ウシ歯胚の蛋白分解酵素に関する研究

II 酵素の諸性質について

坂 本 征 三 郎

東京医科歯科大学歯学部生化学教室（指導：佐々木哲教授）

（昭和42年10月15日受付）

Proteolytic Enzyme of Bovine Tooth Germ

II Some Properties of the Enzyme

Seizaburo Sakamoto

Department of Biochemistry, School of Dentistry,

Tokyo Medical and Dental University

(Director: Prof. Satoshi Sasaki)

は し が き

口腔領域の組織を材料とした生化学的研究は現代生化学の最先端のものにくらべ立遅れがみられる。この理由の一つとしては細菌やウイルスなど、また高等動物でも肝などの実質臓器を材料とした場合にくらべて硬組織や結合組織はその成分が不均一であり、また一般に取扱い難いため定量分析に十分な試料をうるという出発点ですでに非常な困難があるためであった。

しかし最近の生化学的実験方法は飛躍的に進歩し、微量、超微量測定法が開発されつつあり、口腔領域の材料についても生化学的研究を十分に適用できるようになったと考えられる。又最近の電子顕微鏡の進歩は口腔諸組織の超微細構造を明らかにしつつあるが、これら形態学的所見も生化学的な裏付けによつてはじめてその構造と機能の両面からの解明がなされるものと考えられる。

著者は前報¹⁾にウシの歯胚を材料としエナメル器（歯小嚢を含む）と歯乳頭を分離し、それを用いて粗酵素液を調製し蛋白分解活性を検出した。

この蛋白分解活性は細胞内酸性プロテアーゼすなわちカテプシンによるものであった。両組織の酵素の異同およびこのカテプシンがどのタイプに属するかを知るために著者は前報の方法に基づいて調製した粗酵素液を用いて、本酵素の諸性質について基礎的検討を行ない、いくつかの結果を得たのでここに報告したい。

材料と方法

エナメル器（歯小嚢を含む）および歯乳頭の分離、両組織のホモジエネートの調製、粗酵素液の調製、酸変性ヘモグロビン基質の調製、活性測定法等は前報と同じである。反応速度基質濃度曲線作成のために用いた酸変性ヘモグロビン基質溶液は次のようにして調製した。出来るだけ高濃度の酸変性ヘモグロビン溶液（8%が限度であった）を前報の方法にしたがって調製し、0.1 M クエン酸緩衝液 pH 3.0 に対して一昼夜外液をマグネチックスターラーで攪拌しながら透析し、緩衝液交換を行ない、これを原基質溶液（7.7%）とし、それを1, $\frac{3}{2}$, 3, 6, 12, 24 倍に同じ0.1 M クエン

酸緩衝液を用いて稀釈した。これら基質溶液 1.50 ml に粗酵素液 0.25 ml を加えると反応液中の基質濃度はそれぞれ、6.6, 4.4, 2.2, 1.1, 0.55, 0.275 %であった。pH 安定性についての実験で用いた緩衝液の pH 2 から 7 は 0.04 M McIlvaine 緩衝液, pH 8 から 10 は 0.2 M グリシン・苛性ソーダ緩衝液を用いた。pH 1 については 0.2 N 塩酸を用い終濃度が 0.1 N になるようにした。なお、粗酵素液は deep freezer 中に凍結状態で保存し、使用の都度融解した。又一部凍結乾燥した。

結 果

i) 反応生成量の時間的变化：エナメル器粗酵素 0.15 単位 (ΔOD 280 $m\mu$ /hr を活性の単位とした。前報参照), 歯乳頭粗酵素 0.20 単位を用いて 2.5 % 酸変性ヘモグロビン基質を 4 時間まで作用させたところ図 1 にみられるように直線関係が認められた。縦軸に示した 280 $m\mu$ における紫外線

図 1 反応生成量の時間的变化

○-○ : エナメル器粗酵素 (0.15 単位)
●-● : 歯乳頭粗酵素 (0.20 単位)

吸収はそれぞれの測定値からゼロタイムの値を差引いた値 ΔOD 280 $m\mu$ である。

ii) 反応速度と酵素量の関係：エナメル器粗酵素の凍結乾燥物 (0.14 単位/mg—抽出溶液の塩重量も含まれている) を 0.1 M 酢酸ソーダ溶液に溶かし, 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml とした。これらの 0.25 ml を用い 30 分インキュベートして活性を測定し

図 2 反応速度と酵素量の関係

たところ図 2 のように直線関係が認められた。

iii) 反応速度と基質濃度との関係：材料と方法の項で述べた各種濃度酸変性ヘモグロビン基質を用いてエナメル器粗酵素 0.11 単位および歯乳頭粗酵素 0.25 単位について得られた結果を図 3 に示した。歯乳頭の反応速度についてはその 2 分の

図 3 反応速度基質濃度曲線

○-○ : エナメル器粗酵素 (0.11 単位)
●-● : 歯乳頭粗酵素 (0.25 単位—測定値の $\frac{1}{2}$ をプロット)

1 をプロットした。両組織からの粗酵素は 6.6 % 酸変性ヘモグロビンでも完全に飽和されないことが認められた。これらの測定値を用い Hofstee²⁾ にしたがって基質濃度 (S) を横軸に, 基質濃度を反応速度で除した値 (s/v) を縦軸にとりプロットした

図 4 反応速度と基質濃度の Hofstee プロット

○-○- エナメル器粗酵素(0.11 単位)
●-●- 歯乳頭粗酵素(0.25 単位—測定
値の $\frac{1}{2}$ をプロット)

(図 4)。図からエナメル器粗酵素のミカエリス恒数は 0.90%，最大速度は 0.336 ΔOD 280 $m\mu$ /hr であつた。歯乳頭粗酵素については酵素量 0.11 単位に換算してミカエリス恒数 0.84%，最大速度 0.305 ΔOD 280 $m\mu$ /hr が得られた。

iv) 熱安定性：両組織からの粗酵素を 50°C あるいは 60°C の水浴中に 15 分間置きその後 1 時間至適条件で反応させ熱処理を行なわなかつた対照と比較して熱による失活程度を調べたところ表 1 のような結果を得た。50°C 15 分熱処理を行なつ

表 1 粗酵素の温度安定性

Treatment	Enamel Organ		Dental Papilla	
	ΔOD at Activity 280 $m\mu$ remained (%)		ΔOD at Activity 280 $m\mu$ remained (%)	
Control	0.157	100	0.284	100
50°C, 15 min.	0.033	21	0.101	36
60°C, 15 min.	—	0	—	0

た場合エナメル器粗酵素では 21% に、歯乳頭粗酵素では 36% に活性が低下した。さらに 60°C 15 分熱処理ではいずれの粗酵素も完全に失活した。

v) 至適温度、温度係数および活性化エネルギー：エナメル器粗酵素の一定量を用いて 20°, 30°, 40°, 50°C において 1 時間反応させ、各々の活性

図 5 反応速度と温度の関係

をプロットしたのが図 5 である。見かけ上の至適温度は 40°C であり、50°C では前項の結果にもみたように著明な失活が起こり温度活性曲線は急激に下降している。30°C から 40°C の間について温度係数 (Q_{10}) を求めたところ 2.0 であり、これらの値をアレニウスの式、 $E = R \ln(k_2/k_1) / \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$ に代入して活性化エネルギーを計算したところ 13,000 cal/Mol なる値が得られた。

vi) pH 安定性：エナメル器および歯乳頭から抽出した粗酵素の至適 pH はいずれも 3.0 であることを前報で示したが、ここではこれら粗酵素の安定 pH を検討した。一定量の粗酵素に対して等容の塩酸あるいは緩衝液を希望する pH にしたがって次のように加えた。pH 1 については 0.2 N 塩酸を、pH 2 から 7 は 0.04 M McIlvaine 緩衝液を pH 8 から 10 は 0.2 M グリシン・苛性ソーダ緩衝液を加えて調製した。各 pH の粗酵素液を 2 時間 37°C の水浴中に放置後至適 pH, 3.0 で 1 時間反応させた。なお、各々の pH を逐次 pH メーターでチェックした。残った活性をパーセントで示し、処理した pH に対してプロットしたのが図 6 である。エナメル器、歯乳頭から抽出した粗酵素のいずれについても pH 1 ではほとんど活性が認められなかつた。pH 2 から 4 の範囲で安定であり、pH 5 以下になると次第に不安定となり、特にエナメル器粗酵素では pH 8, 9 で失活が強く起こ

図4 粗酵素の pH 安定性
○-○：エナメル器粗酵素
●-●：歯乳頭粗酵素

り、pH 10 では両組織の粗酵素の活性は約 55 % に低下した。総じて両粗酵素の pH 安定性は同じ傾向を示し、安定 pH は至適 pH にほぼ一致していることがわかった。

vii) 活性化剤および阻害剤の作用：活性化剤として L-システイン塩酸塩を反応溶液中 0.01 M 加えたが活性に変化は認められなかった。又 p-Chloromercuribenzoic Acid (pCMB) 0.2 mM, モノヨード酢酸 0.01 M, EDTA 0.2 mM を 各々加えても明瞭な阻害は認められなかった。

討 論

酸性に至適 pH をもつ細胞内蛋白分解酵素はカテプシンと総称され、他の多くの酸性加水分解酵素と共に細胞内リゾソーム顆粒中に存在する³⁾。この酵素が組織の死後自己融解に関与していることは古くから知られていたが⁴⁾、生理的な意義についても今迄いろいろ考えられてきた。例えば血清蛋白の分解等を通しての蛋白質代謝⁴⁾、トランスアミデシオン作用によるペプチド合成⁵⁾などが考えられた。又食細胞作用による異物消化に働いているとも考えられる。さらに最近、構造蛋白質の分解消失にもカテプシンが重要な役割を演じていると考えるようになってきた。例えば分娩後の退縮期子宮ではコラーゲンが急速に分解消失して

いくが⁶⁾、カテプシンの活性変動がこれと密接な関係をもつことは多くの研究で明らかにされている⁷⁾。ところが一方、カテプシンの至適 pH は 3 から 5 とかなり低いことからこれが生理的に正常な細胞内で作用しているとする考えに疑問を持つ研究者もいる。しかし Rous⁸⁾ は単核白血球の食胞 (phagocytosed vacuole) 内の pH を測定して 3.0 と報告している。又最近 Katchalski⁹⁾ は、パパインで膜を作り suspension で反応させて至適 pH 曲線を解析したところ溶液での場合と非常に異なる結果を得た。その原因を追求したところ、定常状態においては膜の内部の pH は外の pH より数単位低いことがわかったという。これはモデル実験ではあるが、細胞内酵素のあり方は彼のいう“微小環境” (microenvironment) に影響されていると考えられ、普通の溶液状態での至適 pH からその in situ での酵素作用を即断することは誤りをおかすことになりかねない。いずれにしてもカテプシンの生理的意義を考える場合その基礎となるカテプシンの酵素学的研究が進んでいないことを痛感する。これは一般にカテプシンの精製が非常に困難だからであろう。

本報告では前報に示した方法で調製したエナメル器および歯乳頭からの粗酵素を用いて粗酵素レベルで酵素化学的な基礎的諸性質について検討した。両組織からの粗酵素による酸変性ヘモグロビンの分解速度は本実験条件下においては反応時間に対して直線的であるから基質濃度について零次反応である。酸変性ヘモグロビン基質でその濃度を増加させても酵素は完全に飽和されなかった。したがって本酵素にとって酸変性ヘモグロビンは最適基質とはいえないかもしれない。しかし酸変性ヘモグロビンはこの種のプロテアーゼの活性測定に広く用いられており、その他にそれほど著明に分解される基質はない。Press¹⁰⁾等はウシの脾臓から精製したカテプシン D が酸変性アルブミンを pH 4.2 で分解すると報告しているが、その速度は酸変性ヘモグロビンの $1/40$ であるという。著者も本酵素を用いて酸変性アルブミン、酸変性カゼインについて同様に調べたところ、分解

は極く僅かしか認められなかつた。したがつて酸変性ヘモグロ빈はこの種の酵素の活性検出、定量には現在のところ最も便利であるといえよう。本酵素の組織中での生理的基質が何であるかこの段階では不明であるがそれらは酸変性ヘモグロ빈よりも効果的に分解されるかもしれない。それらはエナメル蛋白あるいはその断片、歯髓組織のある蛋白質かもしれない。Schwabe¹¹⁾等は成熟ウシ歯髓からカタプシンを検出してその生理的基質として歯髓のコラーゲンをあげているがその証明は非常に間接的で根拠に乏しい。著者は兎の皮から精製した可溶性コラーゲンを基質とし、部分的に精製した酵素を用いて本酵素のコラーゲン分解能について目下検討中である。しかし、これらの問題が解明されるためには多くの研究がなされなければならないだろう。

エナメル器および歯乳頭から調製した粗酵素の酸変性ヘモグロ빈に対するミカエリス恒数は前者が0.9%, 後者が0.84%でほとんど等しかつた。ミカエリス恒数が等しいことはそれらの酵素が同一である可能性を示唆するものである。カタプシンの K_m を酸変性ヘモグロ빈基質で求めた報告は他にないが、Lapresle¹²⁾等は兎の脾臓から得たカタプシンの粗酵素と精製酵素(カタプシンD)についてヒト血清アルブミンを基質として K_m を求めたところ、粗酵素では0.423%, 精製酵素では0.404%であつた。又 Riekkinen¹³⁾等がラットの顎下腺から得たアルカリプロテアーゼ(salivain と呼ばれる)では、ヒトヘモグロ빈基質で K_m は0.42%であつた。

本酵素は熱に非常に不安定である。60°C 15分の熱処理によつて完全に失活する点は他の組織から抽出したカタプシンDについての多くの報告とほぼ一致している。失活温度が低いと見かけの至適温度も低く、1時間インキュベーションの結果で判定すると40°Cであつた。活性化エネルギーは13,000 cal/Molであつたが、一般に蛋白分解酵素の活性化エネルギーは10,000 cal/Mol から16,000 cal/Molといわれており¹⁴⁾、本酵素のそれもその中間に位していることがわかつた。本酵素

の安定 pH と至適 pH は一致しており、pH 2 以下での失活はおそらく酵素が酸によつて変性したためであろうと考えられる。粗酵素液のみのインキュベーション(自己融解)による酵素活性の見かけの増加は認められず、その点 Schwabe¹⁵⁾等の結果と相違した。カタプシンのBとCはSH 酵素であるが、本酵素はシステインで賦活されず、pCMB, モノヨード酢酸で阻害されないでSH 酵素ではない。又 EDTA でも阻害されず金属イオン依存性の酵素でもないらしい。

さてエナメル器および歯乳頭から調製した粗酵素についてこれまで一応別々に考えてきたが、前述の如くミカエリス恒数が等しいこと、至適 pH, 熱および pH 安定性、活性化剤および阻害剤に対する態度がそれぞれ等しいことから両組織の酵素は本質的に同一であろうと考えられる。

そこでこの酵素が前報で討論したカタプシンのどのタイプに属するかを考えてみたい。本報告および前報告の結果から本酵素の性質を簡条書きにすると、

- i) 酸変性ヘモグロ빈基質で至適 pH 3.0.
- ii) SH 酵素ではない。

iii) 熱安定性が低い—60°C, 30分で完全に失活。これらの性質から本酵素はカタプシンDに最も近いものといえよう。なお、カタプシンDはカタプシン A, B, C が作用する合成基質に作用しないことが知られており、これはカタプシンDを他と区別する特徴の1つになっている¹⁰⁾。これら合成基質(Cbz-L-Glu-L-Tyr, Bz-L-Arg-O-Et, Gly-L-Phe-NH₂)に対する作用について部分的に精製した酵素を用いて目下検討中である。

カタプシンDは多くの組織に見い出されており¹⁶⁾、最近 Iodice¹⁷⁾は兎筋肉からカタプシンのAと共にかなり高純度に分離精製し、両酵素活性の組織内での相乗作用について報告している。すなわちカタプシンDは endopeptidase であり、カタプシンAは exopeptidase である¹⁸⁾から基質蛋白分子を先づカタプシンDがおおまかに切断した後カタプシンAがさらに末端から切つて行くと考えている。エナメル器や歯乳頭での蛋白分解活性も

これまで主なる活性部分すなわちカテプシンDの活性としてみてきたが、他のタイプのカテプシンも少量存在していてそれらと協力的に作用しているという可能性も考えられるが、これらについては今後検討してみたい。

総 括

エナメル器（歯小嚢を含む）および歯乳頭から調製した粗酵素を用いてその酵素化学的な基礎的性質を検討した。基質分解量は反応時間、酵素量に対して直線的に増加した。反応速度基質濃度曲線は基質が高濃度でも最大速度に達することなく、酵素は基質に完全に飽和され得なかつた。両組織からの粗酵素についてミカエリス恒数を Hofstee プロットで求めたところエナメル器では 0.9 %、歯乳頭では 0.84 % であつた。pH 安定性は 2 から 4 で最も良くほぼ至適 pH と一致していることがわかつた。又みかけ上の至適温度は 40°C、30°C から 40°C の間での温度係数は 2.0 であり、活性化エネルギーは 13,000 cal/Mol であつた。両組織の酵素はそれらのミカエリス恒数が等しいこと、至適 pH、熱および pH 安定性、活性化剤および阻害剤に対する態度が等しいことから本質的に同一酵素であろうと考えられた。本粗酵素の本体は酸変性ヘモグロビン基質で至適 pH 3.0、熱に不安定なこと (60°C, 15 分で完全に失活)、SH 酵素ではないことからカテプシンDと結論し、カテプシンの生理的意義に関する最近の研究と考え方を紹介し併せて討論した。

本論文の要旨は第 39 回日本生化学会、第 8 回歯科基礎医学会において発表した。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲下さいました佐々木哲教授に心から感謝いたします。また終始御理解、御支援をいただきました東北大学歯学部、荒谷真平教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 坂本征三郎：ウシ歯胚の蛋白分解酵素に関する研究, I. 活性検出とその諸条件について, 口病誌, 34 : 81, 1967.
- 2) Hofstee, B. H. J. : On the evaluation of the constants V_m and K_m in enzyme reactions.

- Science, 116 : 329, 1952.
- 3) de Duve, C. : The lysosome concept. *Lysosomes* ed. by de Reuck, A. V. S. and Cameron, M. P., London, 1963, Churchill, p.1.
- 4) Fruton, J. S. : Cathepsins. *The Enzymes* ed. by Boyer, P. D., Larday, H. and Myrbäck, K. New York, 1960, Academic Press, 4 : p. 233.
- 5) Wurz, H., Tanaka, A. and Fruton, J. S. : Polymerization of dipeptide amides by cathepsin C. *Biochemistry*, 1 : 19, 1962.
- 6) Harkness, R. D. and Moralee, B. E. : The time-course and route of loss of collagen from the rat's uterus during post-partum involution. *J. physiol.* 132 : 502, 1956.
- 7) Woessner, J. F. Jr. : Uterine involution and collagen breakdown. *Structure and function of connective and skeletal tissue*. ed. by Jackson, S. F., Harkness, R. D. Partridge, S. M. and Tristram, G. R. London, 1965, Butterworths, p. 442.
- 8) Rous, P. : The relative reaction within living mammalian tissues. *J. exp. Med.* 41 : 399, 1925.
- 9) Katchalski, E. : Effect of microenvironment on the mode of action of enzymes. 第 7 回国際生化学会講演, Symp. III-1, 2, 東京, 1967.
- 10) Press, E. M., Porter, R. R. and Cebra, J. : The isolation and properties of a proteolytic enzyme, Cathepsin D, from bovine spleen. *Biochem. J.*, 74 : 501, 1960.
- 11) Schwabe, Chr. and Kalnitsky, G. : Proteolytic activity in bovine dental pulp. *Arch. Biochem. Biophys.* 109 : 68, 1965.
- 12) Lapresle, C. and Webb, T. : Study of a proteolytic enzyme from rabbit spleen. *Biochem. J.* 76 : 538, 1960.
- 13) Riekkinen, P. J., Ekfors, T. O. and Hopsu, V. K. : Purification and characteristics of an alkaline protease from rat-submandibular gland. *Biochim. Biophys. Acta.* 118 : 604, 1966.
- 14) Sizer, I. W. : Effects of temperature on enzyme kinetics. *Advan. Enzymol.* 3 : 35, 1943.
- 15) Schwabe, Chr. and Kalnitsky, G. : A peptidohydrolase from mammalian fibroblasts (bovine dental pulp). *Biochemistry*, 5 : 158, 1966.
- 16) 高見徹：酵素ハンドブック, 東京, 昭和 41, 朝倉書店, 529 頁.
- 17) Iodice, A. A., Leong, V. and Weinstock, I. M. : Separation of Cathepsin A and D of skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 117 : 477, 1966.
- 18) Iodice, A. A. : Purification, properties and specificity of catheptic carboxypeptidase A (Cathepsin A). 第 7 回国際生化学会講演, F-194, 東京, 1967.