アルカリプロテアーゼの打錠による失活¹⁾

森井孫俊, 佐野明美, 竹口紀晃, 堀越 勇
富山大学薬学部²⁾

Studies on Inactivation of Alkaline Protease by Tableting¹⁾

MAGOTOSHI MORII, AKIMI SANO, NORIAKI TAKEGUCHI and ISAMU HORIKOSHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama University²⁾

(Received July 6, 1972)

Inactivation of alkaline-proteases of *Streptomyces* and *Aspergillus*, and bacillus from barley under pressure up to 8900 kg/cm² was examined and it was found that the rate of inactivation of unhydrous enzymes is nearly equal, but decreases with moisture absorption. In the case of repeated compression in random direction, a percentage retention of enzymic activity (An) is given by

$$An = [A_0 - k \cdot \log(P+1)]^n$$

where A_0 is the initial activity of an enzyme, P is the pressure applied, n is the number of repeated compression, and k can be defined as the kind of activity coefficient for an enzyme in a solid state.

医薬品を製剤化する過程でその力価が消失する現象はしばしば観察される。とくに捏和や乾燥のような水分の存在下で熱の加わる工程ではそれが顕著なため十分な管理が要求される。しかし打錠の工程で品質の劣化がおこることは、圧縮時に極端な発熱がないかぎり、まずないと考えてよい。ただ酵素のような高分子タンパク質の医薬品では、圧縮という単なる機械的刺激で活性の低下することが知られている。

これは酵素タンパクの構造変性によるもので、均一な溶液中で加圧した際の挙動についてはすでに一連の報告があり、その概要は鈴木³⁾の総説³⁾によくまとめられている。

著者らは粉末という微視的に不均一な形で存在する酵素を静圧圧縮し、圧縮圧、圧縮時間、圧縮回数と残存活性率との関係から圧縮に対する酵素の失活係数を求め、またこれに影響を与える因子について検討した結果、吸着水分が失活を防ぐ方向に作用することを見いだしたので以下その詳細を報告する。

実 験 の 部

試料 市販のアルカリプロテアーゼ (A, B, C, D および E) をそのまま検体とした。特性を Table I に示す。含有水分は酵素を室温で五酸化リンの存在のもとで 10⁻² mmHg 減圧下恒量に達するまで乾燥したさいの減量値 (%) である。またその際の見かけの誘電率も併記した。

加圧操作 赤外吸収測定のため固体試料の成型に用いる臼、杵および油圧式圧縮機 (理研精機 R-18) を利用した。操作は粉末の酵素 50—200 mg を秤取して臼に入れ、500 kg/sec の割合で増圧し、目的の圧力に達してから 30 秒間恒圧を維持し、のちただちに脱圧して検体を取りだし、残存活性率の測定に供した。方向ランダムなくり返し圧縮は、加圧成型した酵素を乳鉢中で粉碎してふたたび圧縮をおこなった。

プロテアーゼ活性の測定 定量は萩原-Anson法に準じておこなった。

1) 酵素濃度——濃度と吸光度との間に直線関係の成立する範囲をしらべ、それぞれ A: 0.7 mg/ml, B: 0.7 mg/ml, C: 0.2 mg/ml, D: 1.0 mg/ml, E: 0.07 mg/ml の濃度で活性測定をおこなった。

2) 酵素単位——本法ではつぎのように定義する。すなわち pH 7.0, 30° で終濃度 1.0% のミルクカゼイン溶液に作用させたとき、1 分間に生成するタンパク沈殿剤可溶物の量がチロシン 1 μg に相当するフォリン呈色を示す場合の活性度を 1 単位とし、 $[PU]_{\mu g, 1\%}^{30^\circ, FRA}$ なる記号で示す。

3) 測定方法——酵素試料一定量 (20—200 mg) を精密にはかり、pH 7.0 の McIlvaine 緩衝液に溶解し、冷

1) この論文の大要は日本薬学会第 91 年会および 92 年会で発表。

2) Location: 3190 Gofuku, Toyama.

3) 鈴木啓三, 生物物理, 3, 194 (1964).

TABLE I. Materials

Enzyme preparation	Activity [UP] _{μg Tyr} ^{Cas. 30FRA} /g	Moisture content (%)	Apparent dielectric constant	Source
(A)	23500	4.24 (0.	5.5 (4.0	streptomyces
(B)	24000	2.42 (0.	4.2 (3.6	aspergillus
(C)	95000	3.70 (0.	7.4 (3.9	aspergillus
(D)	18500	1.65 (0.	5.6 (3.7	bacillus
(E)	344000	5.80 (0.	7.1 (5.6	aspergillus

所で約1時間放置後、同緩衝液を追加して全量を100 mlとする。この溶液1 mlを試験管にとり、30°恒温で数分間保温したのち、あらかじめ30°に保温しておいた2.0%のミルクカゼイン溶液1 mlを加えてよく振り混ぜ、30°で20分放置して十分に沈殿させてからろ過する。

このろ液1 mlに0.55M炭酸ナトリウム溶液5 mlを加え、さらにフォリン試液1 mlを加えてよく振り混ぜ、30°で20分間放置し、この液につき、層長10 mmで波長660 mμにおける吸光度[D]を蒸留水を対照として測定する。

空試験として酵素液1 mlに0.4Mトリクロル酢酸溶液1 mlを加え、よく振り混ぜ、30°で20分間放置し、十分に沈殿させてからろ過し、このろ液1 mlにつき前と同様に操作して吸光度[D₀]を測定する。以上より修正吸光度[OD]=[D]-[D₀]を求める。したがって残存活性率(A)は、 $A=[OD]_{press}/[OD]_{nonpress}$ として表現される。測定は日立ダブルビーム分光光度計124型を使用した。

4) 試液調製——McIlvaine 緩衝液：1/10Mクエン酸溶液177 mlに1/5Mリン酸水素2ナトリウム溶液約823 mlを混合し、pHメーターで7.0に調整する。

2.0% ミルクカゼイン溶液：ミルクカゼイン (Merck 製) 1.0 gに蒸留水約5 mlを加え、10—15分放置後、練りながら水を徐々に加えて全量を約30 mlとする。この液に1Nの水酸化ナトリウム溶液約0.6 mlを加え、水浴上で攪拌しながら溶解させる。冷却後水を加えて1N NaOH または 1N HCl で pH 7.0 に調整し、水を加えて全量50 mlとする。

フォリン試液：市販品を蒸留水で5倍に希釈して用いた。

実験結果および考察

1. 不均一系の失活に対する挙動

溶液のような均一系における酵素失活の挙動は、一般にある圧力まで活性に変化なく安定で、一種の閾値が存在し、その値を過ぎると急激に失活しはじめ、活性がまったくなくなるか、あるいは一定値に達し、以後は圧力を増加させても失活しない。例を Fig. 1 の点線⁴⁾ (1) および (2) で示す。

一方粉末という不均一系の加圧による失活はごく低圧からおこり、圧力の増加に伴って残存活性率は漸減してゆく。Fig. 1 の曲線 (3), (4), (5) はいずれも検体 A に関するもので、○印は水分0%, ⊙印は4.6%, ⊕印は7.7% それぞれ含有している場合の結果で、水分の少ない酵素ほど失活がはげしい。不均一系においても加圧に対して個々の分子は均一系とおなじ失活挙動を示すものと思われるが、巨視的に加圧が均一でも微視的には不均一で大きな圧力の加わる部分が生じその結果低圧で失活をおこすと考えられる。また水分の多いほど残存活性率が高いのは吸着されている水分子が圧縮による酵素粒子間の内部摩擦力を減少する方向に作用し、系内に生ずる圧力分布を緩和するためと思われる。この水分の物性については酵素と水分の誘電率に加成性が成り立つとして計算した場合、水分の誘電率が30—40となりきわめて弱い結合状態にあること、および示差熱分析の100°付近における吸熱ピークから判断して、吸脱着に可逆性のある毛管凝縮水であることが確認された。

そこで水分の影響に一般性があるかどうか確認する目的で4種のプロテアーゼ A, B, C および D を選び、その含水物および無水物について圧縮圧と残存活性率との関係をしらべ Fig. 2 の結果をえた。図の左側の一群は

4) K. Miyagawa, K. Suzuki, *Rev. Phys. Chem. Japan*, **32**, 43 (1962).

Fig. 1. Effect of Pressure on Activity of Enzyme

- 1: β -amylase in aqueous solution⁴⁾
- 2: chymotrypsin in aqueous solution⁴⁾
- 3: protease A, moisture content 0%
- 4: protease A, moisture content 4.6%
- 5: protease A, moisture content 7.7%

Fig. 2. The Influence of Moisture on the Inactivation of Protease A, B, C and D by Compression

- : protease C, moisture content 3.7%
- : protease A, moisture content 4.2%
- : protease D, moisture content 1.7%
- : protease B, moisture content 2.4%

Curves drawn on the left in the Figure show the behavior of unhydrous proteases.

脱水処理した酵素で圧力に対してほぼ同一の傾向を示す。右側は含水物で、含水量に比例して残存活性率は高い値を示している。これら4種の酵素の活性単位には5倍近い開きがあるが、失活の挙動に差は認められない。また酵素(B)は含水物と無水物の挙動に差がなく、吸湿性も少ないのでつぎの実験ではBを使用することにした。

2. 圧縮時間およびくり返し圧縮効果

北村の報告⁵⁾によれば、水溶液中で酵素を加圧すると時間の経過とともに失活が進み、圧縮時間と残存活性率の間に一次反応の関係が成立する。この直線の勾配は圧力が高いほど急で、残存活性率が平衡値に達するのに数分から数十分を要し、その過程を測定可能である。

一方粉末の酵素では失活はほとんど瞬間的におこると考えられ、⁶⁾ 圧力が一定なら圧縮時間に関係なく一定の残存活性率を示す。Fig. 2の酵素Bについて縦軸に残存活性率、横軸に圧力の対数 $[\log(p+1)]$ をとると、Fig. 3

Fig. 3. Relationships between Applied Pressure or Repeated Compression and Percent Retention of Activity

sample: protease B, pressing time: 30 sec

の左側白丸印と点線で示されるような関係の存在することがわかる。

加圧のくり返し効果については圧力と方向が同じ場合すなわち単に加圧、脱圧をくり返しただけでは変化は認められないが、一度成型された試料を粉末にもどし、再度加圧するいわゆる方向ランダムなくり返し圧縮では、 n 回目の残存活性率は最初の値の n 乗に等しくなる。したがって残存活性率と圧縮回数に一次の関係が成立する。

実験の結果が Fig. 3の右側の一群の直線で、それぞれの圧力に応じて勾配はことなるがよい直線性を示す。

以上の関係からある力価 ($A_0=100\%$) をもった酵素を圧力 P で圧縮する際の残存活性率 (%) を A とすると、

5) K. Kitamura, *Rev. Phys. Chem. Japan*, 36, 44 (1966).

6) 葛西敬夫, 内田常夫, *薬剤学*, 25, 279 (1965).

$$A = A_0 - k \cdot \log(P+1)$$

が成立し、方向ランダムなくり返し圧縮では n 回目の残存活性率を A_n とすると、

$$A_n = [A_0 - k \cdot \log(P+1)]^n$$

なる関係の存在することを意味する。 k は粉末酵素の圧力に対する失活係数ともいえるもので、酵素の結晶化の程度、賦形剤の種類、含水量によりことなつた値となるが、起源が等しく添加剤の混入していない酵素については、水分皆無の場合一定値となるので酵素に個有の失活係数と定義できる。

均一系におけるくり返し効果は、不均一系の場合とことなり加圧、脱圧をくり返すだけで二種類の変化がみられる。⁷⁾ 第一の型は圧力が失活の最終状態を呈する値より高い場合で、たとえばトリプシンについては 8500 kg/cm² で 5 分間加圧しても 20 分間加圧しても残存活性率は変わらず約 60% であるが、5 分間加圧をくり返すとそのたびごとに残存活性率は減少してゆき、4 回加圧をくり返した場合すなわち延べ加圧時間が 5 分×4 回で 20 分のときは約 10% まで減少する。この減少率は 1 回の残存活性率の 4 乗となり、不均一系における方向ランダムなくり返し圧縮と一致する。

第二の型は圧力が最終状態に達しない場合で、失活は圧縮時間に比例し、20 分 1 回と 5 分間 4 回の残存活性率はおなじ値となる。これに対応する挙動は不均一系では見いだせない。

3. 差スペクトルと残存活性率

紫外外部差スペクトルの測定はタンパク質や酵素の 3 次構造に関する情報をうるのに繁用されており、この現象はフェニルアラニンやチロシン、トリプトファンのような発色団が変性により露出して青方へ移動するため、差スペクトルの大きさから分子内に包みこまれている発色団の数を知ることができる。実際に差スペクトルとして明らかに観測されるのはトリプトファンとチロシンのみで、前者は 291, 286, 279 mμ 付近に、後者は 286, 279 mμ 付近にそれぞれ現れる。

試料に酵素 (E) を用い、圧縮をくり返して残存活性率 20% まで順次失活させ、これを 0.3% 以下の水溶液とし、無処理同濃度の酵素と対照として差スペクトルを測定した結果が Fig. 4-1 である。286, 293 mμ の二つのピークについて等吸収点からの高さ ΔD をとすると、 ΔD と残存活性率との間には Fig. 4-2 に示すようにきわめてよい直線関係が認められる。この吸収ピークはトリプトファン残基に相当するものと思われるので、トリプトファンの露出という現象と酵素活性の喪失との間には直接的な関係のあることが確認され、これを定量的に利用できることも明らかとなった。

謝辞 本研究にあたり、試料を提供して下さった盛進製薬株式会社、種々ご討議いただいた同社加藤元彦博士、斎藤 晃氏に深謝いたします。

Fig. 4-1. Difference Spectra of Compressed Protease E versus Native one in 0.3% Aqueous Solution (pH 7.0)

Fig. 4-2. Relationship between Difference Spectra and % Retention of Activity

7) A.L. Curl, E.F. Jansen, *J. Biol. Chem.*, **184**, 45 (1950).