ブタ精巢ヒアルロニダーゼの部分精製とその酵素性質

伊東 晃,^{*,a} 玉木純子,^a 石原好博,^b 野中道夫,^b 森 陽^a
東京薬科大学・第一生化学教室,^a 大洋漁業株式会社・大洋研究所^b

Partial Purification and Characterization of Hyaluronidase from Pig Testis

AKIRA ITO,^{*,a} JUNKO TAMAKI,^a YOSHIHIRO ISHIHARA,^b
MICHIO NONAKA,^b and YO MORI^a

Department of Biochemistry, Tokyo College of Pharmacy,^a Horinouchi,
Hachioji, Tokyo, 192-03, Japan and Taiyo Central R & D Institute,
Taiyo Fishery Co., Ltd.,^b Tsukishima, Chuo-ku, Tokyo, 104, Japan

(Received August 6, 1984)

Hyaluronidase (HAase) [EC 3.2.1.36] was partially purified about 500-fold from pig testis by gel filtration on Sephadex G-100 and ion-exchange chromatographies on CM-52 and DE-52 cellulose. The partially purified HAase hydrolyzed both hyaluronic acid and chondroitin 4-sulfate in the optimal pH range from 5.0 to 5.2, but the enzyme did not have chondro-4- and -6-sulfatase activities.

For the maximal hydrolysis of hyaluronic acid, the enzyme required the presence of NaCl in the reaction system, whereas high concentration of the salt inhibited significantly the enzyme. Although partially purified HAase was eluted in a single peak corresponding to mol. wt of 61 K from the column of Sephadex G-100, the enzyme was separated into several moieties with different isoelectric points (about 8, 6.9, 6.7, 6.5 and less than 6.5) by the chromatofocusing, indicating the presence of isoenzymes of HAase.

Keywords—pig testis; hyaluronidase; *N*-acetylglucosaminidase; hyaluronic acid; chondroitin sulfate

ヒアルロニダーゼ (HAase) [EC 3.2.1.36] は広く各種動物の肝臓, 腎臓, 肺, 精巣及びヒト関節液¹⁾ などに分布することが知られている. なかでもラット肝臓^{2,3)} やウシ精巣⁴⁻⁷⁾ HAase は精製法が確立されており, その酵素性質も明らかにされている. しかしブタ HAase に関しては今日まで精液抽出液にその活性の存在が報告されているのみである.⁸⁾

一方 HAase は基質としてヒアルロン酸 (HA) のみならずコンドロイチン 4- 及び 6-硫酸 (Ch-4S, Ch-6S) も加水分解することが広く知られている. しかしコンドロイチン硫酸を基質とした場合に生成物の硫酸基をも離脱するか否かは不明である. 著者等は以上のごとく現在まで知見のほとんど無いブタ精巣 HAase について部分精製を試みるとともにその諸酵素性質について検討を加えたので報告する.

実験材料及び方法

試薬 実験に使用した試薬は下記製品をそれぞれ購入した: Sephadex G-100, polybuffer 交換体, Polybuffer 96 は Pharmacia 社製, CM-52 及び DE-52 cellulose は Whatman 社製, *p*-nitrophenyl-2-acetamide-2-deoxyglucopyranoside は BDH Chemical 社製, chondroitinase ABC [EC 4.2.2.5], 4Di-0S (2-acetamide-2-deoxy-3-*O*-(β-D-glucopyranosyluronic acid)-D-galactose), 4Di-4S (2-acetamide-2-deoxy-3-*O*-(β-D-glucopyranosyluronic acid)-4-*O*-sulfo-D-galactose), 4Di-6S (2-acetamide-2-deoxy-3-*O*-(β-D-glucopyranosyluronic acid)-6-*O*-sulfo-D-galactose), ヒアルロン酸 (ブタ皮膚), コンドロイチン 4-硫酸・Na (SSG, super special grade), コンドロイチン 6-硫酸・Na (SSG) は生化学工業社製, ウシ血清アルブミン (純品) 及び卵白アルブミン (4回結晶化) は ICN Pharmaceutical 社製, α-キモトリプシンノーゲン (ウシ膵臓, type II) は Sigma 社製, 標準 HAase (U.S.P.) は P・L. Biochemical 社製, その他の試薬はすべて特級を使用した.

ブタ精巢 ブタ睾丸は屠殺後、直ちに摘出し血液等を十分洗浄除去した後、実験に供するまで -80°C で凍結保存した。

HAase の活性測定 HA の $0.1\text{ M Na} \cdot \text{酢酸緩衝液}/0.15\text{ M NaCl}$ ($\text{pH } 5.0$) 溶液 (1 mg/ml) 0.2 ml に 0.05 ml の酵素液を加え 37°C にて 20 min またはそれ以上インキュベートした。反応終了後 0.1 ml の 0.5 M NaOH を添加し中和しさらに生じた末端 *N*-アセチルヘキソサミンを Reissig らの方法⁹⁾ で定量した。HAase 活性 1 unit は本条件下 1 min に $1\text{ }\mu\text{mol}$ の *N*-アセチルヘキソサミン相当量の還元末端を生成する酵素量とした。また本活性 1 munit は $15\text{ N.F.S. (National Formulary Standard)}$ 単位に相当する。

***N*-アセチルグルコサミニダーゼの活性測定** $0.1\text{ M Na} \cdot \text{酢酸緩衝液}/0.15\text{ M NaCl}$ ($\text{pH } 5.0$) に溶解した $1\text{ mm } p\text{-nitrophenyl-2-acetamide-2-deoxyglucopyranoside}$ 0.5 ml に等量の酵素液を加え 37°C で 5 min インキュベート後、 2.0 ml の 0.25 M NaOH を添加し反応を停止した。遊離した *p*-nitrophenol は 410 nm における吸光度より比色定量した。

タンパク質の定量 280 nm における吸光度を測定し、さらに $A_{280\text{ nm}}^{1\%} = 10.0$ としてタンパク量を算出した。

スルファターゼ活性の確認¹⁰⁾ Ch-4S または Ch-6S を $50\text{ mM Na} \cdot \text{酢酸緩衝液}/0.15\text{ M NaCl}$ ($\text{pH } 5.0$) に 2 mg/ml 濃度で溶解しその 1.0 ml に 0.25 ml の HAase を加え 37°C で 48 h 反応後、沸とう水浴中に反応液を 5 min 放置し HAase を失活させた後、 0.5 M NaOH で pH を約 6 に調整した。この液 $200\text{ }\mu\text{l}$ に $50\text{ }\mu\text{l}$ の 25 mM トリス/ 180 mM 酢酸 $\text{Na}/0.05\%$ ウシ血清アルブミン ($\text{pH } 8.0$) 及び 0.4 unit の chondroitinase ABC ($50\text{ }\mu\text{l}$) を添加し 37°C にて 1 h さらに本酵素溶液 $50\text{ }\mu\text{l}$ を追加し同様に 1 h インキュベートした。この反応液を凍結乾燥し $50\text{ }\mu\text{l}$ の蒸留水に再溶解後その全量を東洋汙紙 No. 51 にスポットした。脱塩溶媒 (*n*-BuOH : EtOH : $\text{H}_2\text{O} = 52 : 32 : 16\text{ v/v}$) で 48 h 下降法にて脱塩後、展開溶媒 (*n*-BuOH : AcOH : $1\text{ N NaOH} = 2 : 3 : 1\text{ v/v}$) を用いて下降法にて 50 h 展開した。風乾後紫外吸収 (UV) ランプ下で $\Delta\text{Di-OS}$ のスポットの有無よりスルファターゼ活性の有無を確認した。

実験結果

HAase の部分精製

ブタ精巢 250 g に 250 ml の 0.5 M 酢酸を加え VirTis 45 ホモジナイザーにて 30 s , 2 回ホモジナイズした。ホモジネートは 4°C にて 1 晩攪拌しながら放置した。その後 4°C で遠心分離 ($20000 \times g$, 20 min) を行い、上清に固体硫酸を 30% 飽和まで徐々に添加しそのまま放置した。 2 h 後同様に遠心し、上清に 65% 飽和になるまで硫酸を添加し 4°C にて 1 晩放置した。生じた沈殿物を遠心分離にて集め約 20 ml の蒸留水にて溶解後、蒸留水に対し透析しさらに凍結乾燥した。凍結乾燥物を 10 ml の 20 mM リン酸 $\text{Na} \cdot \text{K}$ 緩衝液/ 0.15 M NaCl ($\text{pH } 6.0$) に溶解し前もって同緩衝液で平衡化した Sephadex G-100 カラムにてゲル濾過を実施した。HAase は Fig. 1 に示すように one peak として溶出され *N*-アセチルグルコサミニダーゼの peak とは区別されるが一部重複した。活性画分 (No. 58—68, 53 ml) を $25\text{ mM Na} \cdot \text{酢酸緩衝液}$ ($\text{pH } 5.0$) に透析後、同緩衝液で平衡化した CM-52 cellulose カラムにアプライした。本条件下で HAase は CM-52 に比較的強く吸着した。NaCl を用いた linear gradient 法 ($0-0.35\text{ M}$) により HAase を溶出させると Fig. 2 に示すように活性の無い数個のタンパク peak とは完全に分離して NaCl 濃度 0.2 M 付近で溶出された。また本法により *exo*-glycosidase である *N*-アセチルグルコサミニダーゼとも HAase は完全に分離された。活性画分 (No. 92—104, 62 ml) を PM-30 メンブラン (アミコン社製) を用いて濃縮し、 25 mM リン酸 $\text{Na} \cdot \text{K}$ 緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) に対し透析した。透析終了液 (8 ml) を DE-52 cellulose を用いてさらに精製した。Fig. 3 に示すように HAase は、本担体に未吸着ではあるが活性を有さず本担体に吸着する夾雑タンパク質との分離が可能であっ

Fig. 1. Elution Profile of Hyaluronidase on Sephadex G-100

The enzyme preparation (8 ml) was chromatographed on a column ($3.6 \times 85\text{ cm}$) of Sephadex G-100 previously equilibrated with 20 mM phosphate buffer/ 0.15 M NaCl ($\text{pH } 6.0$), and eluted with the same buffer at a flow rate of 30 ml/h . (○), absorbance at 280 nm ; (△), hyaluronidase; (●), *N*-acetylglucosaminidase.

Fig. 2. Ion-exchange Chromatography of Hyaluronidase from Sephadex G-100 on CM-52 Cellulose

The dialysate (53 ml) was applied to a column (1.6×20 cm) of CM-52 cellulose previously equilibrated with 25 mM acetate buffer (pH 5.4) at a flow rate of 20 ml/h. The elution was carried out by a linear gradient of 0—0.35 M NaCl in 400 ml of the same buffer. (○), absorbance at 280 nm; (△), hyaluronidase; (●), N-acetylglucosaminidase; —, NaCl concentration.

た. 本標品について pH 4.8 におけるポリアクリルアミド disc 電気泳動を実施したところ数本のタンパクバンドを確認した (結果未提示). 以上の部分精製法について概略を Table I に示す. 比活性の上昇度約 500 倍, 活性回収率約 10% であった. この部分精製 HAase を用いて以下の実験を実施した.

HAase の至適 pH

HA を基質とした場合, ブタ HAase は Fig. 4 に示すように pH 5—5.2 付近で最大活性を示した. また Ch-4S を基質とした場合も同様であった.

Michaelis 定数 (K_m)

HA に対するブタ精製 HAase の K_m 値を Lineweaver-Burk プロットにより算出したところ 0.8 mg/ml であった.

試薬の影響

Table II に示すようにブタ精製 HAase は 3 価の鉄イオンで阻害された, しかし 2 価の鉄イオンでは阻害されなかった. この性質は, ウシ精製 HAase¹⁾ と同様であった. その他金属キレーターやアミノ基修飾試薬に対しても安定であった. また NaCl の酵素活性への影響について Fig. 5 に示す. HAase はその活性発現に NaCl を必要とし, 最大活性を示すには 0.3—0.6 M 濃度が要求されたが, しかしこれ以上では, NaCl は HAase を阻害した.

HAase の分子量及び等電点

DE-52 終了 HAase について Sephadex G-100 を用いて Whitaker¹¹⁾ の方法により分子量を算出した. Void volume を blue dextran 2000 で測定後, 分子量測定用の標準タンパクとしてウシ血清アルブミン (mol. wt 69

Fig. 3. Elution Profile of Hyaluronidase from DE-52 Cellulose

The enzyme preparation (8 ml) concentrated with PM-30 membrane and dialyzed against 25 mM phosphate buffer (pH 7.0) was chromatographed on a column (1.6×10 cm) of DE-52 cellulose previously equilibrated with the buffer at a flow rate of 10 ml/h. The elution was first done by the same buffer, and then by 25 mM acetate buffer/0.2 M NaCl (pH 5.4). Prior to the assay for hyaluronidase, an aliquot of each fraction was incubated with 0.15 M NaCl and then the enzyme activity was estimated as described in the text. (○), absorbance at 280 nm; (△), hyaluronidase.

TABLE I. Purification of Hyaluronidase from Pig Testis

Step	Total activity (units)	Total protein (mg) ^{a)}	Specific activity (munit ^{b)} /mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
Crude extract	8.6	7630	1.1	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.9	1235	4.0	4	57
Lyophilization	9.2	1150	8.0	7	107
Sephadex G-100	4.1	347	11.8	11	48
CM-52 cellulose	1.1	2.8	392.8	357	13
DE-52 cellulose	0.7	1.2	583.3	530	8

Data for a typical purification are shown. The values given are those of a single preparation from 250 g of the tissue.

a) Protein was measured by A_{280} , and $A_{280}^{1\%}$ is calculated as 10.0. b) 1 munit corresponds to 15 N.F.S. unit.

Fig. 4. Effect of pH on the Reaction Rate of Hyaluronidase

The partially purified enzyme (4 munits) was incubated with hyaluronic acid (○) for 20 min and chondroitin 4-sulfate (●) for 2 h, respectively. The reaction rate for hyaluronic acid was done as described in the text. The hydrolysis of chondroitin 4-sulfate was measured by the increase in the absorbance at 235 nm, and the relative activity of 100% was corresponding to absorbance of 0.3. The buffer used was 50 mM phosphate-citrate buffer. (○), hyaluronic acid; (●), chondroitin 4-sulfate.

TABLE II. Effect of Reagent on Hyaluronidase

Reagent	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	—	100
EDTA · 2Na	10	128
FeSO ₄	10	120
FeCl ₃	10	0
Monoiodoacetic acid	10	100
N-Ethylmaleimide	10	105
D-Saccharic acid	10	90

Partially purified hyaluronidase (5 munits) was incubated with a reagent in a total volume of 2 ml of 50 mM acetate buffer-0.15 M NaCl (pH 5.2) at 37°C for 30 min, and then the enzyme activity was determined as described in the text.

K), 卵白アルブミン (mol. wt 45 K) 及び α -キモトリプシンノーゲン (mol. wt 25 K) を溶出させた。このときの V_e/V_0 はそれぞれ 1.35, 1.55, 及び 1.80 であり, HAase のそれは 1.40 であった。この結果から算出した HAase の分子量は 62 K であった。

Fig. 5. Effect of NaCl on the Reaction Rate of Hyaluronidase

After dialysis of purified hyaluronidase against 50 mM acetate buffer (pH 5.2), the enzyme (3 munits) was incubated with the indicated concentration of NaCl in the standard enzyme assay system.

Fig. 6. Chromatofocusing of Partially Purified Pig Hyaluronidase

The pooled effluent from the CM-52 cellulose (3.8 ml) was chromatographed on a PBE 96 column (0.9 × 15 cm) previously equilibrated with 25 mM Tris-acetic acid (pH 8.3). Polybuffer 96-acetic acid (pH 6.0) was used for elution to form the linear pH gradient. (○), absorbance at 280 nm; (●), hyaluronidase; (△), pH of effluent.

以上のようにゲル濾過では単一の分子量を有するとみなせる HAase について pH 6—8 の chromatofocusing を実施した。Fig. 6 に示すように等電点 (pI) 8.0, 6.9, 6.7 及び 6.5 付近に HAase 活性の peak が認められ、さらに pI 6.5 以下においても幅広く酵素活性が確認された。以上のことはブタ精巢 HAase には等電点の異なる数種のアイソエンザイムが存在することを示唆している。

HAase 中のスルファターゼ活性の検討

HAase で Ch-4S や Ch-6S を分解する際、スルファターゼ活性の有無が分解生成物の利用を考慮すると問題となる。そこで部分精製 HAase について同活性の有無を Ch-4S 及び Ch-6S を基質にし検討した。HAase でそれぞれをオリゴ糖にまで分解後、chondroitinase ABC を作用させ完全に二糖に分解し二糖マップ法を実施した。その結果、スルファターゼ活性があれば検出される Δ Di-OS は、両基質共確認されなかった。したがって HAase 標品中にはコンドロ4-及び6-スルファターゼ活性は存在しないといえる。

考 察

精巢 HAase は現在まで種々の動物でその存在が報告されているが、精製酵素はウシ⁴⁻⁷⁾のものが知られているのみである。しかし精製酵素についても分子量やアイソエンザイム等に関して定説がない。ウシ精巢 HAase の分子量は、Yang 及び Srivastava⁵⁾ によれば 62 K の一種のみである。しかし Lyon 及び Phelps⁷⁾ は SDS-disc 電気泳動で 61 K と 67.2 K の二種が存在すると報告しており、さらに延原ら⁶⁾ はゲル濾過で 69 K と 93.3 K の二種を分離したと報告している。ブタの場合は、既述したように 62 K のもののみが確認された。一方このものについて chromatofocusing を実施すると数種のアイソエンザイムの存在が示唆された。ウシ精巢 HAase⁶⁾ についてもアイソエンザイムが知られているがそれらの等電点は 8.2—8.6 でありブタのものよりも塩基性が高い。

Chromatofocusing によって分離した HAase のうち pI 6.9 と 6.5 のものについて HA を基質に至適 pH を検討したがそれぞれが Fig. 4 の結果と同一であった。しかし本法によって HAase を分離した場合、活性回収率は 20% 以下であり大部分が失活することが判明した。したがって HAase の酵素性質の検討には DE-52 cellulose イオン交換クロマトを実施した標品を使用した。

ブタ HAase の精製操作中、Table I に示したように凍結乾燥を実施すると活性回収率が 100% を越える。この現象は常に観察されることであった。原因について検討を加えてはいないが、凍結乾燥操作による HAase の活性化、あるいは共存する HAase インヒビターの失活等が考えられる。

ウシ精巢 HAase の精製手段としてコンカナバリン A Sepharose を用いたアフィニティクロマトグラフィー^{12,13)}が報告されている。そこで本法をブタ HAase にも適用したが活性回収率が極めて低く有効な精製手段とはなり得なかった。しかしブタ HAase も上記レクチンに吸着性を示したことからウシ HAase と同様糖タンパク質であると言える。

ブタ HAase の至適 pH は 5—5.2 付近であるが、ウシのその場合 pH 3.8⁵⁾ あるいは 6.5⁶⁾ であるとされており著しい違いが観察された。また HA に対する K_m 値は 0.8 mg/ml でありウシ HAase の値 3.7 mg/ml⁵⁾ より低値であり、ブタ HAase の HA に対する親和性の高いことが明らかとなった。

HAase が HA 以外に Ch-4S や Ch-6S を基質とすることは周知の事実である。しかしコンドロイチン硫酸を基質とした場合 HAase がスルファターゼ活性を示すか否かは現在まで不明である。ブタ HAase について二糖マップ法で検討した限りにおいて同活性は認められなかったことから、本 HAase 標品でコンドロイチン硫酸を分解しても分解生成物の硫酸基が離脱することはないと考えられる。

以上、ブタ精巢 HAase について、その部分精製法及び酵素諸性質を記述した。本酵素はウシ HAase と多くの点で類似しているが、HA への親和性ではすぐれている。このことはブタ HAase がウシの酵素と同様に医薬としてまた生化学的に有用な標品となりうることを示唆している。

引 用 文 献

- 1) A. J. Bollet, W. M. Bonner, J. L. Nance, *J. Biol. Chem.*, **238**, 3522 (1963).
- 2) N. N. Aronson, E. A. Davidson, *J. Biol. Chem.*, **242**, 437 (1967).
- 3) N. N. Aronson, E. A. Davidson, *J. Biol. Chem.*, **242**, 441 (1967).

- 4) C. L. Borders, M. A. Raftery, *J. Biol. Chem.*, **243**, 3756 (1968).
- 5) C.-H. Yang, O. N. Srivastava, *J. Biol. Chem.*, **250**, 79 (1975).
- 6) 延原正弘, 酒巻道夫, 竹村正生, 大西治夫, 鈴木泰雄, 薬誌, **100**, 832 (1980).
- 7) M. Lyon, C. F. Phelps, *Biochem. J.*, **199**, 419 (1981).
- 8) L. J. D. Zaneveld, K. L. Polakoski, G. F. B. Schumacher, *J. Biol. Chem.*, **248**, 564 (1973).
- 9) J. L. Reissig, J. L. Strominger, L. F. Leloir, *J. Biol. Chem.*, **217**, 959 (1955).
- 10) a) T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, S. Suzuki, *J. Biol. Chem.*, **243**, 1523 (1968); b) H. Saito, T. Yamagata, S. Suzuki, *ibid.*, **243**, 1536 (1968).
- 11) J. L. Whitaker, *Anal. Chem.*, **35**, 1950 (1963).
- 12) C.-H. Yang, P. N. Srivastava, *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 382 (1975).
- 13) K. A. Balasubramanian, D. Abraham, B. K. Bachhawat, *Ind. J. Biochem. Biophys.*, **12**, 204 (1975).