	314	33
Gel filtration (2nd) on Sephadex G-50	2.7	109	40.4	808	19
Gel filtration (3rd) on Sephadex G-50	1.8	89	49.4	988	16
DEAE Chromatography (2nd) on DE-52	0.7	32	45.7	914	6

* A unit of activity was defined as ΔA_{254nm}/min.

化したカラム (ϕ3.9×62 cm) に試料を添加し，同緩衝液によりタンパク質を溶出させた。図 1c に示すように，1つのカルボキシペプチダーゼ B 様酵素活性画分が得られた。次に，この活性画分を凍結乾燥により濃縮した。濃縮された試料は前述の条件でセファデックス G-50 による再ゲルろ過と，DEAE-セルロースによる再イオン交換クロマトグラフィーに供した。図 1d, e に示すように，溶出タンパク質とカルボキシペプチダーゼ B 様酵素活性はいずれも単一のピークを示し，しかも両者はよく一致した。この活性画分を凍結乾燥により濃縮し，次いで濃縮された試料は PAGE および SDS-PAGE に供した。図 2a に示すように，PAGE および SDS-PAGE のいずれの場合においても 1 本のバンドが検出された。そこでこのタンパク質画分を精製酵素とした。

ヒトデのカルボキシペプチダーゼ B 様酵素の各精製段階における精製度および活性回収率を表 1 に示す。幽門盲のうから調製した粗酵素液に対して，精製酵素の比活性は 914 倍となり，活性回収率は約 6% であった。

カルボキシペプチダーゼ B 様酵素の性質 本実験において精製されたヒトデのカルボキシペプチダーゼ B 様酵素の分子量は，SDS-PAGE における移動度から約 34,000 と推定された (図 2b)。

本酵素の Bz-Gly-Arg 加水分解に対する最適 pH は 7.5 付近であり (図 3a)，最適温度は 55°C 付近であった (図 3b)。本酵素を pH 8.0 で 15 分間プレインキュベートしてその温度安定性を測定したところ，45°C を越えると活性が低下し，60°C で約 30% となった (図 3c)。また，本酵素を 30°C で 30 分間プレインキュベートした場合，pH 6-10 の範囲において安定であったが，pH 5.0 および pH 4.0 においてそれぞれ約 80% と 45% に活性が低下した (図 3d)。

本酵素に 1 mM EDTA を加えて pH 7.5, 25°C でプレインキュベートを行い，活性の変化を検討した (図 4)。その結果，本酵素の活性は 6 時間で約 11% に低下した。

次に，本酵素に 1 mM の金属イオンを加えて pH 7.5, 25°C で 2 時間プレインキュベートを行い，活性の変化を検討した (表 2)。その結果，本酵素の活性は Ca^{2+} にはほとんど影響を受けず，Mg^{2+} によりわずかに低下した。また，本酵素の活性は Co^{2+} により約 1.8 倍に上昇し，Zn^{2+} および Hg^{2+} により大きく低下した。

一方，本酵素はカルボキシペプチダーゼ A の基質である Bz-Gly-Phe およびトリプシンの基質である TAME を分解しなかった。

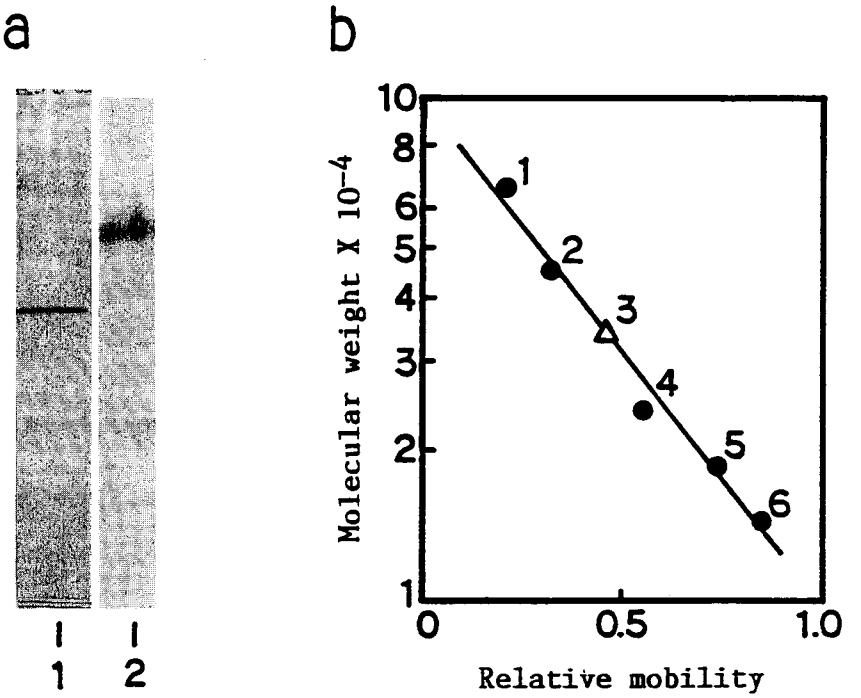

Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of carboxypeptidase B-like enzyme from *A. amurensis* and estimation of its molecular weight by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.
a: Electrophoresis was performed using a 0.1% SDS-12.5% polyacrylamide gel (1) and a 10% polyacrylamide gel at pH 8.9 (2).
b: 1, bovine plasma albumin (M.W. 66,000); 2, ovalbumin (45,000); 3, starfish carboxypeptidase B-like enzyme; 4, bovine trypsinogen (24,000); 5, bovine milk β-lactoglobulin (18,400); 6, egg lysozyme (14,300).

Table 2. Effect of metal ions on the activity of carboxypeptidase B-like enzyme from *A. amurensis*.

Metal compound (1 mM)	Relative activity (%)
None	100
$CaCl_2$	97
$MgCl_2$	89
$CoCl_2$	181
$ZnCl_2$	29
$HgCl_2$	3

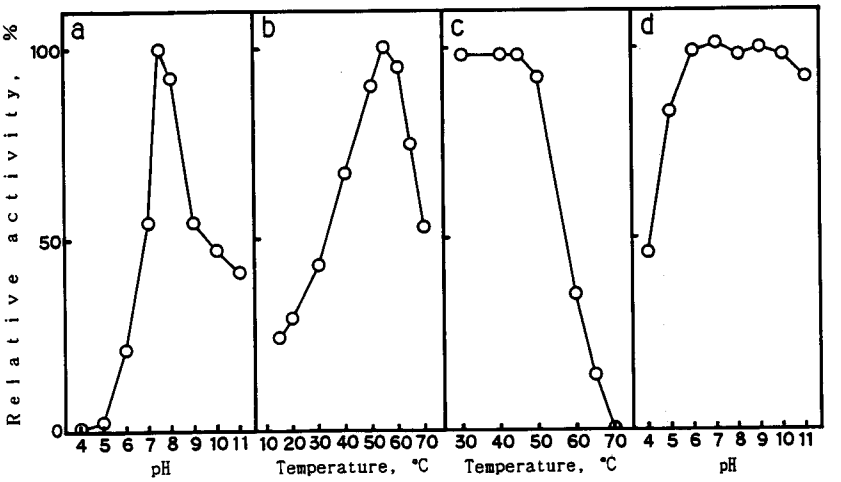

Fig. 3. Effects of pH and temperature on the activity of carboxypeptidase B-like enzyme from *A. amurensis*.

a: The activity was determined in 25 mM buffer solutions [acetic acid-sodium acetate (pH 4.0-6.0), sodium phosphate monobasic-dibasic (pH 6.0-7.5), Tris-HCl (pH 7.5-9.0), and sodium borate-sodium hydroxide (pH 9.0-11.0)] at 25°C.

b: The activity was determined at pH 7.5 and at various temperatures.

c: The enzyme was kept at 30-70°C and at pH 8.0 for 15 min, and then the remaining activity was determined at 25°C and at pH 7.5.

d: The enzyme was kept at 30°C and at pH 4.0-11.0 for 30 min, and then the remaining activity was determined at 25°C and at pH 7.5.

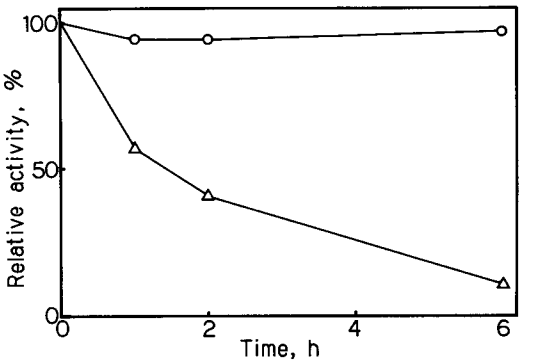

Fig. 4. Effect of EDTA on the activity of carboxypeptidase B-like enzyme from *A. amurensis*. The enzyme was preincubated with (△) or without (○) 1 mM EDTA in a 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) at 25°C for 0-6 h, and then the remaining activity was determined at 25°C and at pH 7.5.

考　　察

カルボキシペプチダーゼ B 様酵素は，種々の水産動物すなわちアブラツノザメ *Squalus acanthias*[16]，肺魚 *Protopterus aethiopicus*[17]，white shrimp *Penaeus setiferus*[18]，ヒトデ類 *D. imbricata*[8]，ザリガニ *Astacus fluviatilis*[19,20]，コイ *Cyprinus carpio*[21]，ナマズ *Parasilurus asotus*[22,23]，オキアミ *Euphausia sperba*[24] などから精製・単離され，それらの性質が調べられている。本実験ではヒトデ *A. amurensis* からカルボキシペプチダーゼ B 様酵素を電気泳動的に単一な成分にまで精製した。

本実験で得られたヒトデのカルボキシペプチダーゼ B 様酵素の活性は EDTA により阻害され，この結果は肺魚[17] およびナマズ[23] のそれと同様であった。また，本酵素はナマズのカルボキシペプチダーゼ B 様酵素[23] と同様に，その活性が Co^{2+} の添加により上昇し，Zn^{2+} および Hg^{2+} の添加により低下した。

本酵素の最適 pH は 7.5 付近であり，この結果はヒトデ類 *D. imbricata* (最適 pH : pH 7-7.5)[8]，ナマズ (pH 7.5)[23]，オキアミ (pH 7.0)[24]，white shrimp (pH 6.5-8.0)[18] とほぼ同様であった。また，本酵素の最適温度は 55°C 付近を示したが，この結果はオキアミ (最適温度 : 45°C)[24] と相違した。一方，本酵素の pH 安定性 (図 3c) はコイ[21] およびナマズ[23] の結果と類似し，また温度安定性 (図 3d) はヒトデ類 *D. imbricata*[8] の結果と類似した。

本酵素の分子量 (約 34,000) は，ヒトデ類 *D. imbricata* (分子量 : 34,000)[8]，アブラツノザメ (35,000-37,000)[16]，肺魚 (34,000)[17]，white shrimp (34,200)[18]，ザリガニ (33,899)[20]，コイ (34,000)[21]，ナマズ (33,000)[22] およびオキアミ (31,000)[24] のカルボキシペプチダーゼ B 様酵素の分子量に近似していた。

文　　献

1) Camacho, Z., Brown, J.R. and Kitto, G.B. (1970). Purification and properties of trypsin-like proteases from the starfish *Dermasterias imbricata*. *J. Biol. Chem.* **245**, 3964-3972.
2) Winter, W.P. and Neurath, H. (1970). Purification and properties of a trypsin-like enzyme from the starfish *Evasterias trochelii*. *Biochemistry* **9**, 4673-4679.
3) Bundy, H.F. and Gustafson, J. (1973). Purification and comparative biochemistry of a protease from the starfish *Pisaster giganteus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **44B**, 241-251.
4) Kozlovskaya, E.P. and Elyakova, L.A. (1974). Purification and properties of trypsin-like enzymes from the starfish *Lysastrosoma anthosticta*. *Biochim. Biophys. Acta* **371**, 63-70.
5) Camacho, Z., Brown, J.R. and Kitto, G.B. (1976). Structural studies on a starfish trypsin. *Comp. Biochem. Physiol.* **54B**, 27-32.
6) Gilliam, E.B. and Kitto, G.B. (1976). Isolation of a starfish trypsin by affinity chromatography. *Ibid.* **54B**, 21-26.
7) 岸村栄毅・林　賢治 (1989). ヒトデ *Asterias amurensis* からトリプシン様酵素の精製とその性質. 日水誌 **55**, 1415-1420.
8) Ferrell, R.E., Camacho, Z. and Kitto, G.B. (1975). Purification of a carboxypeptidase B-like enzyme from the starfish *Dermasterias imbricata*. *Biochim. Biophys. Acta* **386**, 260-269.
9) 岸村栄毅・林　賢治 (1991). ヒトデ *Asterias amurensis* のカルボキシペプチダーゼ A 様酵素の精製とその性質. 日水誌 **57**, 1939-1944.
10) Folk, J.E., Piez, K.A., Carroll, W.R. and Gladner, J.A. (1960). Carboxypeptidase B. *J. Biol. Chem.* **235**, 2272-2277.
11) Folk, J.E. and Schirmer, E.W. (1963). The porcine pancreatic carboxypeptidase A system. I. Three forms of the active enzyme. *Ibid.* **238**, 3884-3894.
12) Hummel, B.C.W. (1959). A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 1393-1399.

13) 宮崎 香・萩原秀昭 (1987). ゲルディスク電気泳動法. p. 282-301. 掘尾武一・山下仁平 (編), 蛋白質・酵素の基礎実験法. 450 p. 南江堂, 東京.
14) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
15) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-273.
16) Prahl, J.W. and Neurath, H. (1966). Pancreatic enzymes of the spiny Pacific dogfish. II. Procarboxypeptidase B and carboxypeptidase B. *Biochemistry* **5**, 4137-4145.
17) Reek, G.R. and Neurath, H. (1972). Isolation and characterization of pancreatic procarboxypeptidase B and carboxypeptidase B of the African lungfish. *Ibid.* **11**, 3947-3955.
18) Gates, B.J. and Travis, J. (1973). Purification and characterization of carboxypeptidases A and B from the white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Ibid.* **12**, 1867-1874.
19) Zwilling, R., Jakob, F., Bauer, H., Neurath, H. and Enfield, D.L. (1979). Crayfish carboxypeptidase. Affinity chromatography, characterization and amino-terminal sequence. *Eur. J. Biochem.* **94**, 223-229.
20) Titani, K., Ericsson, L.H., Kumar, S., Jakob, F., Neurath, H. and Zwilling, R. (1984). Amino acid sequence of crayfish (*Astacus fluviatilis*) carboxypeptidase B. *Biochemistry* **23**, 1245-1250.
21) Cohen, T., Gertler, A. and Birk, Y. (1981). Pancreatic proteolitic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*)-I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B. *Comp. Biochem. Physiol.* **69B**, 639-646.
22) Yoshinaka, R., Sato, M., Morishita, J., Itoh, Y., Hujita, M. and Ikeda, S. (1984). Purification and some properties of two carboxypeptidases B from the catfish pancreas. *Nippon Suisan Gakkaishi* **50**, 1717-1722.
23) Yoshinaka, R., Sato, M., Morishita, J. and Ikeda, S. (1984). Enzymic characterization of two carboxypeptidases B from the catfish pancreas. *Ibid.* **50**, 1723-1727.
24) Osnes, K.K. and Mohr, V. (1986). On the purification and characterization of exopeptidases from antarctic krill, *Euphausia superba*. *Comp. Biochem. Physiol.* **83B**, 445-458.