UDC 577.157

210. 小川信久：拡散因子の研究(第2報^{*1})   Zone Electrophoresis で精製した
ヒアルロニダーゼの拡散作用

Nobuhisa Ogawa: Studies on Spreading Factors. II.   Spreading Activity
of the Hyaluronidase purified by Zone Electrophoresis.

(Research Laboratory, Mochida Pharm. Mfg. Co., Ltd.^{*2})

Examinations were made on the bovine testicular hyaluronidase, partially purified by zone electrophoresis for relationship between enzymic activity and intradermal diffusion of dye. Treatment of this hyaluronidase at 65° for 30 minutes results in disappearance of enzymic activity but the spreading activity remains and this also occurs when enzymic activity is destroyed by tryptic digestion. The enzymic activity decreases to 25% by acetylation but the spreading activity was found to increase by this treatment. However, iodine treatment of hyaluronidase results in disappearance of both these activities.

(Received March 12, 1960)

第1報^{*1}において牛睪丸から硫酸分画法により調製した粗ヒアルロニダーゼ中に、ヒアルロニダーゼ酵素活性のない拡散作用物質が存在すること、およびこの粗ヒアルロニダーゼは熱変性により酵素活性を失つても、なお拡散作用の一部が残存することを報告し、あわせて酵素作用によつて拡散作用が起こるとする従来の考え方に疑問があることを指摘した。今回著者は澱粉を担体とする zone electrophoresis により部分精製したヒアルロニダーゼを用い、熱処理、トリプシン消化およびアセチル化等を行ない、酵素作用と拡散作用の関係について検討した結果、ヒアルロニダーゼ酵素作用とは別に色素の皮内拡散を促進する作用が牛睪丸ヒアルロニダーゼにあることを明らかにした。

実験方法

Zone electrophoresis によるヒアルロニダーゼの精製   第1報^{*1}と全く同様に行ない、酵素活性の最も高いフラクションのみを蒸留水に対し透析、凍結乾燥。得られたヒアルロニダーゼの比活性は 4900~6500 TRU/mg で、粗ヒアルロニダーゼに対し 3~4 倍の上昇である。酵素活性および蛋白の収量はそれぞれ 16~40%, 4~13%である。

アセチル化   精製ヒアルロニダーゼ水溶液 1 cc (2.4 mg) に飽和 AcONa 溶液 1 cc を混じ、これを氷冷しつつ Ac_2O 0.022 cc を 10 min おきに 5 回加え、添加開始より 2 hr 時々振盪しつつ氷水中にて反応後、3°で生理食塩水に対し 24 hr 透析。

I_2 による処理   精製ヒアルロニダーゼ水溶液 0.5 cc (600 μg) と 0.1M phosphate buffer pH 7.0, 0.5 cc を混じ、室温 (21°) で 0.01M I_2 -KI 液 0.02 cc を 1 hr に 4 回に分けて添加し、さらに 1 hr 放置後、3°で生理食塩水に対して 42 hr 透析。

トリプシンによる分解   精製ヒアルロニダーゼ 1 cc (430 μg) に対し、0.9%の NaCl を含む 0.1M phosphate buffer pH 7.0 にトリプシン^{*3} 44 μg を溶解した液 1 cc を加え、トルオール 1 滴添加後 37°で 20 hr 加水分解。

IRC-50 クロマトグラフィーによる非酵素性フラクションの分離   Rasmussen¹⁾ の報告に準じ 0.1M phosphate buffer pH 6.0 で緩衝化した Amberlite IRC-50 (100~200 メッシュ) を 260×19 mm のカラムとし、同一緩衝液に 40 mg/cc に溶解した粗ヒアルロニダーゼ 12.5 cc を吸着させ、0.1M phosphate buffer pH 7.7 を溶出液とし、0.2 cc/min で展開。1 フラクションを 9 cc とし、5~8 の 4 フラクションを集め蒸留水に対し 48 hr 透析。ヒアルロニダーゼ酵素活性は全く無く、得られた蛋白量は 183 mg である。

拡散活性の検定は第1報と同様であるが、いずれも 5 羽 5 例の平均値で、Fig. 以外ではその標準偏差 (S. D.) を付記した。酵素活性の測定は特に断わる場合の外は第1報と同様の濁度法を用い TRU でしめし、粘度法²⁾によ

^{*1} 第1報：本誌 89, 344(1960).

^{*2} Kamiya, Kita-ku, Tokyo.

^{*3} 持田製薬製結晶トリプシンを使用。

1) P. S. Rasmussen: Biochim. et Biophys. Acta 14, 567(1954).

2) D. McClean: Biochem. J. 35, 159(1941); *ibid.* 37, 169(1943).

つた場合は VRU で示した。またコンドロイチナーゼの測定は Meyer³⁾, 遊離アミノ基は Moore⁴⁾ の方法で行なった。

実験結果

酵素量と拡散活性の関係

Fig. 1 は酵素量と拡散活性の関係を示すものである。粗ヒアルロニダーゼは約

Fig. 1.

Relationship between the Amount of Enzyme and Spreading Activity

- crude hyaluronidase
- hyaluronidase purified by zone electrophoresis
- △—△ no hyaluronidase fraction separated by IRC-50 chromatography

Fig. 2.

Relationship between Enzymic Activity and Spreading Activity

- crude hyaluronidase
- hyaluronidase purified by zone electrophoresis

300 µg 以上の酵素濃度において急激に拡散活性が上昇するが、精製ヒアルロニダーゼでは 10 µg より 200 µg までは拡散活性は変化せず、さらに酵素量を増加することにより再び拡散活性も上昇する。この高い酵素濃度における拡散活性の上昇が、別に IRC-50 で分離したヒアルロニダーゼ作用の無いフラクションの拡散作用に略対応している。Fig. 2 はヒアルロニダーゼ酵素活性と拡散活性の関係をしめすものであるが、精製ヒアルロニダーゼの拡散作用は粗ヒアルロニダーゼより弱いことが認められる。

Fig. 3.

Effect of Heat on Enzymic and Spreading Activity at 65°

- spreading activity
- enzymic activity (turbidimetric)
- △—△ enzymic activity (viscometric)

熱不活性化の影響 216 µg/cc の精製ヒアルロニダーゼ蒸留水溶液を 65° の水浴中にて 0.5, 1, 2, 4, 8 hr 処理したものの酵素作用と拡散作用の関係を検討した。注射量は 21.6 µg である。Fig. 3 はその実験結果をしめすもので、酵素活性は濁度法および粘度法のいずれにても 30 min 以内に完全に消失するが、拡散活性はなお残存し、時間の経過と共に徐々に低下している。

トリプシン消化の影響 予試験によつて酵素活性を完全に破壊する最低限度の分解条件を定め、実験法に記載した方法で消化を行なつた。トリプシンを添加せずに同様に処理した control (100 TRU) の拡散活性は 85 (S.D. 19.7), トリプシン処理によつて酵素活性を全く失つたものは 33 (S.D. 17.8), トリプシンのみの control

3) K. Meyer, M. M. Rapport : Arch. Biochem. **27**, 287(1950).

4) S. Moore, W. H. Stein : J. Biol. Chem. **176**, 367(1948).

は 6 (S. D. 3.6) であつた。すなわちトリプシン処理により酵素活性を全く失つたヒアルロニダーゼもなお相当の拡散活性を残している。

アセチル化の影響 Table I にしめすように、酵素活性はいずれもアセチル化により 20~25% に低下するが、拡散活性は上昇の傾向が認められる。アセチルヒアルロニダーゼとこれと同一酵素力価のヒアルロニダーゼとの拡散活性の差を分散分析法で検定した結果、Exptl. No. 1 $F_p=5.03$, No. 2 $F_p=11.16^*$, No. 3 $F_p=351^{**}$ ($F_0=F_5^1=6.61$ ($p=0.05$), 16.26 ($p=0.01$)) で酵素活性の低下と拡散活性の低下は平行しない。またこのアセチルヒアルロニダーゼの拡散速度は Fig. 4 にしめたように、アセチル化の前後において差は認められない。

Fig. 4.
Comparison of Spreading Velocity of
Hyaluronidase, Acetylhyaluronidase,
and Control

- acetylhyaluronidase
- △—△ hyaluronidase before acetylation
- ×—× hyaluronidase possessing an enzymatic activity equivalent to the acetylhyaluronidase
- control (physiological saline)

別に濁度法および粘度法によるヒアルロニダーゼ酵素活性、コンドロイチナーゼ作用、遊離アミノ基をアセチル化の前後において測定した結果を Table II にしめた。濁度法による酵素作用、コンドロイチナーゼ作用、遊離アミノ基は約 25% に、粘度法による酵素作用は 75% に低下している。

Table I. Effect of Acetylation on Enzymic and Spreading Activities
of Partially Purified Hyaluronidase

Exptl. No.	Before acetylation (A)		After acetylation (B)		Spreading ^{a)} activity of control (S. D.)	Activity ratio (B/A, %)	
	enzymic activity (T. R. U.)	spreading activity (S. D.)	enzymic activity (T. R. U.)	spreading activity (S. D.)		enzymic activity	spreading activity
1	350	102 (23.8)	84	126 (14.0)	95 (17.6)	24	124
2	350	102 (23.8)	65	129 (30.3)	97 (35.8)	19	126
3	87	106 (24.5)	21	113 (20.8)	46 (26.4)	24	106

a) The controls are shown with the spreading activity of non-treated hyaluronidase, possessing an enzymic activity equivalent to acetylhyaluronidase

Table II. Effect of Acetylation on Enzymic Activities and Free Amino
Groups of Partially Purified Hyaluronidase

Hyaluronidase activity	Before acetylation (A)	After acetylation (B)	B/A (%)
Turbidimetric (T. R. U.)	11500	2860	24.8
Viscometric (V. R. U.)	980	740	75.6
Chondroitinase activity	360	96	26.7
Free amino groups (equivalent to μM alanine)	0.264	0.063	24.1

I₂ による処理の影響 予試験で酵素活性を完全に消失させる処理条件を定め、実験法に記載した方法で行なつた。処理したヒアルロニダーゼおよび同一条件下に I₂ のみを添加せずに処理したヒアルロニダーゼの酵素活性 (TRU) はそれぞれ 0, 86 また拡散活性はそれぞれ 6 (S. D. 11.9), 62 (S. D. 38.6) であつた。すなわち I₂ による処理によつて活性はいずれも消失する。

* は有意, ** は高度に有意を示す。

5) Duran-Reynals: J. Exptl. Med. 55, 703(1932).

考 察

従来報告されているヒアルロニダーゼの拡散作用に関する研究は臍丸抽出液⁵⁾, ヒアルロニダーゼ産生菌の培養液⁹⁾, またはその硫酸塩析等によつて得た粗製⁷⁻⁹⁾ のものが殆んどであるため, 第1報に述べたようにヒアルロニダーゼ作用のない拡散因子の存在が予想される。したがつて著者は zone electrophoresis により分離出来るヒアルロニダーゼ以外の拡散因子を除去し, 実験を行なつた。また IRC-50 のクロマトグラフィーによつて分離したヒアルロニダーゼ作用のない拡散因子の有効量が 50 μ g 以上であること (Fig. 1) を考慮して, その影響を無視し得る範囲内で, 酵素作用と拡散作用との関係を検討した。このような考慮のもとに行なつた実験の結果, 1) 酵素作用における比活性の上昇と拡散作用とは関係がない。2) 65° の熱処理によつて酵素活性を失つても拡散作用は残る。3) アセチル化により酵素活性は低下するが, 拡散作用はむしろ強くなる。したがつて酵素作用と拡散作用の間に相関を認め難く, またヒアルロニダーゼの拡散作用を従来の解釈のみで説明することは困難である。

この実験結果について二つの可能性が考えられる。本実験に用いた試料は別に報告するようにまだ純度が低いことと, 比活性の上昇と拡散活性の上昇とが比例しないことから, ヒアルロニダーゼとは別に微量でも拡散作用を有する新しい拡散因子の存在が予想される。またアセチルヒアルロニダーゼの酵素活性が濁度法では 25% に低下するが, 粘度法では 76% に低下するにすぎず, 拡散活性はやや上昇を見せることから, このヒアルロニダーゼ標品の active site がそれぞれ異なる場合も考えられる。しかしこの拡散作用の本質を明らかにするためには, 色素の皮内拡散法ばかりでなく組織内の生理的および化学的な変化も観察することが必要であり, また現在純粋なヒアルロニダーゼが単離されていないが, さらに高度に精製したヒアルロニダーゼの拡散作用を検討することもある必要である。

結 論

1. zone electrophoresis により精製したヒアルロニダーゼを用い, 拡散作用と酵素作用の関係を追求した。
2. このヒアルロニダーゼは 65° 30 分の熱処理により酵素作用を消失するが拡散作用は残存し, 以後時間の経過とともに漸減する。
3. アセチル化により酵素作用は濁度法で 25% に, また粘度法で 76% に低下するが, 拡散作用はやや上昇の傾向が認められる。
4. トリプシンによる消化によつて, 酵素作用は完全に失われるが拡散作用はなお残存する。
5. ヨウ素による処理によつて両作用は完全に消失する。

終りに臨み, 本研究について有益な御助言と御校閲を賜つた国立予防衛生研究所 水野伝一博士並びに御鞭撻をいただいた持田製薬株式会社 持田良吉社長および持田 英研究所長に深謝し, 終始御協力いただいた当研究所 安藤稔治氏に謝意を表します。

持田製薬株式会社研究所

6) S. E. Mergenhagen : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 92, 700(1958).

7) A. Schmidt : Acta pharmacol. et toxicol. 12, 164(1956).

8) E. Chaine, E. Duthie : Brit. J. Exptl. Path. 21, 324(1940).

9) J. Madinaveitia : Biochem. J. 32, 1806(1938); *ibid.* 33, 347(1939).