

## 高線溶活性セリンプロテアーゼ Subtilisin CIR とその変異型酵素の ポリエチレングリコールによる化学修飾

佐藤 幸子・福水 隆\*・高倉 孝一\*\*

岡山理科大学工学部応用化学科

\*岡山理科大学大学院工学研究科応用化学専攻

\*\*岡山理科大学技術科学研究所

(2001年11月1日 受理)

発酵食品から単離した *Bacillus subtilis* CIR110株の分泌する高線溶活性セリンプロテアーゼ Subtilisin CIRを用いたバイオハイブリッド型抗血栓性材料の開発を目的として、本酵素及び部位特異的変異導入法によりリジン残基を増加した変異型酵素のポリエチレングリコール (PEG) による化学修飾を行った。化学修飾には活性化PEG<sub>2</sub>を用い、酵素1分子に1あるいは2分子のPEG<sub>2</sub>が結合した修飾酵素を疎水性カラムクロマトグラフィーにより分離した。修飾サイトの増加を目的にリジン残基を増加した変異型酵素においても、PEG<sub>2</sub>の結合数は最大2分子であった。Subtilisin CIRはPEG修飾後も優れた線溶活性を示し、フィブリン、フィブリノーゲン、フィブロネクチンなどを有効に分解した。PEG修飾酵素においては、保存安定性が向上し、 $\alpha_2$ -マクログロブリンなどの血漿プロテアーゼインヒビターによる活性阻害が抑制された。さらに、PEG修飾Subtilisin CIRと抗Subtilisin CIR抗体との反応性の低下が確認され、化学修飾による抗原性の低減及び血中安定性の向上が示唆された。これらの結果より、PEG修飾Subtilisin CIRは、従来の線溶酵素に比べ安価に入手できることから、有用なバイオハイブリッド型抗血栓性材料となり得る可能性が見出された。

### 1. 緒言

虚血性心疾患、脳血栓・塞栓症など血栓症を成因とする疾患の種類は多く、これらの疾患が長寿社会の到来や生活様式の欧米化に伴いますます増加しつつある<sup>1)</sup>。現在、血栓性疾患の治療には、ヘパリンおよび線溶酵素のウロキナーゼや組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) が臨床使用されている。しかしそれらは不安定で血液中での半減期が短く、また極めて高価である。技術科学研究所で単離同定された *Bacillus subtilis* CIR110株の分泌するSubtilisin CIRは、人体に無害な納豆菌のアルカリセリンプロテアーゼで、高い血栓溶解能を有し安価で大量に精製可能である。本酵素は、ウロキナーゼやt-PAとは異なり、プラスミノゲン非存在下でもフィブリンに直接作用し血栓を分解することが知られている<sup>2)</sup>。また本酵素は血漿タンパク質に対する分解特性において、血栓形成に関与するフ

ィブリノーゲン、フィブロネクチンを分解するが血漿中に最も多く存在し血栓形成には直接関与しないアルブミンは分解しないことが明らかになっており、抗血栓薬、抗血栓性材料への応用が期待される。

タンパク質のPEGによる化学修飾については多くの研究がなされており<sup>3, 4, 5)</sup>、PEG修飾されたアデノシンデアミナーゼ<sup>6)</sup>、アスパラギナーゼ<sup>7)</sup>、スーパーオキシドジムスターゼ<sup>8)</sup>等は免疫原性、血中安定性等で優れた性質を示し、酵素製剤として既に使用されている。本研究では、本酵素の血液適合性の向上を図るためにPEGによる化学修飾を検討した。更に、酵素の化学修飾や高分子担体への固定化に利用されるアミノ基数の増加を目的に、部位特異的変異導入法によりリジン残基を増加した変異型Subtilisin CIR<sup>9)</sup>についてもPEG修飾を行い、その諸性質について野生型酵素との比較を行った。

## II. 試料及び方法

### 1. 試薬

乳性カゼイン、牛血清フィブリノーゲン、及びフィブリンはnacaltesque (京都) より入手した。酵素のPEG修飾には活性化PEG<sub>2</sub>;4-bis(*O*-methoxypolyethylene glycol)-6-chloro-s-triazine (M.W. 5,000×2) (生化学工業) を用いた。質量分析 (MALDI-TOF) には3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (シナピン酸)、2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) (Aldrich Chem. Co)、ウシ血清アルブミン (BSA)、ウマ心臓ミオグロビン (Sigma Chem. Co.) を用いた。Subtilisin BPN<sup>®</sup>、牛血漿由来α<sub>2</sub>MはBoehringer Mannheim GmbH (Germany)、その他の試薬は和光純薬工業㈱ (大阪) より購入した。

### 2. 酵素の調製及び活性測定

Subtilisin CIR野生型酵素・Wild (リジン残基数8)、Wildのグリシン211をリジンに置換した変異型酵素・Mut.4 (リジン残基数9)、及びセリン18、セリン78、グリシン211をリジンに置換した変異型酵素・Mut.13 (リジン残基数11) は培養液中から、疎水クロマトグラフィー、硫酸塩析、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した<sup>9, 10)</sup>。酵素活性はKunitz法<sup>11)</sup> 及びフィブリン平板法<sup>12)</sup> により測定した。

### 3. 酵素のPEG修飾及びPEG修飾酵素の分離

PEG修飾は、平均分子量5,000の2本のPEG鎖が塩化シアヌールにより活性化されたPEG<sub>2</sub>を用い、酵素のリジン残基のアミノ基およびN末端のアミノ基との反応により行った。3mg/mlの酵素溶液 (50mM ホウ酸緩衝液、pH 9.3) 5ml に活性化PEG<sub>2</sub> 175mg をタンパク質が沈殿しないように少量ずつ加えて溶解し、4℃で26時間反応させた後、1M Tris溶液を0.5ml加えてブロッキングし反応を停止した。PEG修飾反応溶液 (総タンパク量; 約15mg) と1.5Mの硫酸アンモニウムを含む40mM Tris-HCl緩衝液 (5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0) とを等量混和し、0.75Mの硫酸アンモニウムを含む同緩衝液で平衡化したPhenyl Superose 10/10カラムに添加した。タンパク質の溶出は硫酸アンモニウムの連続濃度勾配 (0.75Mから0.0M) により行った。溶出フラクションのカゼイン分解活性、フィブリン分解活性をそれぞれ、Kunitz法、フィブリン平板法により測定し、フィブリン分解活性の高いフラクションを回収した。PEG修飾酵素の分離の確認はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により行った。分離ゲルは10% (w/v) アクリルアミドとし、各溶出フラクションの酵素を約5μg泳動した。その後0.1%クマシーブリ

アントブルー R-250溶液で染色し、10%メタノール、7.5%酢酸を含む溶液で脱色し、各フラクションに含まれるタンパク質を確認した。

### 4. PEG修飾酵素の修飾率の決定

PEG修飾酵素の分子量はMatrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/MS (MALDI-TOF/MS) で測定した<sup>13)</sup>。反応停止後のPEG修飾反応溶液を純水で10倍に希釈して、酵素濃度を0.3mg/mlとし、これにマトリクスとして10mg/mlのシナピン酸溶液 (30%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸) を等量加え測定試料とし、PerSeptive Biosystems Voyager-DE PROにより質量分析を行った。キャリブレーションはBSAを標準タンパク質として行った。活性化PEG<sub>2</sub>は10mg/mlのPEG<sub>2</sub>水溶液を調製し、これにマトリクスとして10mg/mlのDHB溶液 (10%エタノール) を等量加え測定試料とし、キャリブレーションはミオグロビンを標準タンパク質として行った。

### 5. 酵素の保存安定性

保存安定性は15日間の保存期間中のプロテアーゼ活性から評価した。未修飾酵素およびPEG修飾酵素を10mM Tris-HCl緩衝液 (5mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.5) 中、4℃あるいは37℃で15日間放置し、保存期間中 (1、2、5、10、15日目) のカゼイン分解活性およびフィブリン分解活性を測定した。保存溶液の酵素濃度は0.2mg/mlに調整した。

### 6. 酵素の血中安定性

血中安定性の評価は未修飾酵素およびPEG修飾酵素を血漿あるいはα<sub>2</sub>-マクログロブリンと反応させた後のプロテアーゼ活性から評価した。

6-1) 0.2mg/mlの酵素溶液 (血漿凝固阻止剤として0.38%クエン酸三ナトリウムを含む) と等量のヒト正常血漿とを混和し、37℃で1時間静置した後のフィブリン分解活性を測定した。

6-2) 0.2mg/mlの酵素溶液とα<sub>2</sub>-マクログロブリン溶液とをモル比 [α<sub>2</sub>-マクログロブリン] / [Subtilisin CIR] が0~4となるように混和し、37℃で1時間静置した後のフィブリン分解活性を測定した。

### 7. 酵素の抗原性

抗原性は酵素と抗Subtilisin CIR抗体との反応性を酵素標識固相免疫測定法 (ELISA) により測定し評価した<sup>14)</sup>。

### III. 結果及び考察

#### 1. PEG修飾酵素の分離・回収

PEG修飾反応溶液からのPEG修飾酵素の分離はゲル濾過及び疎水性カラムクロマトグラフィーにより可能であったが、大量の試料を処理できることから、主に疎水性カラムクロマトグラフィーにより分離した修飾酵素を実験に用いた。図1にPhenyl Superose 10/10カラムクロマトグラフィーを用いて分離した結果を示す。図2には溶出フラクションのSDS-PAGEの結果を示した。高分子量の修飾酵素から順次溶出され、フラクションNo.42をピークにフィブリン分解活性とカゼイン分解活性を保持したPEG修飾酵素が分離回収できた。フラクションNo.50以降には未反応の酵素が確認できた。この溶出パターンは、PEG修飾により酵素分子の親水性が増加したことを示唆している。

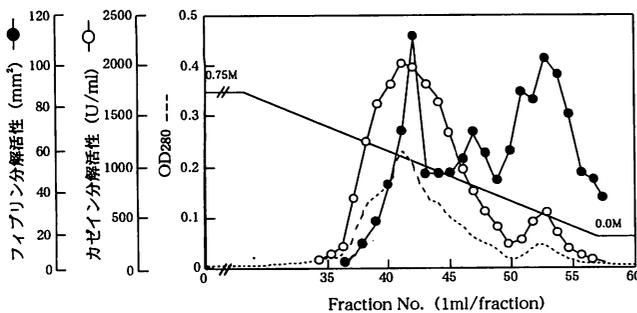


図1 Phenyl Superose 10/10によるPEG修飾酵素の分離  
PEG修飾反応溶液（総タンパク量；約15mg）と1.5Mの硫酸アンモニウムを含む40mM Tris-HCl緩衝液（5mM CaCl<sub>2</sub>, pH8.0）とを等量混和し、0.75Mの硫酸アンモニウムを含む同緩衝液で平衡化したPhenyl Superose 10/10カラム（bed volume; 8ml）に添加した。●；フィブリン分解活性（mm<sup>2</sup>）、○；カゼイン分解活性（U/ml）

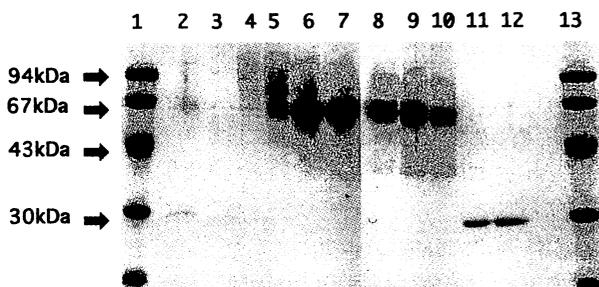


図2 Phenyl Superose 溶出フラクションのSDS-PAGE  
レーン1, 13；分子量マーカー、レーン2~12；順にフラクションNo.37, 38, 40, 41, 42, 44, 45, 46, 52, 53

#### 2. PEG修飾酵素の修飾率の決定

修飾率は、まずフルオレサミン法<sup>15)</sup>及びTNBS法<sup>16)</sup>

により酵素分子中の遊離アミノ基を定量することにより決定しようと試みたが、立体構造的に酵素分子内部に位置するアミノ基との反応性や、試料中に混在する低分子ペプチドのアミノ基との反応等の問題が完全には解決できず<sup>17)</sup>、これらの方法では正確な修飾率を決定することができなかった。よって、最終的にPEG修飾酵素の分子量を質量分析により測定し、修飾率を決定することとした。

MALDI-TOF/MSにより活性化PEG<sub>2</sub>、PEG修飾酵素の分子量を測定した結果を図3及び図4に示す。活性化PEG<sub>2</sub>の分子量は、10,000Daから13,000Daにかけて分布しており、平均分子量は約11,800Daであった。

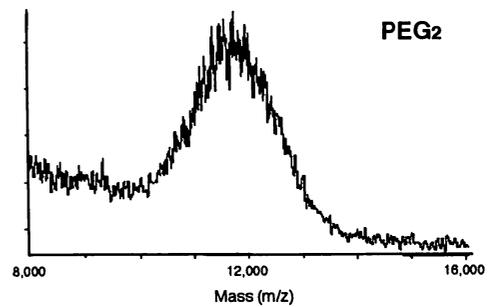


図3 TOF/MSによる活性化PEG<sub>2</sub>の分子量測定  
PEG<sub>2</sub>濃度；1mg/ml、マトリクス；10mg/ml DHB  
(10%エタノール溶液)、レーザー強度；2,500

PEG修飾反応溶液を試料として修飾酵素の分子量を測定した結果、Wild酵素の場合27,729Da、39,591Da、51,114Daにピークが現れた（図4-1）。Wild酵素の推定アミノ酸配列より求めた分子量は27,724.82、活性化PEG<sub>2</sub>の平均分子量は約11,800であり、それぞれのピークは未修飾酵素、酵素1分子にPEG<sub>2</sub>が1分子あるいは2分子結合したものであると確認された。Mut.4、Mut.13も同様の分子量スペクトルを示し、PEG<sub>2</sub>の最大結合数はWild酵素と同数で、酵素1分子に3分子以上のPEG<sub>2</sub>が結合した修飾酵素は確認されなかった。Mut.4、Mut.13は、修飾剤の結合数の増加を目的に、Wild酵素では8個のリジン残基をそれぞれ9個あるいは11個に増加した変異型Subtilisin CIRである。しかし、この変異導入はPEG<sub>2</sub>の結合数の増加には寄与していないことが明らかとなった。タンパク質を高分子修飾剤で修飾する場合、その最大修飾率は、タンパク質分子の大きさ、修飾剤分子の大きさ、修飾サイトの数及びその部位により決まると考えられる。酵素分子の表面に修飾サイトを増加させたにもかかわらずPEG<sub>2</sub>の結合数は増加しなかったという今回の結果は、最大修飾率は前

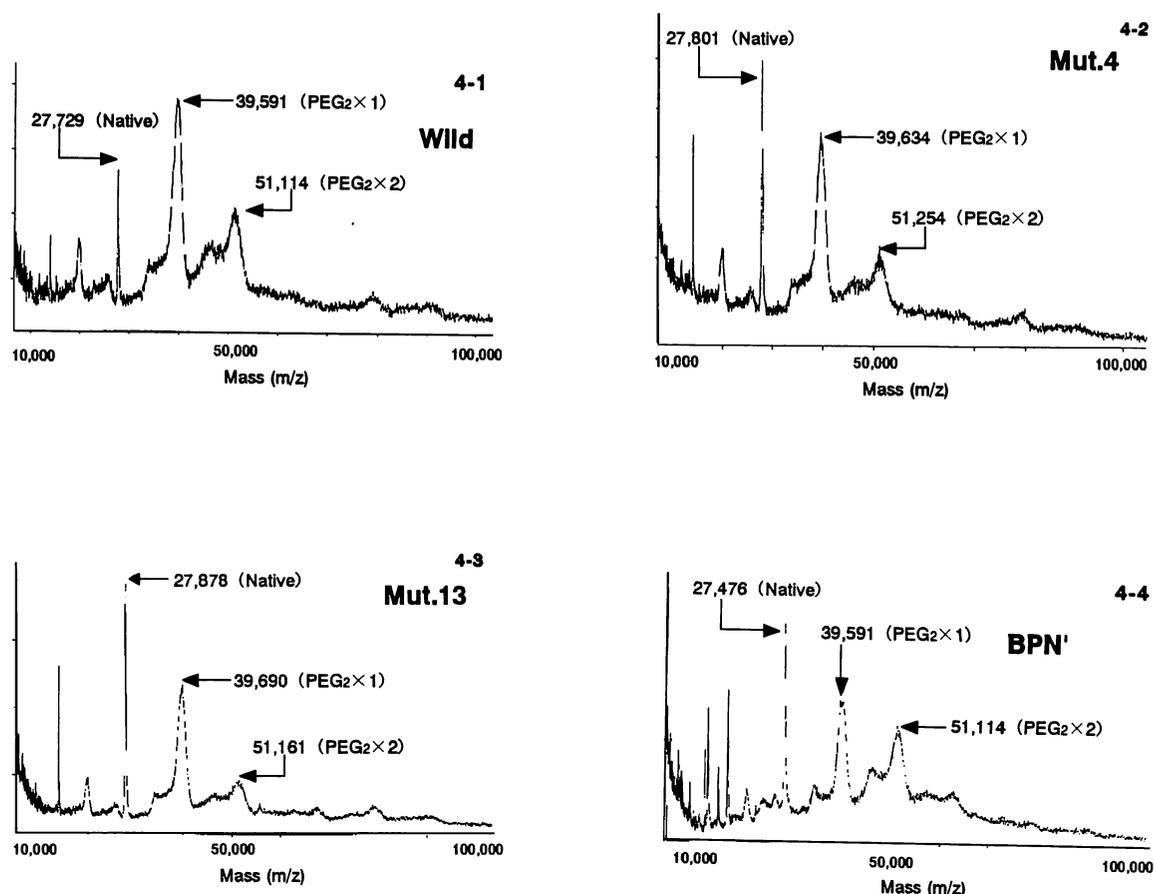


図4 TOF/MSによるPEG修飾酵素の分子量測定

タンパク濃度 ; 0.3mg/ml、マトリクス ; 10mg/mlシナピン酸 (30%アセトニトリル)、レーザー強度 ; 2,500

者2つの要因によるところが大きいことを示唆している。Subtilisin CIRのMut.4と同数の9個のリジン残基を持つSubtilisin Carlsbergを平均分子量5,000 DaのPEGで修飾した場合、質量分析で確認された酵素1分子あたりのPEGの結合数は最大5 (PEGの総量; 5,000Da×5) という報告もある<sup>10)</sup>。また、Subtilisin CIRのMut.13と同数の11個のリジン残基を持つSubtilisin BPN'を活性化PEG<sub>2</sub>で修飾した場合にもその修飾率はSubtilisin CIRの場合と同様に酵素1分子あたり2分子のPEG<sub>2</sub>が最大であった (図4-4)。これらの結果から、分子量30,000Da程度のSubtilisinに導入可能なPEG<sub>2</sub>の数は酵素1分子に対し2分子 (PEGの総量; 10,000Da×2) が最大でそれ以上はPEG鎖のかさ高さによる立体障害のために結合できないと考えられる。以上、リジン残基の増加によるPEG<sub>2</sub>の結合数の増加は得られなかったが、PEG<sub>2</sub>の結合部位はそれぞれの酵素で異なっている可能性があり、そのことによる酵素の諸性質への影響は異なってくると予想される。

また、酵素1分子に対し2分子のPEG<sub>2</sub>が結合した修飾

酵素はフィブリン分解活性をほとんど保持しておらず、線溶酵素として有用な修飾酵素はPEG<sub>2</sub>が1分子結合したものであることを確認した。

### 3. PEG修飾酵素のプロテアーゼ活性

未修飾酵素とカラムクロマトにより分離回収したPEG修飾酵素 (PEG<sub>2</sub>×1) のカゼイン分解活性とフィブリン分解活性をKunitz法で測定し比較した結果を図5に示す。本酵素はWild酵素、変異型酵素とも、PEG修飾することによりフィブリン分解活性の低下が見られたが、未修飾酵素の50~70%の活性を保持していた。またカゼイン分解活性はPEG修飾後に活性の増加がみられ、未修飾酵素に対し160~170%の活性値を示した。

フィブリンは、フィブリノーゲンがトロンビンにより特異的に限定分解されて生じる難溶性画分がさらにフィブリノーゲンと結合し二本鎖のポリマーを形成し、これが互いに架橋し合いゲル化した不溶性のタンパク質である<sup>19)</sup>。本研究でのKunitz法によるフィブリン分解活性の測定にはパウダー状のフィブリン塊を用

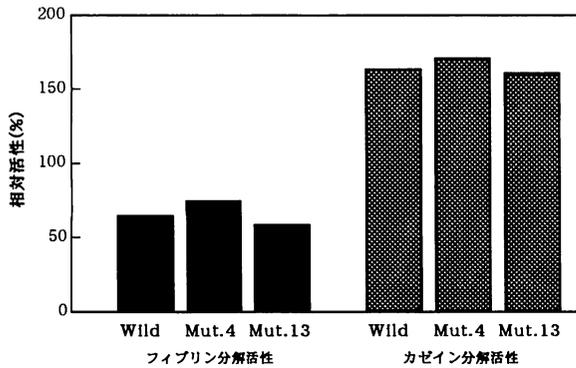


図5 PEG修飾酵素のプロテアーゼ活性

未修飾酵素、PEG修飾酵素のカゼイン分解活性およびフィブリン分解活性をKunitz法で測定し、未修飾酵素の活性値を100とした相対値を示す。

いた。これは水溶液中ではほとんど溶解すること無く懸濁状態であり、酵素の活性中心に取り込まれにくい形状の基質である。PEG鎖に覆われた修飾酵素ではさらにその取り込みが困難になることは容易に予想され、未修飾酵素の活性値の50~70%の活性保持は十分に良好な結果であると考えられる。一方、プロテアーゼの代表的な高分子基質であるカゼインの分解活性はPEG修飾することにより増加が見られた。カゼインはその成分中の $\kappa$ カゼインの親水性部分が露出したカゼインミセルとして存在し、水溶液中でよく分散している。PEG修飾酵素のカゼインに対する分解活性の増加は、このカゼインミセルとPEG鎖との相互作用が関係していると考えられる。PEG修飾により低分子量の合成基質に対しては $K_m$ 値が減少するという結果（未発表データ）及び報告があり<sup>20)</sup>、PEG修飾Subtilisin CIRと基質との相互作用については酵素学的にも興味深く今後の検討課題である。

#### 4. 酵素の保存安定性

緩衝液中で本酵素を15日間放置しその間のプロテアーゼ活性を測定した結果、保存温度4℃では未修飾酵素、PEG修飾酵素（修飾化度；PEG<sub>2</sub>×1）ともにフィブリン分解活性、カゼイン分解活性の低下は見られなかった。37℃で保存した場合、フィブリン分解活性については、Wild酵素、変異型酵素いずれも未修飾酵素が15日目に保存開始時の約60%まで活性が低下したのに対しPEG修飾酵素は100%の活性を保持していた（図6）。カゼイン分解活性は保存温度37℃では未修飾酵素、PEG修飾酵素ともに保存期間中の活性低下がみられたが、未修飾酵素が15日目に保存開始時の約40%まで活性が低下したのに対しPEG修飾酵素は70~80%の

活性が保持されていた（図7）。このように溶液状態での保存において、PEG修飾酵素は未修飾酵素に比べ活性低下が抑制されており、PEG修飾による酵素の保存安定性の向上が示された。この安定性の向上は、酵素分子自体の性質の変化より、溶液中の酵素分子間の相互作用が変化したことによると推測される。すなわち、PEG修飾酵素では、導入PEG鎖による立体効果で酵素の活性中心にタンパク質などの高分子基質は接近することが困難となり、自己消化が起りにくくなったと考えられる<sup>20)</sup>。

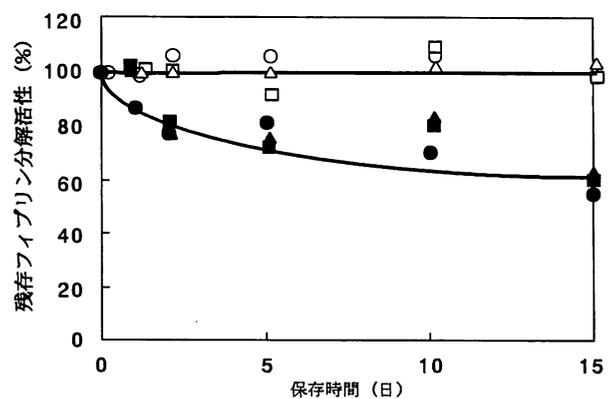


図6 水溶液中での酵素の安定性  
(フィブリン分解活性)

10mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.5) 中、酵素濃度0.2mg/ml、37℃で放置し、1、2、5、10、15日目のフィブリン分解活性を平板法で測定した。保存開始時の活性値を100とした時の相対活性を示す。●未修飾Wild ▲未修飾Mut.4 ■未修飾Mut.13 ○PEG修飾Wild △PEG修飾Mut.4 □PEG修飾Mut.13

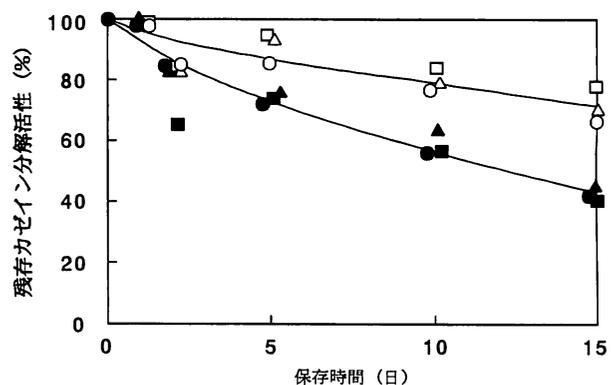


図7 水溶液中での酵素の安定性  
(カゼイン分解活性)

10mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.5) 中、酵素濃度0.2mg/ml、37℃で放置し、1、2、5、10、15日目のカゼイン分解活性をKunitz法で測定した。保存開始時の活性値を100とした時の相対活性を示す。●未修飾Wild ▲未修飾Mut.4 ■未修飾Mut.13 ○PEG修飾Wild △PEG修飾Mut.4 □PEG修飾Mut.13

5. 血中安定性

血液中に投与されたタンパク質は様々な血中成分と相互作用し、目的の生理活性を阻害される。本酵素の溶液に血漿を添加した場合にも、未修飾酵素、PEG修飾酵素ともにフィブリン分解活性の低下が見られたが、PEG修飾酵素は未修飾酵素よりも活性低下が少なかった。Wild酵素、変異型酵素いずれも未修飾酵素は、血漿の添加によりフィブリン分解活性が20%にまで低下したが、PEG修飾酵素は血漿添加後も70%の活性を保持していた(図8)。血漿の添加による活性低下の主たる原因として、血漿中に高濃度(200~400mg/dl)で存在するプロテアーゼ阻害因子 $\alpha$ 2-マクログロブリンの影響が考えられる。そこで本酵素と $\alpha$ 2-マクログロブリンとの直接相互作用について調べた結果を図9に示す。 $\alpha$ 2-マクログロブリンの存在により未修飾酵素、PEG修飾酵素とも酵素活性が低下したが、PEG修飾酵素は未修飾酵素に比べ活性低下は穏やかで、酵素と $\alpha$ 2-マクログロブリンのモル比が1以上ではPEG修飾酵素の方が高いフィブリン分解活性を示した。さらにこれ以上のモル比では活性値の変化は見られなかった。Mut.4、Mut.13もWildと同様の活性値の変化を示しており、酵素と $\alpha$ 2-マクログロブリンとのモル比が2のときの活性値を比較すると、どの未修飾酵素でも約20%まで活性が低下しているのに対し、PEG修飾酵素は全て60%~70%の活性を保持していた。

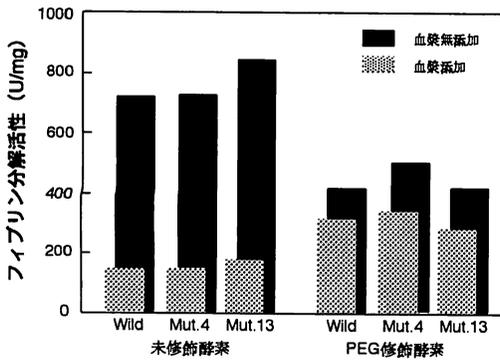


図8 酵素活性に及ぼす血漿の影響

酵素溶液(酵素濃度0.2mg/ml)とヒト正常血漿を等量混和し、37℃で1時間放置した後、Kunitz法でフィブリン分解活性を測定した。

6. PEG修飾酵素の抗原性

生体にとって異種タンパク質である本酵素が血液中に投与された場合、抗体産生が起こり酵素は抗体に捕捉され排除されてしまうことが予想される。ELISAにより酵素と抗体との反応性を調べた結果、PEG修飾酵

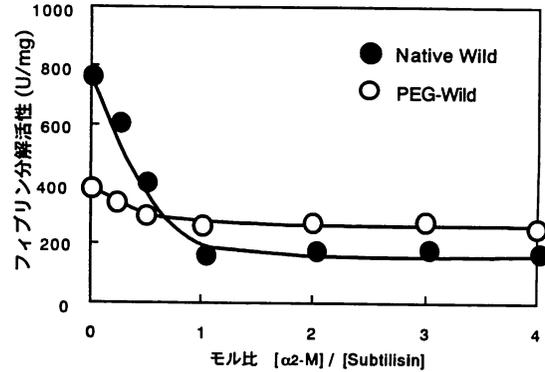


図9 酵素活性に及ぼす $\alpha$ 2-マクログロブリンの影響  
酵素と $\alpha$ 2-マクログロブリンとをモル比が0~4となるように混和し、37℃で1時間放置した後にフィブリン分解活性をKunitz法で測定した。

素は、未修飾酵素に比べウサギ及びモルモットの抗Subtilisin CIR抗体との反応性が低く(Wild、Mut.4、Mut.13いずれも未修飾酵素の約30%)、PEG修飾による抗原性の低減が確認された(図10)。PEG修飾による抗原性、免疫原性の低下は本酵素の血液中での活性保持時間の延長をもたらすものと期待される。

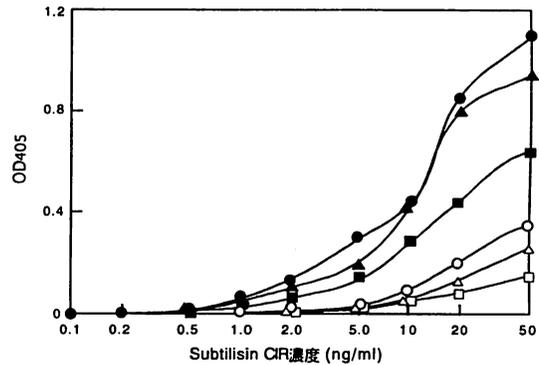


図10 ELISAによるPEG修飾酵素の抗原性の評価  
PEG修飾酵素と抗体との反応性をウサギ及びモルモットの抗Subtilisin CIR抗体を用いたサンドイッチELISAで測定した。  
●未修飾Wild ▲未修飾Mut.4 ■未修飾Mut.13  
○PEG修飾Wild △PEG修飾Mut.4 □PEG修飾Mut.13

IV. 結語

*Bacillus subtilis* CIR110株の高線溶性セリンプロテアーゼSubtilisin CIR及びその変異型酵素のPEG修飾を行った。その結果、酵素1分子にPEG2が1分子あるいは2分子結合した修飾酵素が得られた。そのうちPEG2が1分子結合した酵素に有効な線溶性が認められた。PEG修飾酵素では、保存安定性、血中安定性が向上し、さらに抗原性の低下が確認された。これらの結

果より、PEG修飾Subtilisin CIRの抗血栓性材料への応用が期待される。

*Technol.*, **14**, 150-155 (1992)

- 21) Z. Yang, M. Domach, R. Auger, F. X. Yang, and A. J. Russell, *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 82-89 (1996)

## V. 参考文献

- 1) 齋藤英彦, 抗血栓薬の基礎と臨床, 齋藤英彦編, 医薬ジャーナル社, p.3 (1995)
- 2) 佐藤幸子, 稲井公二, 高倉孝一, 人工臓器, **25**, 180-186 (1996)
- 3) 稲田祐二, タンパク質ハイブリッド, 共立出版株式会社, p.42 (1987)
- 4) M. Kimura, Y. Matsumura, Y. Miyauchi, and H. Maeda, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **188**, 364-369 (1988)
- 5) 橋田充, ドラッグデリバリーシステム, 東京化学同人, p.64 (1995)
- 6) M. S. Hershfield, R. H. Buckley, M. L. Greenberg, A. L. Melton, R. Schiff, C. Hatem, J. Kurtzberg, M. L. Markert, R. H. Kobayashi, A. L. Kobayashi, and A. Abuchowski, *N. Engl. J. Med.*, **316**, 589-596 (1987)
- 7) A. Abuchowski, T. van Es, N. C. Placzuk, J. R. McCoy, and F. F. Davis, *Cancer Treat. Rep.*, **65**, 1127-1132 (1979)
- 8) C. O. Beauchamp, S. L. Gonias, D. P. Menapace, and S. V. Pizzo, *Anal. Biochem.*, **131**, 25-33 (1983)
- 9) S. Satoh, T. Fukumizu, K. Tsuyutani, H. Kiyohara, and K. Takakura, *International Symposium on Smart Polymers in Industry and Medicine*, 103-104 (1998)
- 10) S. Satoh, K. Takakura, T. Yamasaki, Y. Orii, T. Hatta, N. Takizawa, and H. Kiyohara, *The Bulletin of Okayama University of Science*, **33 A**, 105-115 (1997)
- 11) M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.*, **3**, 291-310 (1947)
- 12) T. Astrup and S. Mullertz, *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 346-352 (1952)
- 13) J. Bullock, S. Chowdhury, and D. Johnston, *Anal. Chem.*, **68**, 3258-3264 (1996)
- 14) 佐藤幸子, 福水隆, 森秀治, 高倉孝一, 岡山理科大学技術科学研究所年報, **18**, 70-77 (1999)
- 15) S. J. Stocks, A. J. M. Jones, C. W. Ramey, and D. E. Brooks, *Anal. Biochem.*, **154**, 232-234 (1986)
- 16) A. F. S. A. Habeeb, *Anal. Biochem.*, **14**, 328-336 (1966)
- 17) M. Ottesen and I. Svendsen, *Methods Enzymol.*, **19**, 199-215 (1970)
- 18) R. Bovara, G. Carrea, A. M. Gioacchini, S. Riva, and F. Secundo, *Biotech. Bioeng.*, **54**, 50-57 (1997)
- 19) Y. I. Veklich, O. V. Gorkun, and L. V. Medved, *J. Biol. Chem.*, **268**, 13577-13585 (1993)
- 20) H. F. Gaertner and A. J. Puigserver, *Enzyme Microb.*

## Chemical Modification of the Fibrinolytic Serine Protease Subtilisin CIR and its Mutant Enzymes by Polyethylene Glycol

Sachiko SATOH, Takashi FUKUMIZU\*, and Koichi TAKAKURA\*\*

*Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering,*

*\*Graduate School of Engineering,*

*\*\*Research Institute of Technology,*

*Okayama University of Science*

*1-1, Ridai-cho, Okayama 700-0005, Japan*

*(Received November 1, 2001)*

A potent fibrinolytic serine protease (Subtilisin CIR) of *Bacillus subtilis* CIR110 isolated from fermented food has been purified by hydrophobic column chromatography in high yields. The enzyme was proved to be a subtilisin-like serine protease with total 275 amino acid residues, containing 8 lysine residues, and it demonstrated high fibrinolytic activity irrespective of the presence of plasminogen. Furthermore we prepared a variety of Subtilisin CIR mutant enzymes having additional lysine residues, containing 9~11 lysine residues, introduced by using site-directed mutagenesis for polymer modification. For the application to antithrombogenic biomaterials, Subtilisin CIR and its mutants were modified by activated PEG<sub>2</sub>(2,4-bis(*O*-methoxypolyethylene glycol)-6-chloro-*s*-triazine, MW 5000×2), and both the native and PEG-modified enzymes were studied by activity assays. The PEG-modified enzymes showed high fibrinolytic activity, better storage stability, reduced antigenicity, and highly increased resistance to plasma protease inhibitors such as α<sub>2</sub>-macroglobulin, compared to unmodified enzymes. It is expected that the PEG-modified enzymes would find potential applications in antithrombogenic biomaterials.