

パパインのマーキュリー化とその性質

河 邊 誠 一 郎

岡山理科大学基礎理学科

緒 言

多くの酵素が微生物起源におきかえられているなかで植物プロテアーゼであるパパインは現在でもその特異な性質を利用した広範囲な用途があり、産業的にも重要な酵素の一つである。この酵素は1分子中に1個の活性SHを有し、 Hg^{2+} などの重金属で阻害され、この阻害は、システインおよび、EDTAの同時添加により完全に回復する。またタンパクと低分子基質の両方について広い特異性を有し、さらにペプチド結合の加水分解ばかりでなく、エステラーゼ、チオエステラーゼ、トランスフェラーゼ活性も持っている⁽¹⁾。

このような広範な特異性を持つパパインのマーキュリー化について Kimmel ら⁽²⁾をはじめとして色々研究されてきたが、マーキュリーパパインの動力学定数、保存安定性、放射線耐性などの性質については未だ言及されていないので、ここで検討することにした。

実 験 方 法

マーキュリーパパイン (MP) の調製 Kimmel ら⁽²⁾の方法を参考にしてつぎの操作で行った。0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 40ml 中にパパイン (東京化成工業株) 100mg を溶かす。この溶液に L-システインと EDTA がそれぞれ 0.005M, 0.002M となるように添加し、37°C, 15min 間、パパインを活性化する。このパパイン溶液を 0.1N 塩酸水溶液で pH5.5 に調節したのち、0.12M 塩化第二水銀溶液 2 ml を一滴づつ加え、数 min 間攪拌する。この溶液を半透膜 (三光純薬, Cellulose Tubing C-150) に入れ一昼夜10 l の純水で透析する。透析後の MP 懸濁液を遠心分離 (3000r.p.m., 10min) し、その上澄液を50mlに定容したものを MP 溶液とした。なお貯蔵の際には密封して4°Cにて保存した。

酵素活性測定法 a) プロテアーゼ活性 40°Cで活性化した一定濃度の native パパイン (NP), MP 緩衝溶液 1 ml を試験管に採取し、40°Cに保つ。同じく40°Cに保温したカゼイン溶液 1.25×10^{-4} M (分子量40,000として計算した⁽³⁾) を加えて一時間攪拌しながら酵素反応を行ったのち、5%トリクロル酢酸 (TCA) 水溶液を加え、未反応の高分子カゼインを沈澱させる。生成した沈澱を 30min 室温に放置したのち、濾紙 (東洋濾紙 No. 4, 5.5cm) を用いて濾過し、濾液中の分解生成物を Kunitz 法にて測定した。

b) アミダーゼ活性 40°Cで活性化した一定濃度の NP, MP 緩衝溶液 1 ml を試験管に採取し、40°Cに保つ。同じく40°Cに保温した N- α -ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩 (BAPA, BDH Chemicals, Ltd, England) 1.2×10^{-3} M 緩衝溶液 (5%,

ジメチルスルホオキシドを含む) 5 mlを加えて, 一定時間, 攪拌しながら酵素反応を行ったのち, 30%酢酸水溶液 1 mlを加えて反応を終結させる。遊離した p-ニトロアニリンは 410nm における比色分析により定量する。

c) γ 線照射 NP, MP 緩衝溶液を15~20ml共栓付試験管に取り, 管内を窒素雰囲気とする。これにコバルト60 γ 線 (線量率 5.0×10^4 rad/hr) を10~1000K rad 照射した。

実 験 結 果

マーキュリーパパイン (MP) の再活性化 一般に NP を活性化するにあたって大過剰の L-システイン (0.005M), EDTA (0.002M) を加えるが, MP を再活性化する際のこれら再活性化剤の影響について検討した。

Table 1 は活性化剤の量を変化させた時の生成 p-ニトロアニリン量を比較したものである。

Table 1. Effect of concentration of activating agents.

Activating agent		Enzyme activity (mM PNA/mgE, min)	Relative value
Cysteine (M)	EDTA (M)		
0	0	0	0
0.005	0.002	1.14×10^{-5}	100
0.025	0.010	1.17×10^{-5}	103
0.050	0.020	1.23×10^{-5}	108

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid (sodium salt)

PNA : p-nitroaniline

表からわかるように, 活性化剤を加えない場合には完全に酵素活性が失なわれ, また L-システイン, EDTA 量を増加させても, あまり影響がないことがわかった。したがって MP を再活性化する際の L-システイン, EDTA 量は NP のときと同様, それぞれ0.005M, 0.002M となるようにした。

なお, MP のタンパク含有量は同濃度の NP の約80% (Lowry-Folin 法) であり, MP の活性回復率が, 約80%であることから, MP はほぼ完全に活性を回復していることがわかった。したがって, MP の活性を表わすときは, 見かけのタンパク量の80%が実際に反応しているとして以後計算を行った。

マーキュリーパパインの性質

a) 反応時間, 酵素量と酵素活性 NP および MP について検討した結果を Fig. 1, および 2 に示す。これより基質カゼイン (0.125×10^{-3} M) の場合0.05mg, 基質 BAPA (1.0×10^{-3} M) の場合 0.8mg まで酵素量と酵素活性に直線関係が成立し, 反応時間との関係では, 酵素量を基質カゼインの場合0.02mg, 基質 BAPA の場合 0.8mg 用いたとき, それぞれ 20min, 30~40min 生成物量は時間に比例している。

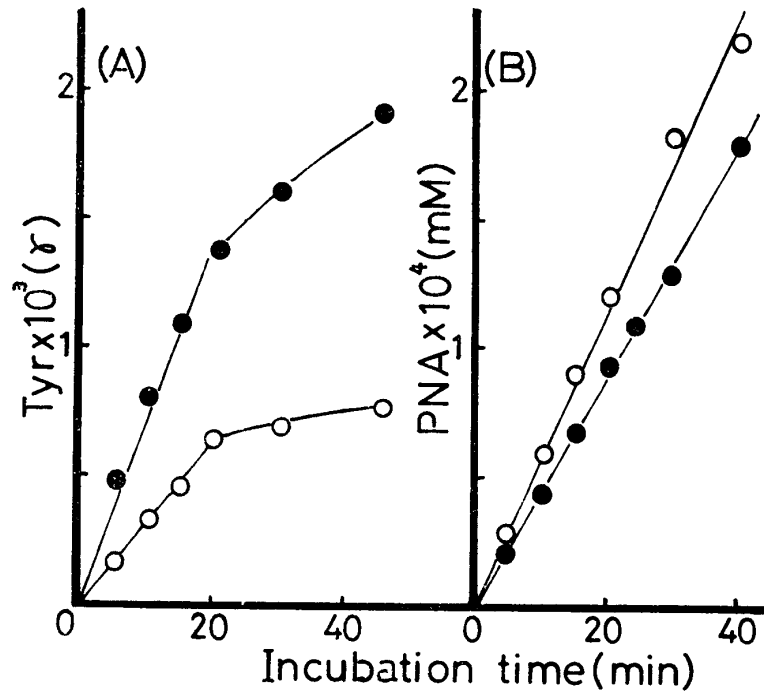


Fig. 1 Effect of incubation time.

Substrate : (A) Casein (B) BAPA

○ : native papain ● : mercuri-papain.

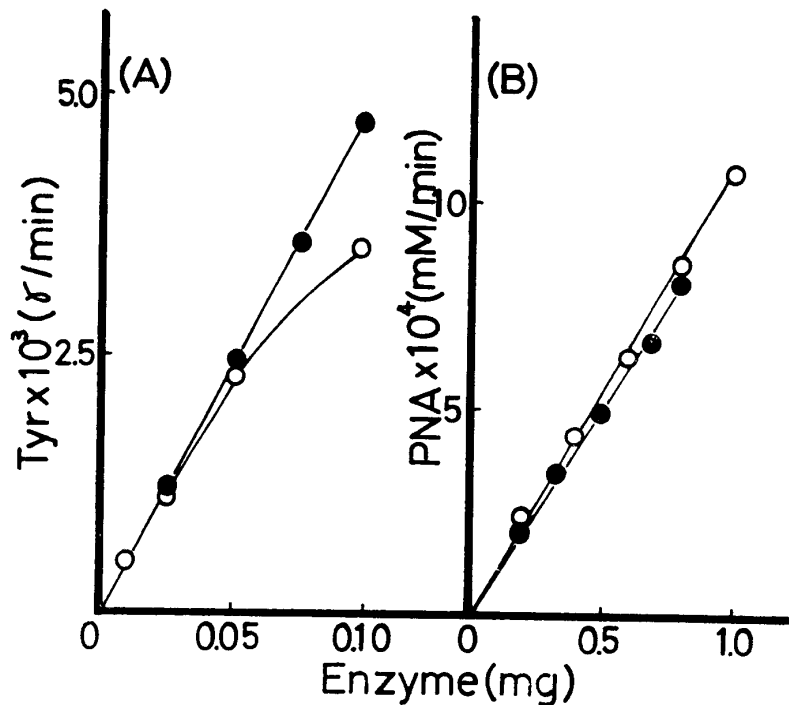


Fig. 2 Effect of concentration of native and mercuri-papain.

Substrate : (A) Casein (B) BAPA

○ : native papain ● : mercuri-papain.

b) pH と酵素活性 Fig. 3 は基質カゼインと BAPA に対する NP と MP の活性におよぼす pH の影響を検討した結果を示す。この図から基質カゼインの場合、最適 pH は NP で pH7.5, MP で pH7.5~9.0, 基質 BAPA の場合では NP, MP 双方共 pH

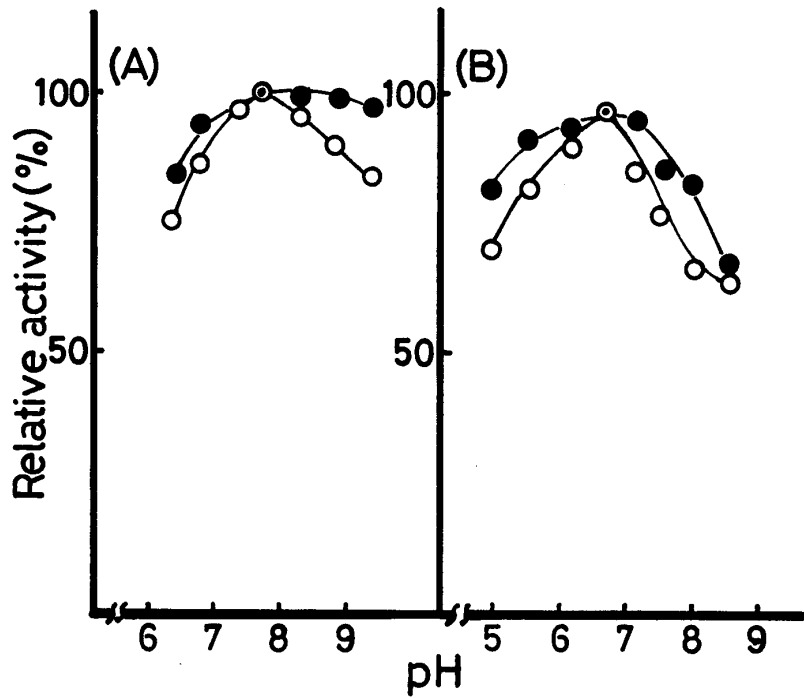


Fig. 3 pH-activity curve.

Substrate : (A) Casein (B) BAPA

○ : native papain ● : mercuri-papain.

6.5 付近であった。また MP は両基質に対して NP と比較して一般に安定性を増したようである。

c) 反応温度と酵素活性 酵素活性におよぼす反応温度について検討した結果を Fig. 4

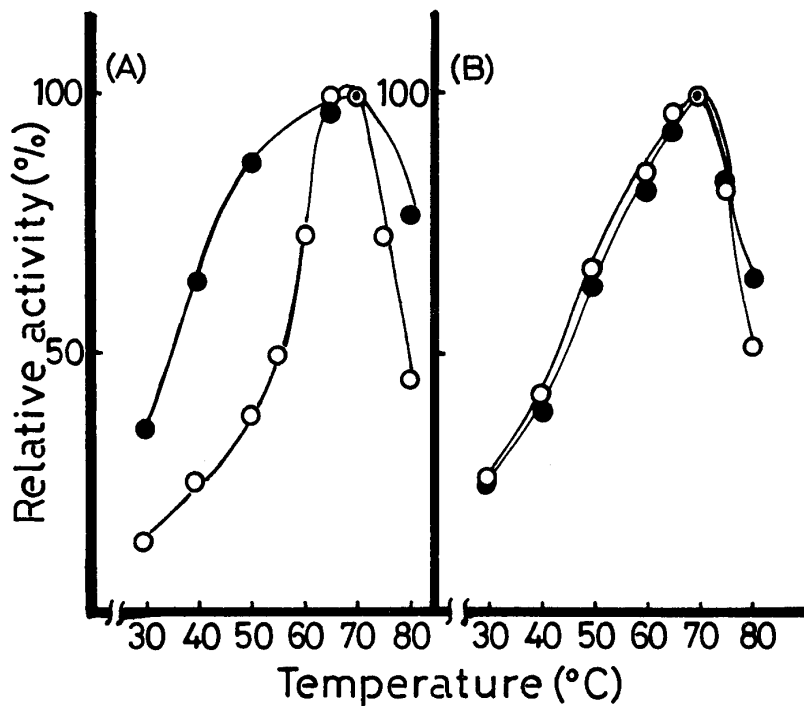


Fig. 4 Temperature-activity curve.

Substrate : (A) Casein (B) BAPA

○ : native papain ● : mercuri-papain.

に示した。基質カゼイン, BAPA に対して NP と MP の最適温度は共に70°CでArrhenius 式により算出された NP, MP の活性化エネルギーは基質がカゼインのとき $NP = 12.2 \times 10^3 \text{cal/mol}$, $MP = 7.25 \times 10^3 \text{cal/mol}$, 基質が BAPA の場合 $NP = 4.47 \times 10^3 \text{cal/mol}$, $MP = 4.19 \times 10^3 \text{cal/mol}$ となった。MP の活性化エネルギーが NP の値と近似していることから, 元のパパインのもつ酵素活性を失うことなく, 活性中心である SH 基をマスクングしているものと思われる。

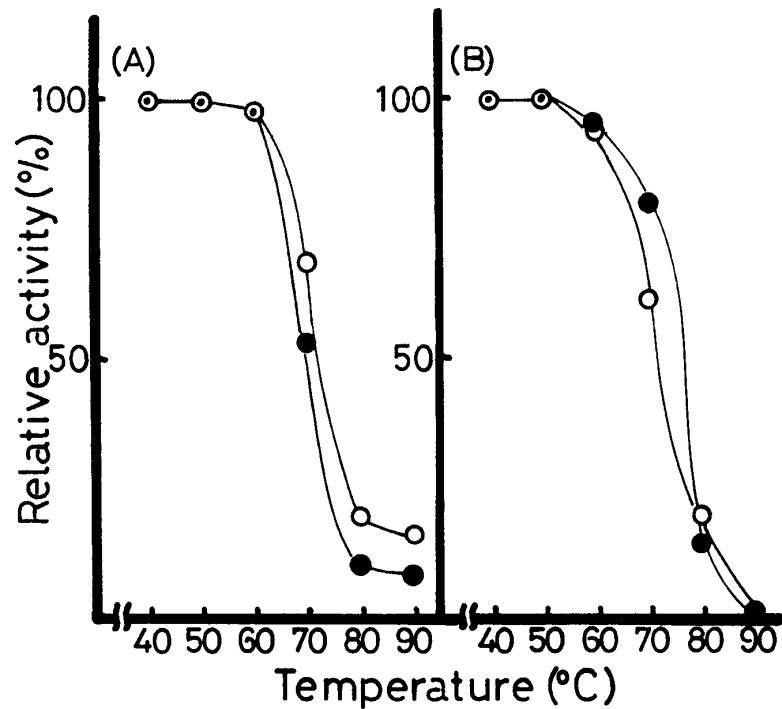


Fig. 5 Thermal stability.
 Substrate : (A) Casein (B) BAPA
 ○ : native papain ● : mercuri-papain.

d) 熱安定性 Fig. 5 からわかるようにマーキュリー化による熱安定性の増大はみられなかった。

e) Km, V 低基質濃度カゼイン 0.003~0.125mM, BAPA0.3~1.0mM における酵素活性から Lineweaver-Burk プロットを求めた結果, 基質がカゼインの時, $NP=V : 4.35 \times 10^{-8} \text{M tyr/mg E, min}$, $Km : 0.0556 \text{mM}$, $MP=V : 1.96 \times 10^{-8} \text{M tyr/mg E, min}$, $Km : 0.182 \text{mM}$ となり, 基質が BAPA の場合では $NP=V : 4.11 \times 10^{-8} \text{M tyr/mg E, min}$, $Km : 2.5 \text{mM}$, $MP=V : 3.17 \times 10^{-8} \text{M tyr/mg E, min}$, $Km : 2.7 \text{mM}$ となる。これらの結果をみると, 低分子基質である BAPA に対しては NP, MP 共に非常に近い V, Km 値を得たが, 高分子基質であるカゼインを用いた場合には, MP の方が V が減少し, Km は増大する結果が得られた。

f) 保存安定性 保存条件は MP, NP 共に緩衝液中 4°Cで保存し, その結果を Fig. 6 に示したが, MP において 173 日経過しても活性は95%維持しているが, NP では28日で

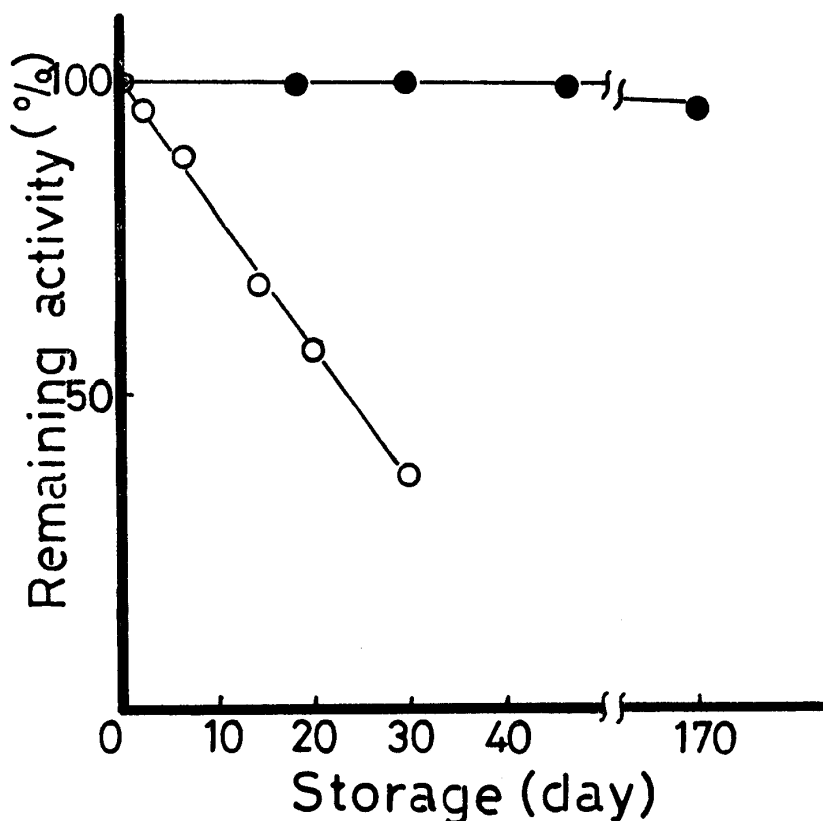


Fig. 6 Relationship between storage period and remaining activity.

○ : native papain ● : mercuri-papain.

Enzymes was stored at 4°C and substrate for enzyme assay was used BAPA.

活性は35%に低下している。これらのことからパパインをマーキュリー化することによって活性中心の酸化や自己分解などによる失活を十分に防ぐことができることを示している。

g) γ 線に対する安定性 酵素の活性中心を修飾することにより, X線などに対する安定性を増すことが知られている⁽⁴⁾。そこで, MP の γ 線に対する安定性を NP と対比して示したのが Fig. 7 である。この図から NP, MP とともに, ある線量までは直線的に失格するが, それ以上の線量では失格の度合が, ゆるやかになっている。これは NP の場合 P-S-S-P のようなパパインの2量体が生成されて, ある程度の γ 線に対する耐性を生じるためであろうと思われる。また MP において, NP と比較した場合, 活性中心である SH 基が保護されているため γ 線による失活は小さいようである。そして 1000Krad の高線量では約70%程度に酵素活性が低下するが, これは活性中心が完全に保護されているとすれば, タンパクの変性と同じような種々の物理的および化学的变化にもとづく変性によるものと思われる。

考 察

従来, パパインのマーキュリー化は粗製パパインから純度の高いパパインを得るための中間操作として行われて来た。しかし前述のように MP は native な酵素の性質を失うこ

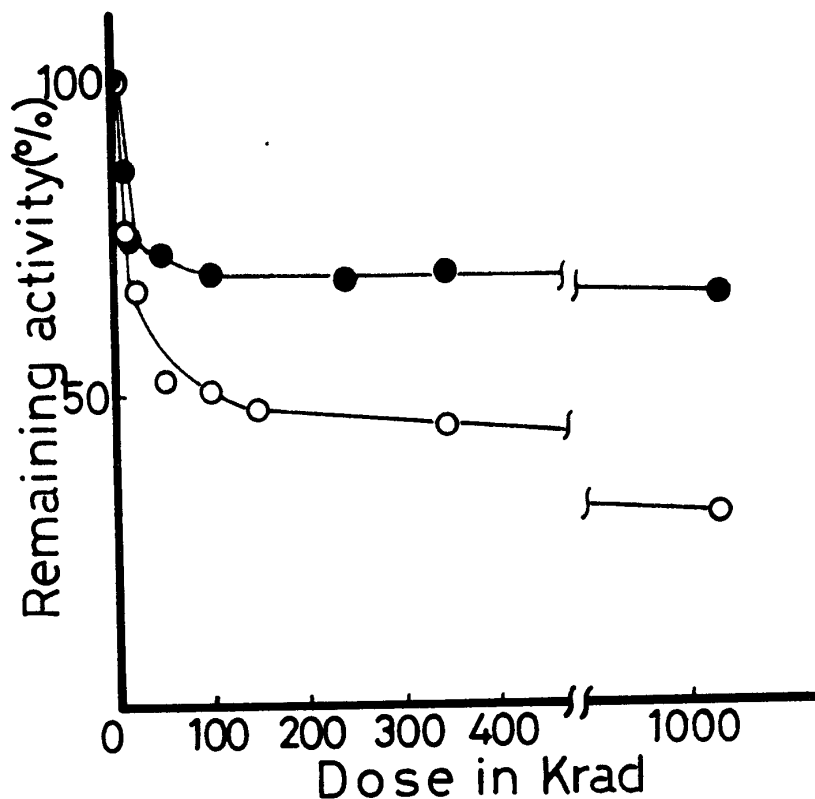


Fig. 7 Radiostability.

○ : native papain ● : mercuri-papain.
Substrate for enzyme assay was used BAPA.

となく、またそれよりも優れた面もあることがわかった。

パパインの活性中心である SH 基はタンパク構造の面からみてもタンパクの高次構造を決定する意味でも非常に重要な役割を果している。しかし SH 基は周囲の環境の変化によって酸化や還元されやすいことから、タンパクの変性が問題となってくる。しかし水銀のような重金属によって SH 基を保護しておくことによって元のタンパクの性質を失うことなく利用されることが期待される。

本研究にあたり多大なご協力、ご指導をいただきました早稲田大学工学部宇佐美昭次教授に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) 河邊誠一郎：岡山理科大学紀要 第13号 119 (1977)
- 2) Kimmel, J. R., Smith, E. L.: *J. Biol. Chem.*, **207**, 515 (1954)
- 3) 水島, 赤堀編., 蛋白質化学II, p 1420 共立出版
- 4) Pihl, A., Sanner, T.: *Radiation Res.*, **19**, 27 (1963)

The Enzyme Characteristics of Mercury Papain

Seiichiro Kawabe

*Department of Fundamental Natural Science, Okayama University
of Science, Okayama, Japan.*

It is now generally agreed that papain possesses a single reactive sulfhydryl group which is essential for activity. The essential sulfhydryl group of papain is kinetically more active than most protein sulfhydryl groups and that it possesses different chemical properties.

So, we obtained mercury papain by incubation with mercuric chloride and the enzyme characteristics of mercury papain was compared with that of native papain. Temperature and pH optima of mercury papain was more stable than that of native papain, and Michaelis constant and activation energy were not changed by modified with mercury. When mercury papain was stored at 4°C it exhibited good stability and radiostability was studied under Co-60 γ -ray irradiation.