HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	エゾバフンウニ Strongylocentrotus intermedius 消化管からタンパク質分解酵素（スブチラーゼ）の精製
Author(s)	浦, 和寛; 田中, 恵梨; 東藤, 孝 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 58(3), 21-28
Issue Date	2009-02-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/36084
Type	departmental bulletin paper
File Information	58-3_p21-28.pdf



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北 大 水 産 彙 報
58(3), 21–28, 2009.

エゾバフンウニ *Strongylocentrotus intermedius* 消化管から タンパク質分解酵素 (スブチラーゼ) の精製

浦　　和寛[1)]・田中　恵梨[1)]・東藤　　孝[1)]・後藤　孝弘[1)]
清水　幹博[1)]・尾島　孝男[2)]・都木　靖彰[1)]

(2008 年 9 月 16 日受付，2008 年 12 月 3 日受理)

Purification of Subtilase from Short-Spined Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius*

Kazuhiro URA[1)], Eri TANAKA[1)], Takasi TODO[1)], Takahiro GOTOH[1)],
Motohiro SHIMIZU[1)], Takao OJIMA[2)] and Yasuaki TAKAGI[1)]

Abstract

We purified a subtilase from digestive system of short spined sea urchin *Strongylocentortus intermedius* by a combination of ion-exchange chromatography and gel filtration. The molecular weight of purified subtilase on SDS-PAGE under both reducing and nonreducing conditions was 35,000. Antiserum against subtilase specifically immunostained its antigen. By Western blot analysis, immunoreactive with this antibody were observed in stomach and intestine.

Key words: *Strongylocentortus intermedius*, Protease, Digest organ

緒　　言

エゾバフンウニ *Strongylocentrotus intermedius* は宮城県および山形県から北海道沿岸に生息し，古くから食用にされてきた水産重要種である。北海道はエゾバフンウニの主要な生産地であり，従来天然ウニを漁獲すると共に，生殖巣の発達の悪いウニを良漁場へ移殖するなどの対処が行なわれてきた。しかし，漁獲量の増加には至っていない。その要因の一つとして磯焼け漁場の存在が示唆されている。

磯焼け漁場ではサンゴモ科の紅藻が優先し，ウニの餌となるコンブなどの大型海藻は生育できない (町口ら，1994；吾妻ら，1997)。そのため，放流した種苗が餌不足に陥り，種苗放流事業の十分な効果が得られない可能性がある。磯焼け漁場のウニは餌不足のため生殖巣の発達が低く，ほとんど利用されていない。そこで，これらのウニを養殖することで生殖巣の増大を図り，商品として有効利用する試みが行われ，生殖巣の品質向上に適した餌の開発が必要とされている (吾妻ら，1997)。また，放流後の種苗の生残率を上げるために種苗生産後も稚ウニを飼育し，20 mm 程に成長させてから放流する中間育成事業が行なわれている。しかし，中間育成を行うためには陸上水槽などの設備が必要であり，ウニの餌となる海藻が減少する冬期間には海藻の代替餌料を確保する必要がある (伊藤，1996)。従って，養殖事業や中間育成事業を効率良く行うためには，量や品質を管理しやすい人工餌料の開発が重要である。

ウニがどのような餌を消化吸収しているのか知るためには，消化器官の構造だけでなく消化酵素に関する知見も重要である。これまで，ウニの一種 *Sterechinus neumayeri* の消化管において，α-グルコシターゼ活性，β-グルコシターゼ活性およびキモトリプシン活性が認められており (Klinger, 1982)，キタムラサキウニの消化管からは α-アミラーゼが精製されている (Nakatani and Kobayashi, 1996)。また，キタムラサキウニの消化管からプロテアーゼが精製され，それが分子量約 32,000 のセリンプロテアーゼの一種，スブチラーゼであることが明らかにされた (尾島ら，私信)。

本研究では，北海道において重要な水産資源であるエゾバフンウニを用いて，餌の消化吸収機構の解明を目的とし，タンパク質分解酵素であるスブチラーゼを精製し生化学的特性を解析した。

[1)] 北海道大学大学院水産科学研究院増殖生物学分野
(*Laboratory of Aquaculture Biology, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University*)
[2)] 北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物工学分野
(*Laboratory of Marine Biotechnology of Microbiology, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University*)

材 料 と 方 法

実験材料

スブチラーゼの精製に用いるため，エゾバフンウニ *Strongylocentrotus intermedius* の食道，胃および腸を主体とする消化管を函館市内の水産加工場において採取した。

アセトンパウダーの調整

水産加工場で採取した消化管 1.8 kg に等量の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を加え，0℃ で 30 分間攪拌後，10,000×g で 10 分間遠心分離して上清を回収した。この上清に等量の冷アセトンを加え，脱脂および脱水を行なった。その後 10,000×g で 15 分間遠心分離し得られた沈殿を再度冷アセトンに懸濁し，再び遠心分離した。この沈殿物を風乾しアセトンパウダーとした。アセトンパウダーは使用時まで −20℃ で保存した。

タンパク質の定量

タンパク質濃度は，Biuret 法 (Gornall et al., 1949) もしくは Lowry 法 (Lowry et al., 1951) により測定した。検量線は牛血清アルブミン (Wako) を用いて作製した。

SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli (1970) の方法に従い 10% の均一スラブゲルを使用した。泳動試料は電気泳動中のプロテアーゼの自己消化を防ぐため，等量の 10% トリクロロ酢酸により失活させた。その後，遠心分離して得られた沈殿を無水エタノールで 2 回洗浄し，乾燥させた。この乾燥試料を還元サンプルバッファー (125 mM Tris-HCl，4% SDS，14% グリセロール，10% 2-メルカプトエタノール，10% ブロモフェノールブルー) もしくは非還元サンプルバッファー (100 mM Tris-HCl，4% SDS，20% グリセロール，10% ブロモフェノールブルー) に溶解し，電気泳動に供した。ゲルは染色液 (40% エタノール，10% 酢酸，0.1% Coomassie brilliant blue R-250) で染色後，脱色液 (20% エタノール，5% 酢酸，2.5% グリセリン) で処理した。

ウエスタンブロッティング

ウエスタンブロッティングは Towbin et al. (1979) の方法に従った。SDS-PAGE により分離したタンパク質バンドを平板転写装置 (ATTO) を用いて Polyvinyldene difluoride membranes (PVDF 膜 ; Millipore) に転写した。続いて PVDF 膜を 5% スキムミルク溶液で 90 分間ブロッキングした。その後，一次抗体として抗キタムラサキウニスブチラーゼ抗血清または抗エゾバフンウニスブチラーゼ抗血清をブロッキング溶液に対し 1 : 1,000 の希釈率で添加した溶液で一晩反応させた。反応後，メンブレンを蒸留水，TTBS (20 mM Tris，500 mM NaCl，0.05% Tween 20，pH 7.5) および TBS (20 mM Tris，500 mM NaCl，pH 7.5) を用いて洗浄した。その後，二次抗体 (goat anti-rabbit IgG (H＋L) horseradish peroxidase conjugate ; Bio-Rad) をブロッキング溶液に対し，1 : 4,000 の割合で希釈した溶液で 90 分間反応させた。続いて，蒸留水，TTBS および TBS で洗浄後，PVDF 膜を発色試薬 (30 mg 4-クロロ-1-ナフトール，10 ml メタノール，40 ml TBS，30 μl 30% H_2O_2) に浸漬し発色させた。

アルカリ変性カゼインの調製

プロテアーゼ活性測定に用いる基質として，アルカリ変性カゼインを以下のように調製した。すなわち，乳製カゼイン (関東化学) 1.0 g に蒸留水を 40 ml 加えてよく攪拌した後，1 M NaOH を 1 ml 加え室温で 10 分撹拌することにより変性させた。その後，15,000×g で 10 分間遠心分離し，得られた上清 (変性カゼイン) に 500 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を 5 ml 加えて中和した。これを 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に 4℃ で 24 時間透析した後，15,000×g で 10 分間遠心分離して得た上清をアルカリ変性カゼインとした。

プロテアーゼ活性の測定

プロテアーゼ活性測定は，5 mg/ml のアルカリ変性カゼイン，0.1 M NaCl および 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0) からなる反応液 0.9 ml に，プロテアーゼを含む溶液を 0.1 ml 加えることで反応を開始した。反応は 30℃ で 30 分間行い，その後 10% トリクロロ酢酸を 1 ml 加えることで停止させた。この反応液を 20,000 g で 15 分間遠心分離し，上清に含まれるプロテアーゼ分解断片量を 280 nm において吸光度を測定する事によって定量した。なおプロテアーゼ活性単位 (1 U) は，280 nm の吸光度を 1 分間に 0.01 上昇させる酵素量とした。

カラムクロマトグラフィー

アセトンパウダー2.5 g を 100 ml の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液に溶解し，10,000×g で 15 分間遠心分離して得られた上清を粗酵素液とした。粗酵素液を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液に 24 時間透析し，同溶液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE-TOYOPEARL 650 M カラム (2.0×26 cm) に供した。非吸着画分を同溶液で洗浄した後，吸着したタンパク質を 0-300 mM NaCl の直線濃度勾配により溶出した。なお，各画分のプロテアーゼ活性を測定し，活性の高かった画分を Apollo Centrifugal Concentrator 20 ml (Orbital Bioscience) を用いて遠心濃縮し，10 mM リン酸ナトリウム緩衝液で平衡化した Sephacryl S-100 カラム (2.5×57 cm) に供した。このクロマトグラフィーで得られた高活性画分を先述と同様に遠心濃縮し，10 mM リン酸ナトリウム緩衝液で平衡化したゲルろ過カラム (Superdex 75 10/300 GL ; Tricorn) を用いた FPLC (AKTAexplorer 10S) に供した。このクロマトグラフィーで得られた高活性画分を濃縮し，その後さらに同カラムに供することで精製画分を得た。

pH 依存性および熱依存性の測定

pH 依存性の測定は，pH 5.0–12.0 に調整した基質を用いて 30℃ で反応させた。なお，反応混液中の pH は反応停止前に実測した。熱依存性は、あらかじめ 10℃–80℃ に調整した基質を用いて各温度で 30 分間反応させることで測定した。それぞれの測定値において最大活性値を 100% とし，各 pH および温度での相対値を算出した。

阻害剤の影響

プロテアーゼ活性の阻害剤として，1 mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride)，10 μg/ml TPCK (tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone)，50 μg/ml SBTI (soybean trypsin inhibitor)，10 μg/ml E–64 および 5 μg/ml PepstatinA をそれぞれ精製プロテアーゼに加え，20℃ で 1 時間インキュベートした。その後，30℃ で残存活性を測定した。さらに Ca^{2+} の影響を知るため，0.5 mM もしくは 1 mM EDTA を加え同様に処理した。それぞれの測定値は，阻害剤を含まない時の活性値を 100% として表した。

抗体の作成

精製したプロテアーゼ溶液 1.8 ml (タンパク質量 0.6 mg) に等量の Freund's complete adjuvant (Wako) を加えて良く乳化させたものを抗原とし，ウサギの背部皮下に 0.75 ml ずつ 2 箇所に接種した。1 週間後に追加免疫を同様に行い，これを 4 週間繰り返した。4 週間後に外耳静脈から採血した。血液を室温で 1 時間，4℃ で一晩静置して凝固させた後，1,000×g で 20 分間遠心分離し上清を得，抗血清標品とした。

ウエスタンブロッティング解析による器官局在

北方生物圏フィールド科学センター臼尻臨海実験所にて海藻を餌として飼育されていたウニ (殻径約 3 cm，湿重量約 70 g) を用い，解体後に消化管および生殖巣を採取した。摘出した各組織 0.1 g を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で洗浄した後，同緩衝液 500 μl と共にホモジナイズした。その後，10,000×g で 10 分間遠心分離を行い，得られた上清を器官抽出液としウエスタンブロティング解析を行った。

結　　果

消化管スブチラーゼの精製

エゾバフンウニの消化管約 1.8 kg からアセトンパウダー21 g を得，このうち 2.5 g を用いて調製し，79 ml の粗酵素液を得た。この粗酵素液の比活性は 0.98 U/ml であり，タンパク質量は 1,244.25 mg、全活性は 1,221.87 U であった。粗酵素液を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した後に DEAE–TOYOPEARL 650M カラムで分離した。その結果，プロテアーゼ活性のあるピーク画分 I (Fraction No. 124–126)，画分 II (Fraction No. 131–133)，画分 III (Fraction No. 136–137)，画分 IV (Fraction No. 141–142) を得た (Fig. 1)。また，抗キタムラサキウニスブチラーゼ抗血清を用いたウエスタンブロッティング解析において全てのピーク画分にスブチラーゼ陽性反応を示すタンパク質バンド (分子量 30,000–35,000 および約 40,000) が認められ，強い陽性反応は画分 I の分子量約 35,000 および約 40,000 のタンパク質バンドに認められた (Fig. 2)。従って，画分 I を遠心濃縮後，Sephacryl S–100 に供した。

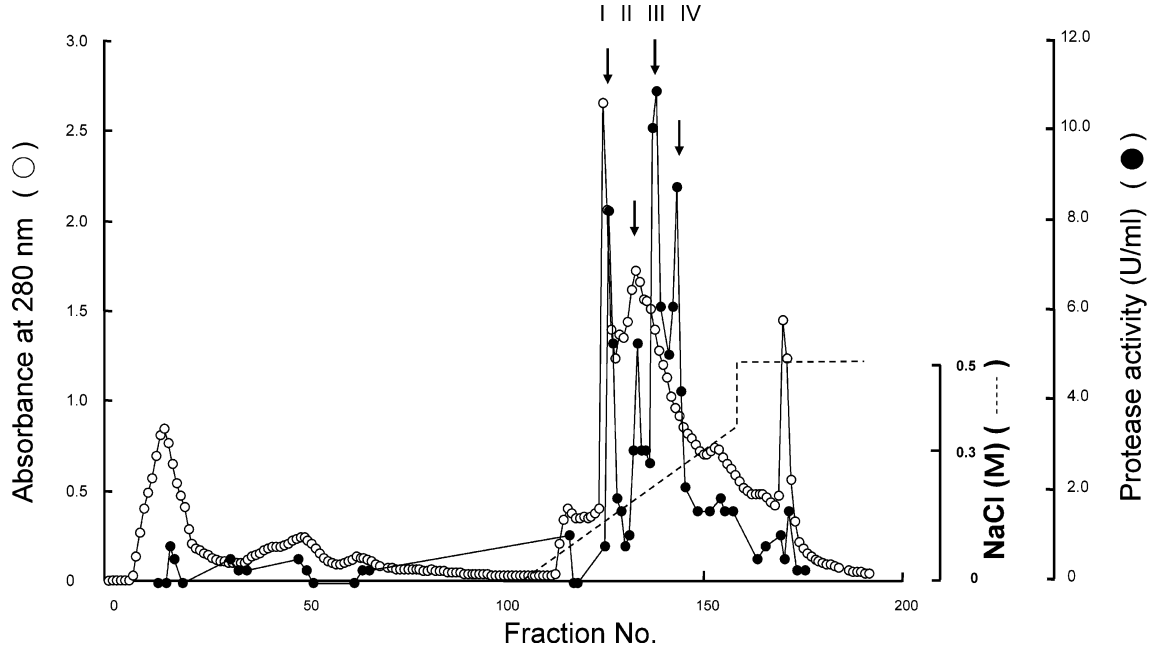


Fig. 1. Purification of the sea urchin protease by the DEAE–Toyopearl 650M column chromatography.

Sephacryl S-100 による分離解析の結果，得られたプロテアーゼ画分 (Fraction No. 35-38) を SDS-PAGE に供したところ，分子量約 35,000 および 40,000 のタンパク質バンドが主要なバンドとして認められた (Fig. 3)。そこで，この画分を遠心濃縮後に Superdx70 10/300 GL を用いた FPLC に供した結果，左右対称な Fraction No. B4 溶出曲線が得られた (Fig. 4)。そこで，Fraction No. B4 を 2-メルカプトエタノールを除いた非還元状態において SDS-PAGE に供した。その結果，非還元下においても単一なタンパク質バントが認められたため，これを精製スブチラーゼ画分とした (Fig. 5)。精製したスブチラーゼは，総タンパク質量 0.06 mg，比活性 1,304.35 U/mg であり，全活性は 84 U，粗酵素液からの精製度は 1,328 倍であった。

精製スブチラーゼの生化学的特性

本スブチラーゼは pH 9 において最大活性を示し，pH 8-12 のアルカリ性域において，最大活性の 75% 以上を示した (Fig. 6A)。なお，ウニ消化管の pH に近い pH 6-7 における

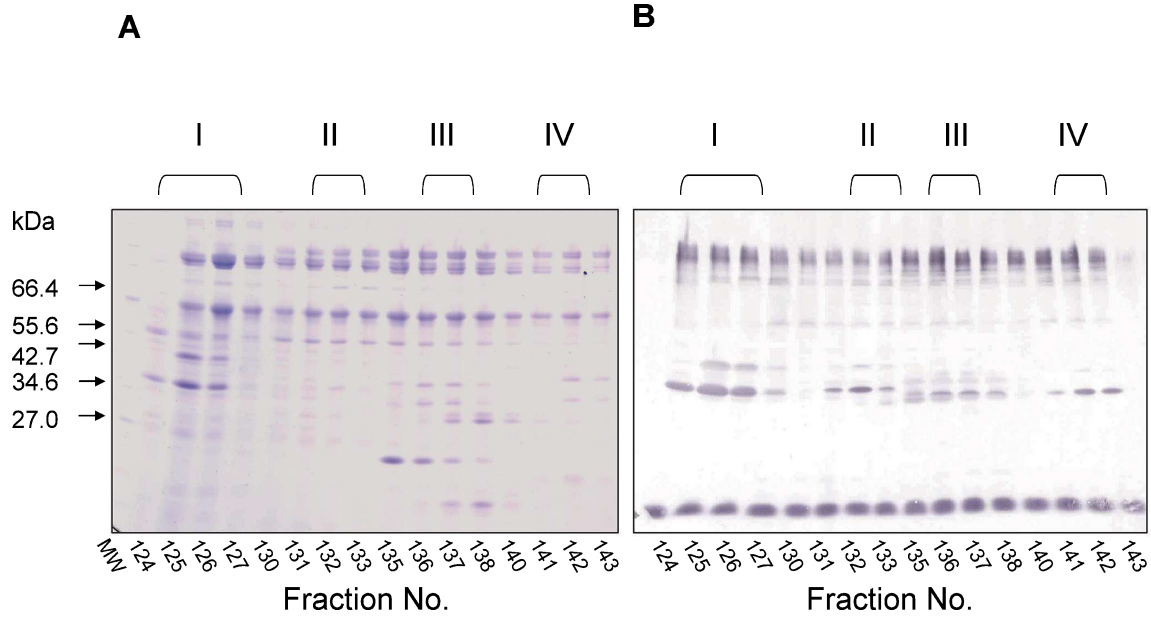


Fig. 2. 10% SDS-PAGE (A) and Western boltting patern using anti-Strongylocentrotus nudus subtilase antibody (B).

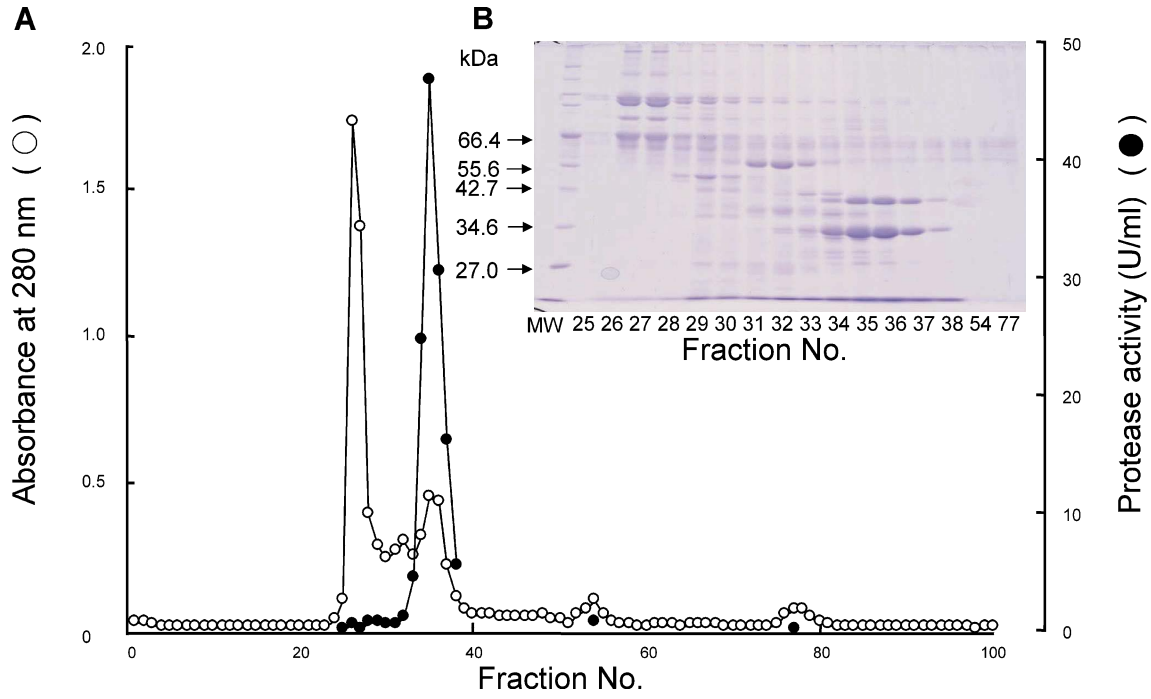


Fig. 3. Purification of the sea urchin protease by the Sephacryl S-100 column chromatography (A), and 10% SDS-PAGE (B)

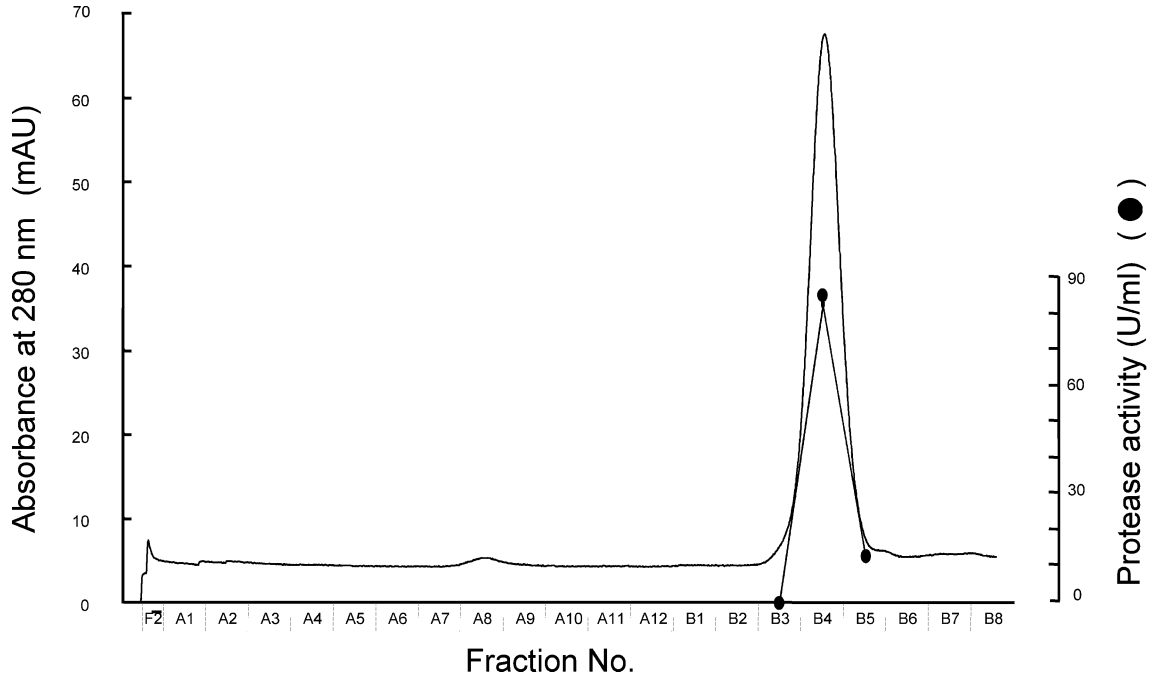


Fig. 4. Purification of the sea urchin protease by the Superdx70 10/300 GL column chromatography.

活性は 45–55% 程度であった。至適温度は 50℃ であり，35–55℃ の温度範囲で最大活性の 70% 以上を示した (Fig. 6B)。なお，ウニの生息水温に近い 10℃ における活性は 40% 程度であった。

本スブチラーゼの活性は，セリンプロテアーゼの阻害剤である PMSF 添加によって，添加しない場合の 6% 程度にまで強く阻害された。一方，システインプロテアーゼの阻害剤である E–64，アスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤である PepstatinA による影響はほとんど認められず，それぞれ 90% および 103% の活性を示した。なお，キモトリプシンの阻害剤である TPCK，トリプシンの阻害剤である SBTI による影響も少なく，それぞれ 87% および 100% の活性を維持した。また，金属イオンのキレート剤である EDTA の添加によって，本スブチラーゼの活性は低下した (Table 1)。

ウエスタンブロッティング解析によるスブチラーゼの器官分布

各器官の抽出液および精製スブチラーゼ分画を用いて，エゾバフンウニスブチラーゼに対する特異抗体を用いたウエスタンブロッティング解析を行った結果，精製スブチラーゼと同一の分子量を示す陽性タンパク質バンドは、胃と腸の抽出液に認められた。また，胃においては，分子量約 40,000 のタンパク質バンドにも陽性反応が認められた (Fig. 7)。

考　　察

ウニ類の消化酵素に関する研究の多くは炭水化物分解酵素についてであり，タンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) に関する研究は少ない (Lawrence, 1982 ; Lawrence and Klinger, 2001)。プロテアーゼとはタンパク質やペプチドのペプチド結合を加水分解する酵素であり，至適 pH の違いから，酸性プロテアーゼ，中性プロテアーゼおよびアルカリプロテアーゼに分類される。また，触媒機能の発現部位である活性中心の性質から，プロテアーゼは 4 種類に分類される。すなわち，セリン残基を活性中心にもつセリンプロテアーゼ，活性中心に SH 基をもつシステインプロテアーゼ，酵素分子に結合した 2 価のカチオンの存在によって活性が支配される金属プロテアーゼ，そして活性中心にアスパラギン酸残基が関与するアスパラギン酸プロテアーゼである。中でもセリンプロテアーゼには脊椎動物の代表的な消化酵素であるトリプシンやキモトリプシンファミリーが属している。また，セリンプロテアーゼは触媒残基の特徴から 5 から 6 つの属に分類されており，キモトリプシンおよびスブチラーゼはスーパーファミリーを形成するセリンプロテアーゼの代表である (Siezen and Leunissen, 1997)。

棘皮動物におけるプロテアーゼに関する研究はヒトデ類が最も先行している (Lawewnce, 1982)。Farrand and Williams (1988) は，ヒトデの一種 *Pisaster ochraceus* 消化管のプロテアーゼ活性を網羅的に測定し，キモトリプシン，トリプシンを有することを報告している。Camacho et al. (1970) および Bundy and Gustafson (1973) は，ヒトデの一種 *Dermasterias imbricata* 消化管からトリプシンを精製し，Holzman et al. (1985) は，*Pisaster ochraceus* 消化管の幽門盲嚢における主要なプロテアーゼがトリプシンであることを示した。これらのことから，ヒトデ類のプロテ

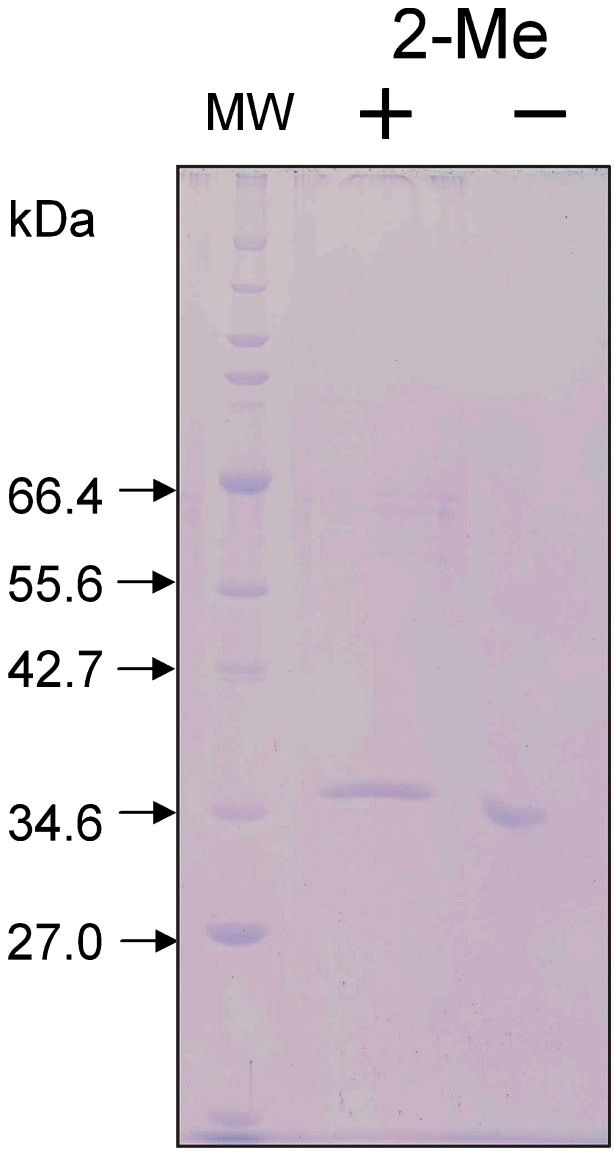


Fig. 5. SDS-PAGE on 10% slab gel of purified sbutilase. 2-Me+ : samples reduced with 2-mercaptoethanol ; 2-Me− : non-reduced samples.

アーゼはトリプシンファミリーによって構成されている事が推測される。一方，キモトリプシン活性がウニの一種 *Sterechinus neumayeri* やホクヨウオオバフンウニ *Strongylocentrotus droebachiens* において認められている。しかし，タイセイヨウナガウニ *Echinometra lucunter* においてこの酵素活性は認められていない (Klinger, 1984 ; Obrietan et al., 1991 ; Klinger et al., 1997)。このように，ウニ類のプロテアーゼの種類は種によって異なっていることが示唆されるが，これらの研究ではプロテアーゼ活性の測定に消化管粗抽出液もしくは粗精製酵素を用いていることから，サンプル中に含まれる脂質や塩などの夾雑物が活性測定に影響している可能性も否定できない。そのため，ウニ消化管のプロテアーゼに関する知見を得るためには精製したプロテアーゼを実験に用いる必要がある。

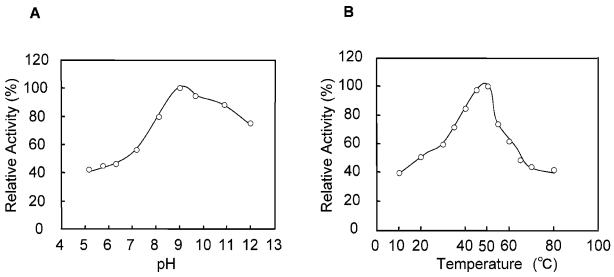


Fig. 6. pH dependence of the sea urchin sbutilase (A) and temperature dependence of the sea urchin sbutilase (B).

Table 1. Effect of various inhibitors on the sea urchin protease activity

inhibito	Concentration	Relative Activity (%)
None	−	100.0
PMSF	1 mM	6.6
TPCK	10 μg/ml	87.3
SBTI	50 μg/ml	100.0
E-64	10 μM	90.9
PepstatinA	5 μg/ml	103.1
EDTA	0.5 mM	83.6
EDTA	1 mM	69.1

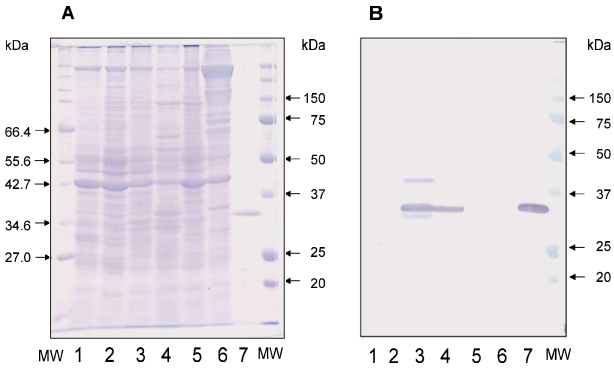


Fig. 7. Tissue-specific expression of the sea urchin sbutilase. 10% SDS-PAGE (A) and corresponding Western blot (B). 1 : pharynx ; 2 : esophagus ; 3 : stomach ; 4 : intestine ; 5 : rectum ; 6 : gonad ; 7 : purified sbutilase.

エゾバフンウニ消化管から抽出，精製されたプロテアーゼ画分である本酵素はセリンプロテアーゼの特異的阻害剤である PMSF で強く阻害される一方，システインプロテアーゼ，アスパラギン酸プロテアーゼ，キモトリプシンおよびトリプシンの阻害剤であるそれぞれ E-64，PepstatinA，TPCK および SBTI による阻害はほとんど認められなかった。

スブチラーゼの多くはプレプロ酵素として細胞内で合成され，シグナルペプチドを介して細胞外にスブチラーゼの前駆体として分泌された後，N 末端のペプチドが切除されることで活性化され成熟体となる (Shinde and Inouye,

1993；Gupta et al., 2002)。本実験においてウエスタンブロッティング解析において強い陽性反応を示した分子量約40,000のタンパク質バンドの部分アミノ酸配列は，アメリカムラサキウニのスブチリシンプレプロ酵素のアミノ酸配列と高い同一性を示した。従って，分子量約40,000のタンパク質バンドはスブチラーゼの前駆体と考えられた。

スブチラーゼは触媒残基がAsp/His/Serの順に並ぶセリンプロテアーゼであり (Rawlings and Barrett, 1994；Barrett and Rawlings, 1995)，スブチラーゼの多くはpH 10付近においてプロテアーゼ活性をもつ分子量約15,000–30,000のタンパク質である (Gupta et al., 2002)。また，スブチラーゼにはCa^{2+}結合部位が存在し，Ca^{2+}は自己消化の防止や構造の安定化および活性に欠かせない (Siezen and Leunissen, 1997)。本スブチラーゼは，分子量は約35,000，至適pHは9であり，EDTAを用いたCa^{2+}の除去によってプロテアーゼ活性の低下がみられたことから，既知スブチラーゼの生化学的特徴と類似していた。

棘皮動物における消化酵素のこれまでの研究において，消化酵素と消化生理学を結び付ける研究は非常に少なく，消化酵素の生化学的特性のみが着目されてきた。そのため酵素の活性はおよそ25–35℃で測定されており (Klinger, 1984；Holzman et al., 1985；Farrand and Williams, 1988；Obrietan et al., 1991；Nakatani and Kobayashi, 1996)，棘皮動物の生息温度を考慮した消化酵素の活性測定は極めて少ない。Klinger et al. (1997) は，南極もしくは亜熱帯に生息するウニおよびヒトデを用いてキモトリプシンなどの消化酵素活性を0℃および25℃で測定した。また，Klinger et al. (1986) は同種のウニを16℃もしくは23℃で飼育し，15℃および25℃において炭水化物分解酵素の活性を測定した。いずれの実験においても，生息域もしくは生息温度の異なる二群の酵素活性の強さに差が認められなかったことから，棘皮動物の消化酵素は生息温度に対応していないことを示唆している。一方，酵素学の見地からスブチラーゼは低温適応性を持つことが示唆されており (Kristjansson et al., 1999；Arnorsdottir, 2002)，好冷性の*Vibrio*のスブチラーゼは低温における活性が高い一方，熱安定性は低いことが報告されている (Arnorsdottir, 2002)。また，一般的なスブチラーゼの至適温度は60℃であるのに対し，好冷性の細菌から精製されたスブチラーゼの至適温度は40℃とされている。本実験におけるスブチラーゼの至適温度は50℃であり，50℃以上において活性が急激に低下する一方，10℃においても最大活性の約40%を維持したことから，エゾバフンウニのスブチラーゼは低温に適応していることが示唆される。また，飼育温度は酵素活性に影響を与えないという実験結果は (Klinger et al., 1986)，主要なプロテアーゼの種類が15℃および30℃において変化しなかったという本実験の結果を支持すると思われる。すなわち消化管内には複数のプロテアーゼが存在するものの，それらの至適温度に大きな差はないため，環境温度や活性測定温度が変化しても主要となる酵素の種類は変わらないと考えられる。

精製したスブチラーゼはウニの消化管内のpHに近いpH 6–7において (Stott, 1955；Lawewnce, 1982) 最大活性の45–55%を維持し，ウニの生息温度に近い10℃における活性は最大活性のおよそ40%を維持したことから，精製したスブチラーゼはウニ消化管内においても充分活性を保っていることが確認された。従って，本実験において精製したスブチラーゼはエゾバフンウニ生体内においてもタンパク質分解を担うプロテアーゼとして機能していることが示唆された。

謝　　辞

本研究を行うにあたり，御助言を賜るとともにエゾバフンウニを提供していただいた，北海道大学北方生物圏フィールド科学センター臼尻実験所，宗原弘幸准教授をはじめ，野村潔技官に厚く御礼申し上げます。本研究は文部科学省研究費補助金および21世紀COEプロジェクトにより行った。

引 用 文 献

吾妻行雄・松山恵二・中多章文・川井唯史・西川信良 (1997) 北海道日本海沿岸におけるウニ除去後の海藻群落の遷移．日本水産学会誌，**63**, 672–680.

Arnorsdottir, J., Smaradottir, R.B., Magnusson, O.T., Thorbjarnardottir, S.H., Eggertsson, G. and Kristjansson, M.M. (2002) Characterization of a cloned subtilisin-like serine proteinase from a psychrotrophic *Vibrio* species. *Eur. J. Biochem.,* **269**, 5536–5546.

Barrett, A.J. and Rawlings, N.D. (1995) Perspective in biochemistry and biophysics families and clans of serine peptidases. *Arch. Biochem. Biophys.,* **318**, 247–250.

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.

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.

Farrand, A.L. and Williams, D.C. (1988) Isolation, purification and partial characterization of four digestive proteases from the purple seastar *Pisaster ochraceus*. *Mar. Biol.,* **97**, 231–236.

Gornall, A.G., Bradawill, C.J. and David, M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.,* **177**, 751–766.

Gupta, R., Beg, O.K. and Lorenz, P. (2002) Bacterial alkaline proteases : molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **59**, 15–32.

Holzman, T.F., Russo, S.F. and Williams, D.C. (1985) Effects of feeding and starvation on proteolytic and tryptic activities in pyloric caecal tissues and duct fluids of the seastar *Pisaster ochraceus*. *Mar. Biol.,* **90**, 55–59.

伊藤雅一 (1996) ウニ栽培漁業函館ブロック協議会の活動について．マリンネット北海道 試験研究は今，No. 264.

Klinger, T.S. (1982) Digestive enzymes from the gut tissues of five species of sea urchins (Echinodermata : Echinoidea). *Am. Zool.,* **22**, 904–904.

Klinger, T.S. (1984) Activities and kinetics of digestive α- and β- glucosidase and β- galactosidase of five species of echinoids (Echinodermata). *Comp. Biochem. Physiol.,* **78A**, 597–600.

Klinger, T.S., Hsierh, H.L., Pangallo, R.A., Chen, C.P. and Lawrence, J.M. (1986) The effect of temperature on feeding, digestion, and absorption of *Lyechinus variegates* (Lamarck) (Echinodermata : Echinoidea). *Physiol. Zool.,* **59**, 332–336.

Klinger, T.S., McClintock, J.B. and Watts, S.A. (1997) Activities of digestive enzymes of polar and subtropical echinoderms. *Polar Boil.,* **18**, 154–157.

Kristjansson, M.M., Magnusson, O.T., Gudmundsson, H.M., Alfredsson, G.A. and Matsuzawa, H. (1999) Properties of a subtilisin-like proteinase from a psychrotrophic Vibrio species. Comparison with proteinase K and aqualysin I. *Eur. J. Biochem.,* **260**, 752–760.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature,* **227**, 680–685.

Lawrence, J.M., Digestion. (1982) In "*Echinoderm Nutrition*" (Jangoux, M. and Lawrence, J.M., eds), 283–316, *Balkma, Rotterdam.*

Lawrence, J.M. and Klinger, T.S. (2001) Digestion in sea urchins. In : Lawrence, J.M (ed), Edible sea urchins : Biology and Ecology. Elsevier Science B.V., Amsterdam. 103–113.

Lowry, O.H., Rpsebrpugh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.,* **193**, 265–275.

町口裕二・水鳥澄雄・三本管善昭 (1994) キタムラサキウニ *Strongylocentrotus nudus* の飼育下における摂餌選択性. 北水研研報, **58**, 35–43.

Nakatani, N. and Kobayashi, I. (1996) Enzymatic properties of α-amylase from sea urchin, *Strongylocentrotus nudus. Comp. Biochem. Physiol.,* **113B**, 383–386.

Obrietan, K., Drinkwine, M. and Williams, D.C. (1991) Amylase, cellulase and protease activities in surface and gut tissue of *Dendraster excentricus, Pisaster ochraceus and Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinodermata). *Mar. Boil.,* **109**, 53–57.

Rawlings, N.D. and Barrett, A.J. (1994) Families of serine peptidases. *Methods in Enzymol.,* **244**, 19–61.

Shinde, U. and Inouye, M. (1993) Intramolecular chaperon and protein folding. *Trends Biochem. Sci.,* **18**, 443–446.

Siezen, R.J. and Leunissen, J.A.M. (1997) Subtilases : The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.,* **6**, 501–523.

Stott, F.C. (1995) The food canal of the sea-urchin *Echinus esculentus* and its functions. *Proc. Zool. Soc. Lond.,* **125**, 63–86.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polycrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc. Natl. Sci. USA.,* **76**, 4350–4354.