薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
105 (12) 1160-1165 (1985)

合成基質を用いての Batroxobin の性質

渡辺 進

東菱薬品工業株式会社小金井研究所

Properties of Batroxobin by Use of Synthetic Substrates

SUSUMU WATANABE

Koganei Research Laboratory, Tobishi Pharmaceutical Co., Ltd.,
3-8-12, Nukui-Kitamachi, Koganei, Tokyo, 184, Japan

(Received July 15, 1985)

Batroxobin is a thrombin-like enzyme purified from *Bothrops atrox moojeni* venom. The enzyme hydrolyzed arginine esters, such as benzoyl-L-arginine ethyl ester (Bz-Arg-OEt) and tosyl-L-arginine methyl ester (Tos-Arg-OMe), but scarcely hydrolyzed tosyl-L-lysine methyl ester (Tos-Lys-OMe) and benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (Bz-Tyr-OEt). Batroxobin also hydrolyzed arginine amides, such as benzoyl-L-arginine-4-methyl-coumaryl-7-amide (Bz-Arg-MCA) and benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide (Bz-Arg-pNA) but the rates were slower than the arginine esters. Optimal pH for hydrolysis of Bz-Arg-MCA by batroxobin was 8. The enzyme was relatively heat-resistant at pH 3 to 7 but not at alkaline pH.

Bz-Arg-MCA hydrolytic activity of batroxobin was inhibited by diisopropyl fluorophosphate (DFP), antipain, leupeptin and benzamidine. Trypsin inhibitors, such as *N*²-*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), soybean trypsin inhibitor, Trasylol and α_1 -antitrypsin, and specific thrombin inhibitors, such as antithrombin III and hirudin were ineffective. The inhibition constant (K_i) for antipain, leupeptin and benzamidine were 0.12 μ M, 4.7 μ M, 0.58 mM, respectively.

Keywords—batroxobin; thrombin-like enzyme; snake venom; synthetic substrate; kinetics; protease inhibitor; protease

Batroxobin は、中南米に広く生息するヘビ、*Bothrops atrox moojeni* の毒液から抽出、精製されたトロンビン様酵素である。¹⁾ 著者は先に天然基質であるヒトフィブリノーゲンを用いて、batroxobin の酵素的性質を明らかにし、トロンビン以上にフィブリノーゲンに強い親和性を有することを報告した。²⁾ 今回、低分子合成基質を用いて、本酵素の性質を明らかにし、トロンビンとの相違点を議論した。

実験の部

酵素 Batroxobin は Pentapharm 社製の 1100 BU/ml のものを使用した。¹⁾

基質 Benzoyl-L-arginine 4-methyl-coumaryl-7-amide (Bz-Arg-MCA), L-arginine 4-methyl coumaryl-7-amide (Arg-MCA), benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide (Bz-Arg-pNA), benzoyl-L-arginine ethyl ester (Bz-Arg-OEt), tosyl-L-arginine methyl ester (Tos-Arg-OMe), tosyl-L-lysine methyl ester (Tos-Lys-OMe), benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (Bz-Tyr-OEt) は株式会社ペプチド研究所より購入した。

プロテアーゼ阻害剤 *N*²-*p*-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), diisopropyl fluorophosphate (DFP), ベンズアミジン, 大豆トリプシンインヒビター, α_1 -アンチトリプシン, アンチトロンビン III, ヒルジンは Sigma 社, ロイペプチン, アンチパイン, ペプスタチン, エラスタチナールは株式会社ペプチド研究所, トラジロールは Bayer 社より購入した。

酵素活性の測定 分光光度計法³⁾——各基質の測定波長及び基質とその加水分解(水解)生成物の差分子吸光係数($\Delta\epsilon$)は次の数値を用いた。Bz-Arg-OEt; 253 nm ($\Delta\epsilon=1150$), Bz-Tyr-OEt; 256 nm ($\Delta\epsilon=964$), Tos-Arg-OMe 及び Tos-Lys-OMe; 247 nm ($\Delta\epsilon=409$), Bz-Arg-pNA; 405 nm ($\Delta\epsilon=10600$)。基質の水解速度は 0.15 M Tris-HCl pH 8.0 中, 30°C で吸光度の変化を日立 220A 分光光度計を用いて連続的に測定した。

蛍光光度計法⁴⁾—Arg-MCA または Bz-Arg-MCA と酵素を 0.15 M Tris-HCl pH 8.0 中, 37°C で 30 分間反応させたのち, 等量の 2% 酢酸を加えて反応を停止させ, 遊離した 7-amino-4-methyl-coumarin (AMC) を 380 nm で励起させ 460 nm の蛍光強度を日立 650-60 蛍光光度計を用いて測定した. 既知濃度の AMC を蛍光強度標準品に用いて水解速度を計算した.

結 果

基質特異性

Figure 1 に batroxobin による Bz-Arg-MCA, Bz-Arg-pNA, Bz-Arg-OEt, Tos-Arg-OMe の水解速度と基質濃度の二重逆数プロットを示した. また Table I に Fig. 1 から求めた最大速度 ($V_{\max}$) とミカエリス定数 (K_m) 及び水解速度が極めて遅いために K_m と $V_{\max}$ を求められなかった基質; Arg-MCA, Bz-Tyr-OEt, Tos-Lys-OMe の 1 mM 濃度での水解速度を示した. 本酵素はアルギニンエステルの Bz-Arg-OEt, Tos-Arg-OMe をよく水解するが, リジン及びチロシンエステルの Tos-Lys-OMe, Bz-Tyr-OEt の水解速度は極めて遅かった. また Bz-Arg-MCA, Bz-Arg-pNA も水解するがその速度はアルギニンエステルに比較して遅かった. N-アシル化されていないアルギニンアミドの Arg-MCA の水解速度は極めて遅く Bz-Arg-MCA の 1/270 であった. 以上, これらの基質の中で Bz-Arg-OEt が最も反応性が優れていた. しかし非酵素的な水解が塩基性領域で起こりやすく, また紫外吸収を用いているため測定波長で種々物質により妨害を受けやすいことが考えられる. したがって以下の実験は蛍光光度計法により Bz-Arg-MCA を基質に用いて行った.

Fig. 1. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolysis of Bz-Arg-MCA (A), Bz-Arg-pNA (B), Bz-Arg-OEt (C) and Tos-Arg-OMe (D) by Batroxobin at pH 8.0

Batroxobin concentration, 0.4 BU/ml (A, C) and 0.8 BU/ml (B, D); temperature, 30°C (B, C, D) and 37°C (A).

TABLE I. Kinetic Parameters for the Hydrolysis of Synthetic Substrates by Batroxobin at pH 8.0

Substrate	$K_m \times 10^4$ (M)	$V_{max} \times 10^3$ ($\mu\text{mol/min/BU}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)
Amides			
Bz-Arg-MCA	1.7	0.46	37
Bz-Arg-pNA	1.7	0.69	30
Arg-MCA		0.0017 ^{a)}	37
Esters			
Bz-Arg-OEt	0.83	67	30
Tos-Arg-OMe	5.3	39	30
Tos-Lys-OMe		0.11 ^{a)}	30
Bz-Tyr-OEt		0.061 ^{a)}	30

a) Rate for the substrate concentration of 1 mM.

Fig. 2. Effect of pH on the Hydrolysis of Bz-Arg-MCA by Batroxobin at 37 $^{\circ}\text{C}$

Bz-Arg-MCA concentration, 1 mM; buffer concentration, 0.15 M.

○, potassium phosphate buffer; ●, Tris-HCl buffer; △, glycine-NaOH buffer.

至適 pH

Batroxobin の至適 pH を Bz-Arg-MCA を基質に用いて求めたのが Fig. 2 である。pH 8 に至適 pH があり、これは前報²⁾ のヒトフィブリノーゲンを基質に用いての至適 pH 8.5 とほぼ一致した。

pH 及び熱安定性

Batroxobin を 50 $^{\circ}\text{C}$ で経時的に 4 時間処理し、その残存活性を示したのが Fig. 3A である。pH 3, 5, 7 においては 2 時間の処理でいずれも 90% 以上、4 時間の処理で 70% 以上の活性を保持していた。pH 9 及び 11 においては失活が著しく 2 時間の処理でそれぞれ 46%, 6%, 4 時間で 29%, 1.3% の活性であった。

40–80 $^{\circ}\text{C}$ で 40 分間処理し、その残存活性を示したのが Fig. 3B である。pH 3, 5, 7 においてはいずれも 70 $^{\circ}\text{C}$ で 70% 以上、80 $^{\circ}\text{C}$ で 50% 以上の活性を保持していた。pH 9 においては 70 $^{\circ}\text{C}$ で 13%, 80 $^{\circ}\text{C}$ で 0.7% の活性であった。

各種阻害剤による影響

Bz-Arg-MCA を基質に用いて各種阻害剤による影響を調べたのが Table II である。本酵素反応はセリンプロ

Fig. 3. Heat and pH Stability of Batroxobin

Batroxobin (22 BU/ml) in Britton-Robinson's wide range buffer was heated at 50 $^{\circ}\text{C}$ for indicated time (A), or at indicated temperature for 40 min. (B), and the remaining activity was assayed at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min in 0.15 M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.1 mM Bz-Arg-MCAr.

△, pH 3; ●, pH 5; ○, pH 7; ▲, pH 9; □, pH 11.

TABLE II. Effect of Various Inhibitor Inhibitors on the Reaction Rate

	Inhibitor	Concentration	Activity (%)
Exp. A	None		100
	DFP	1 mM	5
	TLCK	1 mM	98
	Monoiodo acetic acid	1 mM	99
Exp. B	None		100
	Soybean trypsin inhibitor	100 μ g/ml	98
	Trasylol	20 KIE/ml	98
	α_1 -Antitrypsin	100 μ g/ml	101
	Antithrombin III	0.2 U/ml	99
	Heparin	1 U/ml	100
	Antithrombin III + Heparin	0.2 U + 1 U/ml	97
	Hirudin	0.2 U/ml	100
	Leupeptin	30 μ g/ml	19
	Antipain	30 μ g/ml	0.5
	Pepstatin A	30 μ g/ml	100
	Elastatinal	30 μ g/ml	100
	Benzamidine	1 mM	45
	EDTA	5 mM	102

The reaction was carried out at 37°C for 30 min in 0.15 M Tris-HCl pH 8.0 containing batroxobin (0.4 BU/ml), Bz-Arg-MCA (0.1 mM) and inhibitor (with indicated concentration except for Exp. A).

Exp. A: The mixture of batroxobin (0.5 BU/ml) and inhibitor (with indicated concentration) in 0.15 M Tris-HCl pH 8.0 was preincubated at 37°C for 30 min, then substrate added. Exp. B: Batroxobin was added into the mixture of substrate and inhibitor.

テアーゼの阻害剤である DFP によって強く阻害されるが、チオールプロテアーゼの阻害剤であるモノヨード酢酸によって影響されなかった。トリプシン等の阻害物質であるロイペプチン、アンチパイン、ベンズアミジンは本酵素を阻害したが、大豆トリプシンインヒビター、 α_1 -アンチトリプシン、トラジロールは阻害しなかった。またトロンビンの特異的阻害物質であるアンチトロンビン III、ヒルジン及びセリンプロテアーゼのトリプシン、トロンビン、プラスミン等を阻害する TLCK は本酵素を阻害しなかった。

TABLE III. Effect of Metal Ions on the Reaction Rate

Metal salts	Concentration (mM)	Activity (%)
None		100
CuCl ₂	1	92
HgCl ₂	1	90
CoCl ₂	1	83
NiCl ₂	1	48
ZnCl ₂	1	16
CdCl ₂	1	54
MnCl ₂	1	108
FeCl ₃	1	98
CaCl ₂	1	96
MgCl ₂	1	100
KCl	10	102
NaCl	10	102

Experimental conditions were same as Exp. B of Table I.

Fig. 4. Inhibition by Leupeptin (A), Antipain (B) and Benzamidine (C) of the Hydrolysis of Bz-Arg-MCA by Batroxobin at pH 8.0 and 37°C

Batroxobin concentration, 0.4 BU/ml; Bz-Arg-MCA concentration, 0.1 mM (●) and 0.2 mM (○).

次にロイペプチン, アンチパイン, ベンズアミジンの阻害定数 (K_i) を Dixon プロット⁵⁾ によって, 基質濃度 0.1 と 0.2 mM の交点から求めた (Fig. 4). K_i はロイペプチンが 4.7 μ M, アンチパインが 0.12 μ M, ベンズアミジンが 0.58 mM であった.

各種金属イオンによる影響

Bz-Arg-MCA を基質に用いて各種金属イオンによる影響を調べたのが Table III である. 本酵素反応は ZnCl_2 によって強く, NiCl_2 , CdCl_2 によってやや強く阻害されるが, CuCl_2 , HgCl_2 , CoCl_2 の重金属による阻害は弱かった. その他の金属イオンによる影響は極めて小さかった.

考 察

1960 年, Hartley はプロテアーゼを活性基の性質から, セリンプロテアーゼ, チオールプロテアーゼ, 金属プロテアーゼ, 酸性プロテアーゼの 4 群に分けることを提唱し,⁶⁾ 現在これに従った分類法が広く用いられている. Batroxobin は, モノヨード酢酸によって阻害されないこと及び CuCl_2 , HgCl_2 の重金属による阻害が弱いことからチオールプロテアーゼに属さないこと, また金属イオンによる活性化及び EDTA による阻害がないことから金属プロテアーゼに属さないことが示唆された. 一方, 活性部位のセリン残基と結合する DFP によって本酵素が阻害されること及び本酵素の至適 pH は 8 にあり, セリンプロテアーゼの至適 pH が約 8 である⁷⁾ のと一致していることから, batroxobin がセリンプロテアーゼに属することが示唆された.

セリンプロテアーゼの代表的酵素として, キモトリプシンとトリプシンがよく知られている. Batroxobin による低分子合成基質の水解速度は, Table I に示したように塩基性アミノ酸エステルの Bz-Arg-OEt と Tos-Arg-OMe が速く, 芳香族アミノ酸エステルの Bz-Tyr-OEt が遅い (1 mM の基質濃度の比較で Bz-Arg-OEt の 1/1000) ことでトリプシン型の特異性を有していると言える. また塩基性アミノ酸アミドの Bz-Arg-MCA と Bz-Arg-pNA の水解速度は Bz-Arg-OEt のおよそ 1/100 である. これはトリプシンによる特異的アミドとエステル基質の水解はアミドがエステルより 300 倍遅いとの報告があり,⁸⁾ これとほぼ一致している. しかしながら塩基性アミノ酸エステルの Tos-Lys-OMe の水解が遅い (1 mM の基質濃度の比較で Tos-Arg-OMe の 1/230) ことでトリプシンと異なっている. 一方, Arg-MCA の水解は極めて遅く, Bz-Arg-MCA の 1/270 (1 mM の基質濃度での比較) であることから, batroxobin がエキソペプチダーゼに属さないことが裏づけられた.

Weinstein と Doolittle⁹⁾ はトリプシン型の低分子合成基質特異性を示す酵素であるトリプシン, プラスミン, トロンビンによる Tos-Lys-OMe と Tos-Arg-OMe の水解を比較し, トリプシンは両基質に同程度に作用するのに対し, プラスミンは Tos-Lys-OMe に作用が強く, トロンビンは Tos-Arg-OMe に作用が強いことを報告している. Batroxobin は先に述べたように, Tos-Arg-OMe に作用が強くトロンビン類似の特異性を有していると言える. しかも Tos-Arg-OMe と Tos-Lys-OMe の水解速度の比は, 基質濃度 1 mM の比較で batroxobin が 230 倍, トロンビンが約 10 倍⁹⁾ である. したがって batroxobin はトロンビン以上に, アルギニン残基に対して特異性が高いと考えられる.

フィブリノーゲンに対する作用も batroxobin とトロンビンは似ており, 両酵素とも $\text{A}\alpha$ 鎖の Arg-Gly 間を選択的に切断して, フィブリノペプチド A を遊離させる.¹⁾ しかしながら batroxobin が $\text{B}\beta$ 鎖の Arg-Gly 間を切断しない点, トロンビンと異なっている.¹⁾ またフィブリノペプチド A の遊離に関する速度論的性質にも違いが認められており, 著者は先に batroxobin の方がトロンビンより速度が 150 倍遅く, 親和性が 27 倍強いことを報告した.²⁾ このような両酵素の相違点は種々阻害剤による影響からも認められた. 阻害剤によるトロンビンの影響は文献^{2,10)} に従い batroxobin との比較を行った. 両酵素の共通点は, 大豆トリプシンインヒビター, トラジロールによって阻害されないこと及び DFP, ベンズアミジンによって阻害されることである. また異なる点は, batroxobin がアンチトロンビン III, ヒルジン, TLCK によって阻害されないこと及びアンチパイン, ロイペプチンによって阻害されることである. 以上, 種々阻害物質による影響から, batroxobin は試験したすべての動植物起源のプロテアーゼ阻害物質によって阻害されないという著しい特徴を示した. 阻害作用を示したのは DFP とベンズアミジンの合成阻害剤及びアンチパインとロイペプチンの微生物起源の低分子阻害物質のみであり, 特にアンチパインは本酵素の強力な阻害物質 ($K_i=0.12 \mu\text{M}$) であった.

またはトロンビンと batroxobin の熱安定性も著しく異なっており, トロンビンは pH 4.0 及び 7.4 におい

て 60°C, 30 分間の処理で完全に失活することが報告されている。¹¹⁾ これに対し, batroxobin は 60°C, 40 分間の処理で, pH 3, 5, 7 においていずれも 79% 以上の活性を, また pH 9 においても 55% の活性を保持しており (Fig. 3), 耐熱性の酵素と言える。特に pH 3—7 において耐熱性が優れていた。

引用文献及び注

- 1) a) K. Stocker, "Handbook of Experimental Pharmacology," Vol. 46, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1978, p. 451; b) K. Stocker, G. H. Barlow, *Methods Enzymol.*, **45**, 214 (1976).
- 2) 渡辺 進, 大関文照, 森 登, 三橋 進, 馬場茂雄, 薬誌, **105**, 395 (1985).
- 3) a) G. W. Schwert, Y. Takenaka, *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 570 (1955); b) B. C. W. Hummel, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 1393 (1959); c) K. A. Walsh, *Methods Enzymol.*, **19**, 41 (1970); d) B. F. Erlanger, N. Kokowski, W. Cohen, *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271 (1961).
- 4) a) Y. Kanaoka, T. Takahashi, H. Nakayama, K. Takada, T. Kimura, S. Sakakibara, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 3126 (1977); b) T. Morita, H. Kato, S. Iwanaga, K. Takada, T. Kimura, S. Sakakibara, *J. Biochem.*, **82**, 1495 (1977).
- 5) M. Dixon, *Biochem. J.*, **55**, 170 (1953).
- 6) B. S. Hartley, *Annu. Rev. Biochem.*, **29**, 45 (1960).
- 7) K. A. Walsh, P. E. Wilcox, *Methods Enzymol.*, **19**, 31 (1970).
- 8) M. L. Bender, F. J. Kézdy, *Annu. Rev. Biochem.*, **34**, 49 (1965).
- 9) M. J. Weinstein, R. F. Doolittle, *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 577 (1972).
- 10) a) S. Magnusson, *Methods Enzymol.*, **19**, 157 (1970); b) H. Suda, T. Aoyagi, M. Hamada, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiotics*, **25**, 263 (1972).
- 11) C. Ouyang, J. S. Hong, C. M. Teng, *Tromb. Diath. Haemorrh.*, **26**, 224 (1971).