[農化 第40巻, 第4号, p. 185~189, 1966]

ハス種子蛋白質分解酵素に関する研究 (第1報)

プロテアーゼ活性の検出と酵素の部分精製

信濃 栄, 島田洋子, 田村五郎 (千葉大学園芸学部農芸化学科)

昭和40年10月5日受理

Studies on Protease in Lotus-seed

Part I. Detection of Protease in Crude Extract of Lotus-seed and Partial Purification of the Enzyme

By Sakae SHINANO, Yôko SHIMADA and Goro TAMURA

Department of Agricultural Chemistry, Faculty
of Horticulture, Chiba University

As the preliminary experiment, detection of protease in lotus-seed (*Nelumbo nucifera* Gaertn) was carried out, and the crude protease preparation was obtained by fractionation with ammonium sulphate, acid and calcium phosphate gel treatment, and some fundamental properties of the enzyme were investigated. (1) The pH optimum on casein and lotus-seed protein and on bovine blood haemoglobin as substrate was 2.5 and 3.5, respectively. (2) The enzyme was so thermolabile that its activity decreased to 17% and 10% of original enzyme activity for 10 min. and 30 min. at 50°C and to 11% and 8% for 10 min. and 30 min. at 60°C, respectively. (6) Further purification of the enzyme was carried out by elution chromatography on a CM-cellulose column and by gel filtration using Sephadex G-100. (4) The enzyme preparation thus obtained was purified 278-fold (yield, 27%), but it was still non-homogeneous.

(Received October 5, 1965)

緒 言

ハス (*Nelumbo nucifera* Gaertn) 種子は植物種子の中で最も長命 (1,000~2,000 年) であることが W. F. Libby の放射性 C^{14} を測定しての実験⁽¹⁾, 大賀の古代ハス種子の開花実験^(2,3) で知られている。ハスはわが国では一般に, 地下茎 (蓮根) を食用とするにすぎないが, 東南アジア, 中国ではこの種子を食用とし, 古来, 中華料理の材料として用いられている。従来, 植物種子中のプロテアーゼそのものの酵素化学的研究は少なく, わずかに落花生種子中の Arachain⁽⁴⁾, 大豆種子中の Soyin⁽⁵⁾, および小豆種子プロテアーゼに関する阿久根, 高木⁽⁶⁾ の研究がその代表的なものとしてあげられるにすぎない。そこで著者らは, 前記ハス種子の特性に着目して, ハス種子プロテアーゼの精製を行ない, 純粹単一酵素蛋白としての酵素化学的な特性を明らかにする目的で研究を開始した。まず, ハス種子浸出液中に acid protease⁽⁷⁾ に属するプロテアーゼの存在を検出し, 部分精製を行ない,

比活性において 278 倍に精製したので報告する。

実験材料ならびに方法

材料 ビルマ産ハス種子を蓮子と称し, 中華料理の材料として, わが国に輸入されているものを用いた。品種, 支那種。種皮および幼芽には色素, 粘質物が含まれ, これらがプロテアーゼ活性測定, 精製に阻害作用をおよぼすことを認めたので, これらを除いた子葉部を粉末とし供試料とした。

方法 (1) 粗酵素の調製: 前記種子粉末の 1M NaCl (pH 7.0, 10mM リン酸緩衝液) 抽出液を純水に対して透析後, 透析内液を硫酸分画し, その 0.2~0.5 飽和画分の沈でんをとり, 純水に対して透析, 透析チューブ中の不溶物を遠心分離して除き, その上澄液を凍結乾燥し, 得られた粉末を粗酵素 I とした。一方, この上澄液を HCl にて pH 4 とし, 生成せる沈でんを除去し (この沈でんは操作過程中最も多量に得られるハス種子蛋白質であったのでこれを P_I とし, ハスプロテアーゼ

の基質として用いてみた), 上澄液を純水に対して透析し, 透析チューブ中の不溶物を遠心分離し, この上澄液をリン酸カルシウムゲルに吸着させ, pH 8.0, 50 mM リン酸緩衝液で溶出, 溶出液を凍結乾燥し, 得られた粉末を粗酵素IIとした。

(2) 酵素活性の測定: Folin-Ciocalteu⁽⁸⁾ のフェノール試薬による比色法によった。蛋白濃度の測定には O. H. Lowry の銅-Folin 法⁽⁹⁾ を用いた。基質としてはカゼイン (Merck 社製, Hammersten), 牛血ヘモグロビン (酵素, Chemical Corporation) およびハス種子蛋白質 (P_I) を用いた。操作は特に説明しない限り, つぎの方法に従って行なった。2% 基質溶液 (pH 2.4, HCl にて調製) 1 ml に酵素溶液 1 ml (20 mM KCl-HCl 緩衝液, pH 2.4 に粗酵素粉末を溶解したもの) を加え, 反応液とした。このとき最終 pH は 2.5 となったが, この pH は本酵素のこの測定条件下における反応最適 pH であった。これを 40° 恒温槽中で 1 時間反応せしめた後, 0.4 M トリクロル酢酸 2 ml を加えて反応を停止せしめ, 20 分間放置後濾過し, その濾液 2 ml をとり Anson 法の萩原変法⁽¹⁰⁾ により発色せしめ, エルマ光電光度計を用いて 660 mμ における吸光度を測定し, 別にトリクロル酢酸を反応前に加えた場合のブランク値との差をもって酵素活性とした。

実験結果ならびに考察

実験 I. プロテアーゼ活性の検出

(a) 酵素活性と反応時間との関係: まずカゼインを基質とし粗酵素 I を用いて, 反応時間 0~180 分の範囲で酵素活性を測定した (第 1 図)。反応時間 2 時間以内では酵素活性は反応時間に比例して増加した。同様の関係がハス種子蛋白質 (P_I) に粗酵素 II が作用する場合にも得られた。

(b) 酵素量と活性との関係: 基質カゼイン (2% 溶液) 1 ml に対し粗酵素 I を 60~300 r (蛋白濃度として) の範囲に 1 ml 溶液として作用せしめ, その酵素活性を測定した (第 2 図)。また, 基質ハス種子蛋白質 (P_I) 2% 溶液 1 ml に対し, 粗酵素 II を 15~75 r の範囲に 1 ml 溶液として作用せしめ, その酵素活性を測定した (第 3 図)。カゼインに対しては 180 r まで, ハス種子蛋白質に対しては 75 r までは, 活性は酵素量に比例した。

(c) 酵素活性に対する pH の影響: 反応液の pH

第 1 図 酵素活性と反応時間との関係 (基質: カゼイン)

供試酵素液: 粗酵素 I, 蛋白濃度 130 γ/ml.

反応温度: 40°, pH 2.5.

第 2 図 蛋白量と活性との関係

基質: 2% カゼイン溶液 (pH 2.4, HCl にて調製) 1 ml.

供試酵素液: 粗酵素 I を 20 mM KCl-HCl 緩衝液 (pH 2.4) に溶解した液 1 ml.

反応時間: 1 時間. 反応温度: 40°, pH 2.5.

第 3 図 蛋白量と活性との関係

基質: ハス種子蛋白質 (P_I) の 2% 溶液 (pH 2.4, HCl にて調製) 1 ml.

供試酵素液: 粗酵素 II を 20 mM KCl-HCl 緩衝液 (pH 2.4) に溶解した液 1 ml.

反応時間: 1 時間. 反応温度: 40°, pH 2.5.

第 4 図 pH と酵素活性との関係 (基質: カゼイン)

供試酵素液: 粗酵素 I, 蛋白濃度 123 γ/ml.

反応時間: 90 分. 反応温度: 40°.

第 6 図 pH と酵素活性との関係

(基質: ハス種子蛋白質 P_I)

供試酵素液: 粗酵素 II, 蛋白濃度 260 γ/ml.

反応時間: 90 分. 反応温度: 40°.

第 5 図 pH と酵素活性との関係 (基質: ヘモグロビン)

供試酵素液: 粗酵素 I, 蛋白濃度 70 γ/ml.

反応時間: 90 分. 反応温度: 40°.

第 7 図 温度と安定度との関係 (基質: カゼイン)

供試酵素液: 粗酵素 I, 蛋白濃度 100 γ/ml.

○—○ 50° 処理 ○—○ 60° 処理

1.5~4.5 (20 mM KCl-HCl 緩衝液にて調製) の範囲において酵素活性を測定した (第 4, 5, 6 図). その結果粗酵素 I を用いてカゼインおよびヘモグロビンを基質とした場合の反応最適 pH は, それぞれ 2.5 および 3.5, また粗酵素 II をハス種子蛋白質 (P_I) に作用させた場合の反応最適 pH は 2.5 であった.

(d) 熱に対する安定性: 粗酵素粉末 I を 20 mM KCl-HCl 緩衝液 (pH 2.4) にとかし (1 ml 中 100 r), 50° および 60° に, それぞれ 10 分, 20 分, 30 分処理したのち, カゼインを基質としてその相対活性比を求めた (第 7 図). その結果, 50°, 10 分処理で, すでに原酵素活性の 17%, 30 分後には 10% に低下した. 60° 処理では 10 分後に 11%, 30 分後には 8% になった. これにより, ハスプロテアーゼは比較的耐熱性の低いものと思われる.

実験 II. 酵素の精製

以上の実験により, ハス種子中にプロテアーゼの存在

第 1 表 ハス種子プロテアーゼの精製

を確認し, その性質の一端を知り得たので, さらに精製度を高め, その酵素化学的特性を明かにするために精製法を検討し, その経過を第 1 表に示す. なお精製実験は 5° 以下の低温室内で行なった. 粗酵素調製の際の経験をもとに, ハス種子粉末 (3 kg) の 1 M NaCl (pH 7.2, 10 mM リン酸緩衝液) の抽出液より 0.7 硫安飽和により生ずる沈でんを少量の純水に溶解し, これを pH 7.2, 2 mM リン酸緩衝液に対して透析し, 透析チューブ内の不溶物を遠心分離し, その上澄液より硫安 0.5 飽和の沈でんを得た. この沈でんを少量の純水に溶解し, pH 7.2, 2 mM リン酸緩衝液に対して透析し, 透析チューブ内の液を遠心分離し, その上澄液を HCl にて pH 4 とし,

生成せる沈でんを除去し, 上澄液を同様の緩衝液に対して透析し, 透析チューブ内の液を遠心分離し, 得た上澄液を CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにより精製した. 被吸着蛋白質の溶出には pH 7.2 リン酸緩衝液の濃度を 2 mM より順次 5 mM, 50 mM, 100 mM, 300 mM と増加して溶出した. その結果を第 8 図に示す. この場合, 蛋白回収率はわるく, 未溶出の蛋白質が相当量残ったが, 5 mM リン酸緩衝液溶出フラクションには酵素活性を顕著に示し, 一方, 他の溶出フラクションにはほとんど酵素活性は認められなかった. そこで 5 mM フラクションを集め, 硫安による濃縮を行ない, さらにセファデックス G-100 によるゲル濾過を行なった (第 9 図). その結果, 溶出液量 50~200 ml の間のフラクションに酵素活性を認めたので, この部分を硫安により濃縮した. 以上の方法により得られた精製の過程を要約して第 2 表に示す. これによれば, CM-セルロースカラムクロマトグラフィーの段階において精製倍率が, 比活性で約 7 倍に, セファデックス G-100 ゲル濾過によってさらに 4 倍に上昇している.

ここに得た酵素は精製倍率 278 倍, 収量 27% であった. なお, CM-セルロースカラムクロマトグラフィーの結果, 収量が増加しているのは, 酵素阻害作用をもつ蛋白質が除去されたものとも考えられる. しかし CM-セルロースカラムクロマトグラフィーの結果については未溶出の蛋白質が相当あったことから, その溶出条件について今後さらに検討する余地があるものと思われる.

以上, 現在までに得られたハス種子プロテアーゼについてはまだ均一純粋の酵素蛋白質とは認め難く, なお, さらに精製方法について研究中である.

要 約

ハス (*Nelumbo nucifera* Gaertn) 種子中のプロテアーゼ活性の検出を目的として, 種子の NaCl 抽出液より

第 2 表 精 製 の 過 程

	総活度 (660mμ)	総蛋白 (mg)	比活度	精製 倍率	収量 (%)
原 液	3252.2	707000	0.0046	1	100
硫安飽和 0~0.7	2737.5	365000	0.0075	1.7	84
硫安飽和 0~0.5	2130.5	150000	0.0142	3.1	66
pH 4 (HCl にて調製)	1238.4	28800	0.043	9.5	38
CM-Cell クロマト グラフィー	1676.2	5460	0.307	66.7	51
Sephadex G-100 ゲル濾過	886.6	682	1.30	278.2	27

硫酸分画, 酸処理, リン酸カルシウムゲル吸着により粗酵素を得て, 二, 三の性質を調べた。

(1) 酵反性と素活応時間の関係, および蛋白量と活性との関係を調べた。

(2) 基質にカゼイン, ハス種子蛋白質を用いた場合の反応最適 pH は 2.5, ヘモグロビンを用いた場合は 3.5 であった。

(3) 熱に比較的弱く, 50°, 10 分処理ですでにその活性は原酵素活性の 17% に, 30 分後には 10% に低下した。60°では 10 分後に 11%, 30 分後には 8% になった。

つぎに, さらに酵素の精製方法を検討し, CM-セルロースカラムクロマトグラフィー, セファデックス G-100 ゲル濾過を行ない精製を進めた。その結果, 精製倍率 278 倍 (収量 27%) の酵素を得たが, まだなお純粋均一酵素蛋白質とは認め難かった。

本報告の要旨は, 昭和 38 年 10 月, 農芸化学会関東支部大会で発表した。

また, 研究費の一部は文部省科学研究費によった。謝意を表します。

- (1) W. F. Libby : *Science*, **114**, 291 (1951).
- (2) 大賀一郎 : 植物及動物, **4**, 1505 (1936).
- (3) 大賀一郎 : 採集と飼育, **13**, 206 (1951).
- (4) G. W. Irving Jr., T. D. Fontaine : *Arch. Biochem.*, **6**, 351 (1945).
- (5) H. Tauber : "The Chemistry and Technology of Enzymes", John Wiley & Sons, New York, 1949, p. 172.
- (6) 阿久根 了, 高木茂明 : 本誌, **34**, 352 (1960); 高木茂明 : 本誌, **34**, 357, 926, 929 (1960); S. Akune, S. Takagi : *Agr. Biol. Chem.*, **26**,

第 8 図 CM-セルロースカラムクロマトグラフィー

溶出液: 各種濃度の pH 7.2 リン酸緩衝液。

カラム: 長さ 30 cm, 径 3.5 cm.

— 蛋白濃度 酵素活性

第 9 図 セファデックス G-100 によるゲル濾過

溶出液: 5 mM, pH 7.2 リン酸緩衝液。

カラム: 長さ 30 cm, 径 3.5 cm.

— 蛋白濃度 酵素活性

- 63 (1962).
- (7) B. S. Hartley : *Ann. Rev. Biochem.*, **29**, 45 (1960).
- (8) O. Folin, V. Ciocalteu : *J. Biol. Chem.*, **73**, 627 (1927).
- (9) O. H. Lowry et al. : *ibid.*, **193**, 265 (1951).
- (10) 江上不二夫ら編 : 標準生化学実験, 文光堂, p. 207 (昭 28).