

あずき種子蛋白代謝に関する研究（VI） : Azuki proteaseの基質特異性について

阿久根, 了
九州大学農学部

高木, 茂明
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21635>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 20 (4), pp.335-340, 1963-09. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :



あずき種子蛋白代謝に関する研究 (VI)

Azuki protease の基質特異性について

阿久根 了・高木 茂明

Studies on the metabolism of Azuki seed protein
Part VI. Substrate specificity of Azuki protease

Satoru Akune and Shigeaki Takagi

緒 言

酵素を生体代謝と関連して調べる場合、その基質特異性に関する知見が必要となってくる。近年 Bergmann 一派およびその後の研究者達による多数の合成基質を用いた膨大な研究結果^{1,2)}から、基質特異性に基づいて protease 類の分類を行なうことは非常に有意義であることがわかつていく。従つて前報までにその酵素的な一般性質^{3,4)}作用機構^{5,6)}を調べ、さらに精製⁷⁾を行なつた所の小豆種子蛋白分解酵素(以下 Azuki protease と書く)の如き新しい酵素の分類を行なう場合にも基質特異性の研究が必要である。

Protease の基質特異性を知る方法には、1) 出来るだけ多数の合成ペプチドに対して作用させ、分解速度を測定する。2) 単一蛋白質に作用させ生成物の N 端、C 端のアミノ酸の種類を適当な方法によつて知る。3) インシュリン、グルカゴン等の比較的分子量の小さい構造既知の蛋白質に作用させ、生成物の N 端のみ或は N 端とその構成アミノ酸を分析する等がある。このうち 1) の方法は無差別に基質を選択して protease を作用させるので数多くの合成ペプチドが必要であり、その入手がなかなか困難である。さらに大部分の合成ペプチドはエステルまたはトリペプチドかまたはそのエステルであるのでそこで得られた結果が酵素の基質に対する作用に実際に反映しているかどうか分からないという難点がある。しかしこのような難点があるにしても基質の純度の高いこと、取扱の容易なことのために、この方法は現在の所 protease の基質特異性決定に最も有用な方法である。2) の方法を用いた実例の 1, 2^{8,9)}がこれまでにみられる。分解生成物の N 端アミノ酸は Sanger らの DNP 法^{10,11)}によつて容易に知ることが出来るが C 端アミノ酸残基を決定するこ

とは現在知られている。いずれの方法を用いてもなかなか難しく、その上もし N 端、C 端アミノ酸を決定したとしてもそれらの組合せは多数となり、実際問題として酵素の作用するペプチド結合を知ることには不可能に近い。3) は構造既知の蛋白質に酵素を作用させ、生成するペプチドの N 端アミノ酸、並びにアミノ酸組成を決定し、それらのペプチドが蛋白質のどの部分から生じたかを知り、この酵素が作用するペプチド結合を探り出すものである。

これは Sanger らによるインシュリンの構造決定を初めとするその後の一連の蛋白質構造決定に用いられた方法を protease の基質特異性決定に利用せんとするものである。この方法を用いると合成基質を用いた場合よりも一層酵素の基質特異性が明らかになると思われる。

本報告においては、3) の方法を採用して Azuki protease の基質特異性を決定したことについて述べる。基質としてマッコウ鯨のインシュリンを用い、酵素分解物の分析には DNP 化合物のペーパークロマトが主体として行なわれた。これによれば上述の利点の他に 1 回の試料が極く少量ですむという利点がある。

実 験

(1) 材料: Azuki protease はデエチルアミノエチルセルロース (DEAE-セルロース) のカラムを用いた液体クロマトグラフィーによつて超遠心的に均一なまでに精製⁷⁾されたものである。この酵素標品の物理化学的性質の 2, 3 を次に記す。0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.0, $\mu=0.1$) を溶媒とした場合、 $S_{20,0}=4.0$, 粘度 $\eta_{sp}/c=6.0 \times 10^{-5}$ 。紫外線吸収スペクトルをとると典型的な蛋白質吸収スペクトルを示さない。

基質として用いられたマッコウ鯨の酸化インシュリ

ンは Thompson,¹²⁾ Hirs¹³⁾ の方法に準拠してインシュリンを過燐酸化することによつて調製された。その方法の概略をのべると次の通りである。マッコウ鯨から調製された結晶インシュリン* 200 mg を 99% 蟻酸 5.0 ml に完全に溶解させ、この溶液に無水メタノール 1.0 ml を攪拌しながら加える。これを 0° に冷却しておく。別に 99% 蟻酸 9.5 ml と過酸化水素水 (30%) 0.5 ml を混合して 1 時間放置後、0° に冷却し、約 30 分後に両溶液を混合し -5° で 14 時間反応させた。所定時間後冷水 300 ml を加えて蟻酸濃度をうすめ直ちに凍結乾燥を行なつた。この過燐酸化によつてインシュリンのペプチド結合が切れたかどうかを調べるために DNP 法によつて酸化インシュリンの N 端アミノ酸を分析した結果グリシン、フェニールアラニンの 2 種のアミノ酸のみを検出したので、ペプチド結合は切れていないことが確認された。なおマッコウ鯨のインシュリンの構造式としては Ishihara¹⁴⁾ らの報告したものを採用した。

(2) 方法

A) DNP 化の方法

試料の DNP 化は次の方法に従つて行なつた。Azuki protease によるインシュリンの分解生成物の DNP 化は Sanger ら¹⁰⁾ の方法によつて行なつた。即ち、脱塩、減圧濃縮 (後記) した固形物を 2 ml の 1% トリメチルアミン水溶液に溶解し、これに 2.4 デニトロフルオロベンゼン (FDNB) の 5% (V/V) エタノール溶液 4 ml を加えた。これをマグネチック・スターラー上で暗黒下 4 時間攪拌し DNP 化せしめる。反応終了後、2 ml の水を加えてエーテルにて過剰の FDNB を除き、後 20% 塩酸を滴々加えて丁度酸性となし、エチル・アセテートを用いて DNP-ペプチドを抽出した。

一方ペプチドの酸分解物の DNP 化は, Mills¹⁵⁾ の方法に準じて行なわれた。即ち減圧乾固した酸水解物に水を加えて完全に溶かし (このときの溶液の容量は 0.5~1.0 ml), これに固体重炭酸ソーダを加えて溶液の pH が僅かにアルカリ性になる程度とする。約 2 倍容の無水エタノールを加え、次に 0.5 ml の FDNB のエタノール 5% 溶液を加えて攪拌しながら暗所に放置し 5~8 時間反応させた。反応終了後、同一容器内においてエーテルと数回振つて過剰の FDNB を除去した後、6 N 塩酸を滴々加えて液の pH を酸性となし、

エーテル或はエチル・アセテートと振つて DNP-アミノ酸を抽出する。抽出液をコールド・フィンガー¹⁵⁾ 中にて濃縮し DNP を昇華除去した後ペーパークロマトを行なう。

B) DNP ペプチド, DNP-アミノ酸のペーパークロマトグラフィー

展開溶媒として DNP-アミノ酸の場合は 1 次展開に 0.1 M フタル酸緩衝液 (pH 6.0) にて飽和した第 3 アミルアルコール、2 次展開に 1.5 M 磷酸緩衝液 (pH 6.0) を使用し、DNP-ペプチドの場合はこの溶媒系以外に、フタル酸緩衝液を 3% アンモニア水にかえた 1 次展開溶媒を用いた。

濾紙は DNP-アミノ酸の場合、東洋濾紙 No. 51 (40 cm×40 cm), DNP-ペプチドの場合 No. 50 (40 cm×40 cm) をそれぞれ用いた。展開にはすべて上昇法を採つた。

結 果

(1) 酸化インシュリンの酵素分解

酸化インシュリンに Azuki protease を作用させ、その生成物を分析する前にほんとうにインシュリンが分解されているか、また Azuki protease の自己消化物の混在の懸念はないか等を調べる必要がある。その為にインシュリンの酵素的加水分解を経時的に調べた。

Azuki protease の作用最適 pH は 4.2~4.5 であるが、この pH 範囲では酸化インシュリンの A, B 鎖は共にほとんど溶解しない。そこで Azuki protease が高濃度の尿素に対して比較的抵抗性の強いことを利用して尿素濃度 6 M として両鎖を溶解させた。即ち基質に酸化インシュリンをそのまま用い、pH 4.0 の 0.4 M 醋酸緩衝液に懸濁させ尿素を加えてその濃度を 6 M とした。反応液の組成は次の通りである。

基質: 1% 酸化インシュリン	0.3 ml
酵素: 0.25% 溶液	0.05 ml
pH	4.4

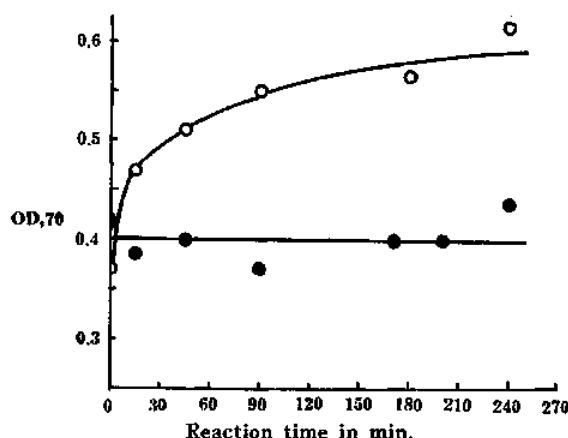
この反応液を 33° の恒温槽中で所定時間反応させた後、0.4 M TCA 溶液 1 ml を加え、そのまま 33° に 15 分間置き、直ちに小漏斗を使つて濾過する。この濾液の 0.1 ml を分取し、これにニンヒドリン溶液† を 0.1 ml 加え、100° において 15 分間加熱し発色させる。冷却後 60% エタノール 4.8 ml を加えて直ちに

† これは Moore らの改良法¹⁶⁾ に従つて調整されたものであり、酸化防止剤としてヒドリンタンチンを含む。

* 大洋漁業株式会社より恵与されたもの。

570 m μ のフィルターを用いて吸光度を測定した。また空試験として基質を抜いたものを用いた。その結果を第1図に示す。これを見ると Azuki protease の自己消化の懸念は全くなく、インシュリンの水解のみ起こっていると考えてよい。

なおこれ迄の実験において経験的に得られたことであるが、この酸化インシュリンの分解を行なうに当つて次の諸点に注意を払う必要があつた。1) 基質インシュリンの量に対して protease の量が比較的多い場合、多量の沈澱を生ずる。2) 酸化インシュリンを pH 4.0 で尿素溶液に溶解させ、その後同じ緩衝液 (pH 4.0 の 0.2 M 醋酸緩衝液) により稀釈して尿素濃度を下げると沈澱が生成し、この沈澱は尿素濃度を上げては溶解しない。上述の点を考慮すると、酸化インシュリンの分解を円滑に行なうためには、酸化インシュリンと Azuki protease との量比 (W/W) を 10 以上とすること、また 6 M 尿素溶液の尿素濃度



第1図。酸化インシュリンの Azuki protease による水解曲線。○—○ インシュリン+Azuki protease, ●—● Azuki protease のみ。

を 5 M 以下に下げないことの2点に注意せねばならない。第1図において自験値の高いのは反応液中の尿素が ninhydrin と反応して発色しているためである。

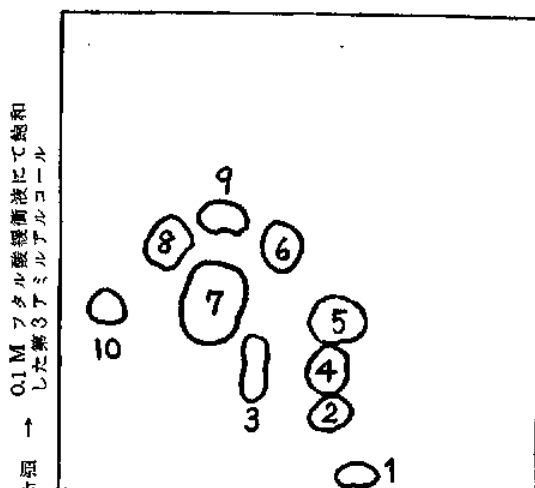
(2) インシュリンの水解と水解物の調製ならびにペーパークロマトグラフィー

(1) における結果を参考にして分析供試用の水解物を得るための proteolysis を行なつた。

反応液の組成を次に示す。

基質：酸化インシュリンの 1% 溶液 3 ml (30 mg); 尿素 1.08 g/3 ml (6 M)

→ 1.5 M 醋酸緩衝液 (pH 6.0)



第2図。DNP-ペプチド類のペーパークロマトグラム。

酵素：Azuki protease 1.36% 溶液 0.1 ml (1.36 mg), 6 時間後に 0.1 ml を追加し、更に 22 時間後に 0.1 ml を追加。

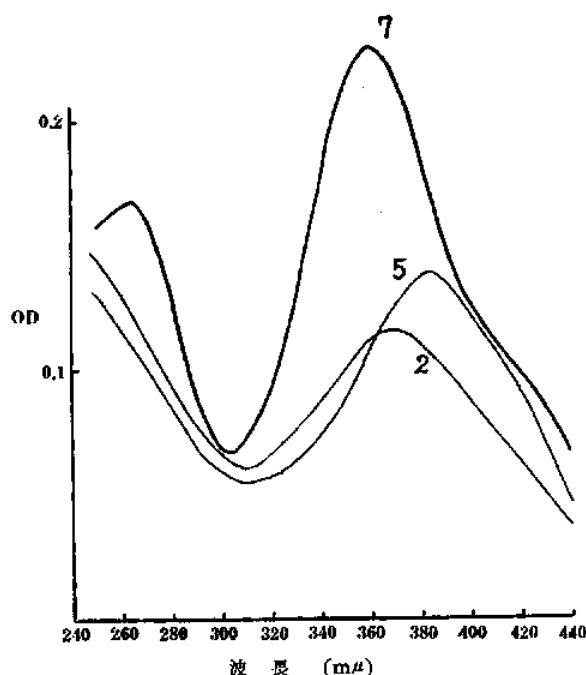
30 時間後に反応を終了させ、反応液を 100 の水浴に 5 分間浸ける。その時、かなりの量の沈澱が生成するので未反応の酸化インシュリンが相当残っていると思われる。この反応液をそのまま H 型の IR-120 樹脂カラム (2×15 cm) の上端に流し込んで自然流下させ、蒸留水を用いてカラムを充分水洗する。

水洗後約 300 ml の 2 N アムモニア水によって、吸着されていたペプチド類を溶出する。

溶出液中には水解物と少量の塩類が含まれるが、多量の尿素ならびに熱処理によつて凝固沈澱した物質は完全に除去出来た。溶出液を減圧濃縮し、Mills らの方法¹⁵⁾により DNP 化を行なつた。この DNP 化合物のペーパークロマトグラムを第2図に示す。これらのスポットのうちスポット7はデニトロフェノールのものであるから、水解物によるスポットの数は9個である。

(3) 各 DNP-ペプチドのN端ならびに組成アミノ酸の同定

第2図に示されたペーパークロマトグラム上の各スポットを切り抜き、1% 重炭酸ソーダ水溶液にて



第3図. スポット 2, 5, 7 の吸収スペクトル.
溶媒: 1%重炭酸ソーダ水溶液.

DNP-ペプチドを抽出する¹⁷⁾. そして抽出液そのまゝの吸収スペクトルを測定した. その結果, スポット 2, 5 は第3図のようなスペクトルを与え, また OD_{390}/OD_{360} の比がそれぞれ 0.86, 1.23 である. このことから, 多分両方とも N 端アミノ酸はプロリンであろうと推定した. またスポット 7 は OD_{390}/OD_{360} が, 0.77 であるのと第3図に示された吸収スペクトルとからデニトロフェノールであることは明らかである.

次に, これとは別に Sanger ら¹⁸⁾の方法によつてペーパークロマトグラムから 3%アンモニア水によつて抽出された抽出液に 2 倍容の濃塩酸 (36.5%) を加え

封管中 110° で 4~8 時間加水分解する. この場合 1 回のペーパークロマトグラフィーによつて得られる試料の量はその後の処理操作を行なうには少ないので, 数回のペーパークロマトグラフィーのスポットから溶出して得た試料を合せて一同に用いた.

1) N 端アミノ酸の同定

前記の酸分解物をスリ合せ付き試験管に移し, 2 倍容のエーテルと 5~10 回振つて DNP-アミノ酸を抽出する. 抽出液を合せて少量の水と数回振つて塩を除き, エーテル層を減圧濃縮する. 濃縮物を濾紙にスポットし, 前記展開溶媒を用いて展開する. そうして同時に展開させた標準 DNP-アミノ酸との相関位置から試料の DNP-アミノ酸を同定した. その結果を第1表の第2欄に示す. スポット 2, 5 はともに DNP-プロリンの分解物を与え, スポット 7 はこの他にデ-DNP-リジンに相当するスポットを与える.

2) 組成アミノ酸の同定

第2図の各スポットの酸分解物を減圧乾固した後, Mills の方法¹⁹⁾に従つて DNP 化し, 生成した DNP-アミノ酸類のペーパークロマトグラフィーを行なう. その結果を第1表の第3欄に示す.

(4) Azuki protease の基質特異性

前節迄の結果から得られた各スポットのアミノ酸組成を, マッコウ鯨の酸化インシュリンの構造にあてはめると第1表の第4欄のようなアミノ酸配列をもつた化合物であることがわかる. これを酸化インシュリンの A, B 両鎖の中に書き表わすと第2表のような結果となる. こゝで矢印の実線は確実に切る箇所, 点線は多分切るであろうという箇所を示す. 現在までのところ生成ペプチド (或はアミノ酸) のうち組成のわかつ

第1表 図2において得られた各スポットの構成アミノ酸ならびにそのアミノ酸配列.

Spot No.	N 端アミノ酸	他の構成アミノ酸	スポットの組成
1	—	—	—
2	Pro	Lys, Ala	Pro (Lys-Ala)
3	Val	—	—
4	—	—	—
5	Pro	ナ シ	Pro
6	Ileu	Ser, $CySO_3H$	Ileu ($CySO_3H$ -Ser)
7	DNP	—	DNP
8	Leu	Gly, Glu, $CySO_3H$, Val	Leu (Val- $CySO_3H$ -Gly-Glu)
9	Leu or Ileu	—	—
10	Val	—	—

第 2 表. アズキプロテアーゼの作用するペプチド結合。

A 鎖	Gly-Ileu-Val-Glu-Glu(NH ₂)-CysO ₃ H-Thr-Ser-Ileu-CysO ₃ H-Ser-Leu-Tyr-Glu(NH ₂)...Asp(NH ₂)
B 鎖	Phe.....His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-CysO ₃ H-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala

ているのは4個のみであつて、残りのペプチドのアミノ酸組成がわからないので正確な判定はおこなえないが、いちおう seryl, threonyl, tyrosyl, ペプチド結合を切り易いということが云えるのではないかと思う。

(5) 考察ならびに小括

古く 1941 年に Bergmann ら¹⁹⁾は動物の消化器系に存在する protease 類の基質特異性について次のような見解をのべている。すなわち, pepsin, chymotrypsin, trypsin の各の特異性は基質中の必要な構造部分に関して明確に定義されると云い、これらの protease 類の特異性に影響するとみられる基質の構造細部は以下のような点であることを経験的な知識をもとにして述べている。1) 当該 protease に対する基質の感受性は基質中にある種のアミノ酸残基が存在するかどうかによつて決定される。2) Protease はつねに典型的アミノ酸を含むペプチド結合の部分で基質を攻撃する。3) 1, 2 の条件が満たされている場合でももし遊離のアミノ基あるいは遊離のカルボキシル基がペプチド鎖中とか、ペプチド結合に密接して存在するならばペプチドは protease の作用をうけないことがある。4) 1 から 3 までに述べた因子に加えるに、protease の作用は他の構造的因子、例えば非典型的アミノ酸残基の差異のような因子によつてある程度変化をうける。

これらの説明はじあるいはトリペプチド程度の小さな基質について得た知見を総合することによつてなされているが、現在その若干が改められているだけで他はその後の追試によつても確められている。例えば trypsin, chymotrypsin について説明するならば、trypsin は arginine, lysine 等の塩基性アミノ酸のカルボキシル基の関与するペプチド結合を分解し、chymotrypsin は tyrosine, phenylalanine のカルボキシル基の関与するペプチド結合を切ることが認められた。しかしながら、酸化インシュリン、 α -コルチコトロピン、グルカゴンを用いてのその後の研究²⁰⁻²⁴⁾

によれば trypsin は低分子を基質にした場合と同じ基質特異性を高分子ペプチド(あるいは蛋白質)にたいして示すのに反して、chymotrypsin はさらに 2, 3 の異なるペプチド結合を分解する。pepsin の基質特異性は Bergmann らによると、tyrosine, phenylalanine のアミノ基を含むペプチド結合を切るとされていたが、その後の研究^{20,21,25)}ではこの結合以外に多種類のペプチド結合を切り、現在 pepsin の基質特異性はないものと考えられている。

このように protease の基質特異性を明確に規定するという事はなかなか困難であり、使用する基質によつて結果が左右され易い。

これまで主として低分子ペプチド類が基質特異性決定に用いられてきたのは緒言のところで説明したような利点を持つているからであり、確かに有用な方法ではあるが、しかし特異性未知の酵素について実験を行なう場合、多数のペプチドを要することから確定的判定を下し得ない欠点がある。この点に関しては構造既知の蛋白質あるいは高分子ペプチドを基質に使うならば、protease の in vivo における作用をある程度再現出来ると考えられる。この理由から、本報告においては、基質に酸化インシュリンを用いたのであるが、予期しないところの実験技術上の困難があり、分解生成物全部のアミノ酸構造を明らかにするには至らなかった。しかしながら、判明した範囲内では、この Azuki protease は水酸基を有するアミノ酸のカルボキシル基の関与するペプチド結合を切りやすいということが出来る。このような基質特異性を有する protease は未だその報告例がなく、基質特異性による分類法からいけば、全く新しいものといえる。

またこの protease 特異性が、蛋白質分解初期における基質内部構造の変化、解離現象等どのような関係にあるかは興味ある課題である。

参 考 文 献

- 1) Bergmann, M. and J.S. Fruton; JACS **118**, 45 (1937).

- 2) 山崎 誠; 実験化学講座 (日本化学会編) **24**, 323 (1958).
- 3) 阿久根 了・高木茂明; 日本農化誌 **34**, 352 (1960).
- 4) 高木茂明; 日本農化誌 **34**, 357 (1960).
- 5) " " **34**, 926 (1960).
- 6) " " **34**, 930 (1960).
- 7) Akune, S. and S. Takagi; Agr. Biol. Chem. (Japan) **26**, 63 (1962).
- 8) Desnulle, P., Rovey, M. and G. Bonjour; B. B. A. **5**, 116 (1950); **6**, 116 (1950); **8**, 450 (1952).
- 9) 奥村一男・萩原文二・松原央; 蛋白質構造討論会 1954, 11月, 於大阪.
- 10) Sanger, F.; Biochem. J. (London) **39**, 507 (1945).
- 11) Sanger, F. and E. O. P. Thompson; Biochem. J. (London) **53**, 353 (1953).
- 12) Thompson, E. O. P.; B. B. A. **15**, 440 (1954).
- 13) Hirs, C. H. W.; J. B. C. **219**, 611 (1956).
- 14) Ishihara, Y., Saito, T. and Y. Ito; Nature **181**, 1468 (1958).
- 15) Mills, G. L.; Biochem. J. (London) **50**, 707 (1952).
- 16) Moore, S. and W. H. Stein; J. B. C. **211**, 907 (1954).
- 17) Fraenkel-Conrat, H., Harris, J. I. and A. L. Levy; "Method of Biochemical analysis" Vol. II, p. 359 (1955).
- 18) Sanger, F. and H. Tuppy; Biochem. J. **49**, 463 (1951).
- 19) Bergmann, M. and J. S. Fruton; Advances in Enzymology Vol. 1, p. 63 (1941).
- 20) Sanger, F. and E. O. P. Thompson; Biochem. J. (London) **53**, 366 (1953).
- 21) Sanger, F. and H. Tuppy; Biochem. J. (London) **49**, 481 (1951).
- 22) Bromer, W. K., Sinn, L. G. and O. K. Behrens; JACS **79**, 2798 (1957).
- 23) Li, C. H., Geschwind, I. I., Cole, R. D., Raacke, I. D., Harris, J. L. and J. S. Dixon; Nature **176**, 687 (1955).
- 24) Bromer, W. W., Staub, A., Sinn, L. G. and O. K. Behrens; JACS **79**, 2801 (1957).
- 25) Schlamowitz, M., Peterson, L. U. and F. C. Wissler; A. B. B. **92**, 58 (1961).
- 26) Hocevar, B. J. and D. H. Northcote; Nature **179**, 488 (1957).

Summary

The substrate specificity of a protease in Azuki seed (Azuki protease), which gave a single peak in the ultracentrifugal pattern, was investigated. The oxidized insulin of spermwhale was used as the substrate of Azuki protease. The analysis of N-terminal amino acid and the other amino acids of the hydrolytic products (mainly lower peptides) were carried out by Sanger's DNP method. If amino acid construction of each peptide obtained in these analytic results was applied into the structure of spermwhale oxidized insulin, the peptide linkages attacked specifically by Azuki protease would be able to know.

Namely, it was found that this Azuki protease attacked to the peptide linkages participated by carboxyl groups of amino acids which had hydroxyl group.

Up to date, there have been no report on the protease having such a specificity.