

スルメイカ, *Ommatostrephes sloani pacificus*, の
肝臓の Cathepsin A (F-I) の精製

稲葉 喬・有松 芳人*

(生物化学教室)

昭和 53 年 5 月 31 日 受理

Purification of Cathepsin A (F-I) from the Liver of
Squid, *Ommatostrephes sloani pacificus*

Takashi INABA and Yoshito ARIMATSU

(Laboratory of Biological Chemistry)

Received May 31, 1978

Summary

Cathepsin A from the liver of squid, *Ommatostrephes sloani pacificus*, was separated into two active fractions such as F-I and F-II on CM-23 cellulose column chromatography of the crude enzyme solution. Cathepsin A (F-I) was further purified by gel filtration on Sephadex G-100, isoelectrofocusing (pH 3.5-10), DE-23 cellulose column chromatography and isoelectrofocusing (pH 4-6). The purified cathepsin A (F-I) seemed to be homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis and on ultracentrifugal sedimentation. Its sedimentation constant ($S_{20,w}$) was 7.94×10^{-13} , and its molecular weight was estimated to be 100,000-105,000 by gel filtration on Sephadex G-100. From the UV-spectrum of cathepsin A (F-I), $E_{1cm}^{1.0\%}$ _{280nm} was calculated to be 17.3. Cathepsin A (F-I) strongly catalyzed the hydrolysis of Z-Glu-Tyr and Z-Glu-Phe at pH 5.0. The values of Km for Z-Glu-Tyr and Z-Glu-Phe were 1.8 mM and 2.8 mM, respectively, in 0.1 M acetate buffer, pH 5.0, at 37°C. Cathepsin A (F-I) was strongly inactivated by diisopropylphosphorofluoridate (DFP) and also inhibited by N-ethylmaleimide, PCMB and 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid).

緒 言

牛のひ臓から合成ジペプチド誘導体である N-carbobenzoxy- α -L-glutamyl-L-tyrosine (Z-Glu-Tyr) を特異的に加水分解する酵素が Tallen ら¹⁾ によって見出され, cathepsin A と呼ばれた. cathepsin A は牛のすい臓の carboxypeptidase A と類似の基質特異性を有することが Iodice ら²⁾ によって報告された.

最近, ネズミの肝臓には分子量を異にする 3 種類の Cathepsin A (A_I , A_{II} と A_{III})³⁾ が存在することが報告され, また豚じん臓から分子量を異にする 2 種類の cathepsin A (S と L)^{4), 5), 6)} が精製されたことから, それらの動物の組織中に cathepsin A は多様な形で存在していることが論じられてきた.

* 現在, 台糖ファイザー(株)研究所

スルメイカ, *Ommatostrephes sloani pacificus*, の肝臓から3種類の cathepsin A (F-I), (F-II-A) と (F-II-B)⁷⁾ が見出され, またヤリイカ, *Dorytheuthis bleckeri*, の肝臓から cathepsin A (F-I) と (F-II)⁸⁾ が見出された。これらの知見にもとづいて, イカ類の肝臓中に cathepsin A は多様な形で存在していると考えられたが, Kisu ら⁷⁾ によってスルメイカの肝臓の cathepsin A としては catgepsin A (F-I) に相当する酵素のみが存在していて, 他の cathepsin A (F-II-A) と (F-II-B) は cathepsin A (F-I) が解離することによって生成されてくる酵素であろうという可能性が示唆された。

この問題を詳しく究明するためには, cathepsin A (F-I) を精製する必要があると考えられた。本報告においては, スルメイカの肝臓の cathepsin A (F-I) の精製とその特性について記載する。

実験方法

1. 材料と試薬

スルメイカ, *Ommatostrephes sloani pacificus*, の肝臓は鮮魚店(佐賀市)から提供され, 使用されるまでディープ・フリーザー中に保存された。

合成基質およびペプチド誘導体類, N-carbobenzoxy- α -L-glutamyl-L-tyrosine (Z-Glu-Tyr), N-carbobenzoxy- α -L-glutamyl-L-phenylalanine (Z-Glu-Phe), N-carbobenzoxy- α -glycyl-L-phenylalanine (Z-Gly-Phe), N-carbobenzoxy- α -glycyl-L-leucine (Z-Gly-Leu), N-carbobenzoxy- α -glycyl-L-proline (Z-Gly-Pro) および Benzoyl- α -glycyl-L-lysine (Bz-Gly-Lys) はタンパク質研究奨励会(大阪)から購入された。Human γ -globulin, bovine serum albumin, ovalbumin, chymotrypsinogen A と cytochrome は Schwarz/Mann 社から得られた。Ampholine (pH 3-10) と (pH 4-6) は LKB の製品であった。Tosyl-L-phenylalanine chloromethane hydrochloride (TPCK) は半井化学(株)から, Diisopropylphosphofluoridate (DFP) は Koch-Light Laboratories からそれぞれ購入された。CM-23 および DE-23 cellulose は Whatman 社の製品であった。Sephadex G-50, G-100 は Pharmacia Japan 社から得られた。

2. Cathepsin A 活性の定量

Cathepsin A の活性は, Z-Glu-Tyr の加水分解によって生成した L-tyrosine を, Moore ら¹⁰⁾ の方法によって調製された Ninhydrin 試薬を用いて, Iodice ら⁹⁾ の方法に従って定量された。活性測定的全操作は, すべて前報^{7), 8)} に記載された方法と同じであった。

3. タンパク質濃度の定量

タンパク質の濃度は, 280nm における吸光度を測定することによって, 或いは結晶 bovine serum albumin を標準タンパク質として用いて Hartree¹²⁾ によって改良された Lowry ら¹¹⁾ の方法に従って 650 nm における吸光度を測定することによって定量された。

4. 限外ろ過

酵素液の濃縮は, PM-10 限外ろ過と加圧セル (UF-202 或いは UF-12) を用いて, 3.5-4.0 kg/cm² の窒素ガスで加圧しながら行われた。

5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は, 7.5%ゲルを用いて, pH 4.3 と pH 9.5 において, Davis¹³⁾ の方法に従って行われた。室温でゲルカラム 1 本当たり 4 mA の定電流を通電することによって, ゲル添加されたタンパク質を泳動させた。泳動後, ゲル中のタンパク質は Diezel ら¹⁴⁾ の方法に従って 0.25% coomassie brilliant blue G-250 を用いて染色された。

6. 超遠心沈降

Spinco model E 超遠心機を用いて, 20°C において, 定速 52,640 rpm で測定された¹⁶⁾.

7. Cathepsin A の精製

i) 抽出 スルメイカ, *Ommatostrephes sloani pacificus*, の肝臓 1 kg を, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.4, 0.9% NaCl を含む) 2 l を用いてワーリング・ブレンダー中でホモジナイズした. そのホモジネートをガーゼでろ過した後, 自己消化をおこさせるために, ろ液を 4°C で 20 時間静置した. そのろ液を遠心分離 (10,000×g, 15 min) した時, 遠心チューブ内に脂肪層, 液層と沈でん層が生じた. その液層を集めて, Celite 535 と Standard super-cel をろ過補助剤として用いて吸引ろ過することによって, 黄褐色の透明なる液を得た.

ii) 硫酸分別 上記のろ液に固体硫酸を加えて30%硫酸飽和した. その混合液を 4°C で 10 時間静置した. 生成した沈でん物を除去するために遠心分離 (10,000×g, 15 min) した. その上清にさらに固体硫酸を加えて60%飽和にした. 生じた沈でん物を遠心分離によって集めて, 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解し, Visking tube (#36/32) 中で同じ緩衝液に対して透析した. 透析中に生じた沈でんを除去するため, その内液を遠心分離した.

iii) CM-23 cellulose カラムクロマトグラフィー 前段階で得られた酵素液を, あらかじめ 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に平衡化しておいた CM-23 cellulose⁷⁾カラム (5.0×30 cm) に添加した. カラムを上記と同じ緩衝液を用いて洗った後, NaCl で塩濃度を段階的に高めて溶出を行った. Fig. 1 にその溶出パターンを示す. Z-Glu-Tyr を加水分解する活性は, 0.1 M NaCl と 0.4 M NaCl でそれぞれ溶出されたフラクションに検出された. 前者を F-I, 後者を F-II と呼んだ. その cathepsin A (F-I) は UM-20E 限外ろ過膜 (分子量 20,000 以上のタンパク質を保持する) を用いて限外ろ過することによって濃縮された.

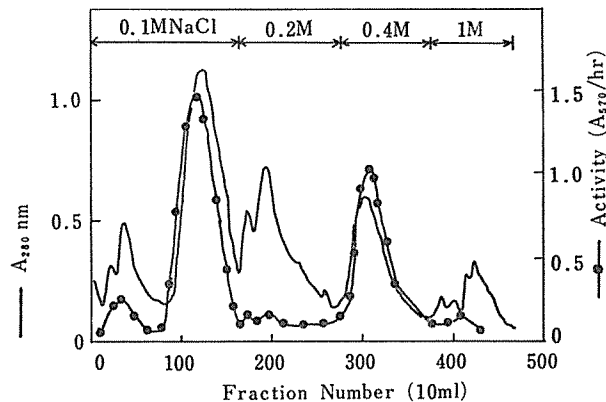


Fig. 1 CM-23 cellulose column chromatography.

iv) Sephadex G-100 によるゲルろ過 前段階において濃縮された cathepsin A (F-I) 溶液を, あらかじめ 0.2 M NaCl を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に平衡化しておいた Sephadex G-100 カラム (5×120 cm) に添加し, 上記と同じ緩衝液を, 2 ml/cm²/hour の流速で, 上昇的に流して溶出した. その溶出パターンは Fig. 2 に示されている. 唯一の Z-Glu-Tyr 加水分解活性のピークが観察され, それは blue dextran 2000 を用いてあらかじめ求められた void volume の約 1.5 倍の容量で溶出された. 活性を有したフラクションを集めて, 限外ろ過によって濃縮した.

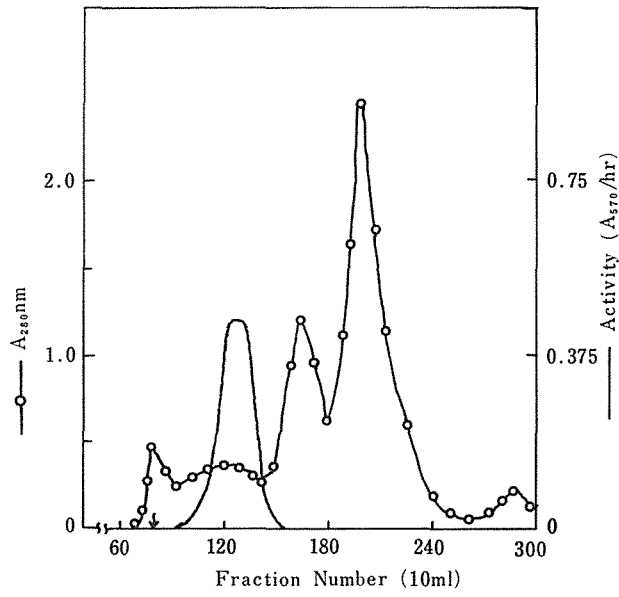


Fig. 2 Gel filtration on Sephadex G-100.

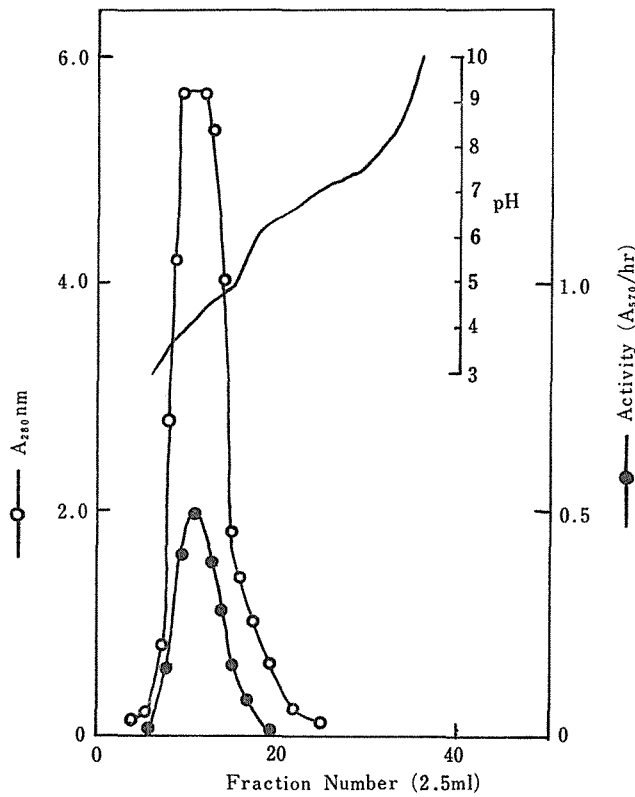


Fig. 3 Isoelectrofocusing (pH 3.5-10).

v) **焦点電気泳動 (pH 3.5-10)** 前段階で得られた cathepsin A (F-I) 溶液を, 1.0% glycine に対して透析することによって平衡化した. その酵素液を, Vesterberg¹⁵⁾ の方法に従って, ampholine (pH 3.5-10) と sucrose を用いて調製しておいたカラム (110 ml, LKB) に添加した. カラムを 0-2°C に冷却しながら, 400V で48時間通電することによって酵素液中のタンパク質を等電点分別した. 泳動後, 分取された各フラクション (2.5 ml) と pH, タンパク質濃度 (A_{280nm}) と Z-Glu-Tyr 加水分解活性を測定した. その溶出パターンは Fig. 3 に示されている. pH 4.5-4.8 附近に分別されたフラクションにのみ, タンパク質のピークと一致して, Z-Glu-Tyr 加水分解活性が観察された. 活性を有したフラクションを集めて, あらかじめ 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) に平衡化しておいた Sephadex G-50 カラム (3×30 cm) に注入し, 同じ緩衝液を用いてゲルろ過した.

vi) **DE-23 cellulose** カラムクロマトグラフィー 前段階で得られた cathepsin A (F-I) 溶液を, あらかじめ 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) に平衡化しておいた DE-23 cellulose カラムに添加し, NaCl で塩濃度を段階的に高めて溶出した. Fig. 4 はそのクロマトグラムである. Z-Glu-Tyr 加水分解活性は, 0.1 M NaCl を含む緩衝液で溶出されたフラクション中に検出された.

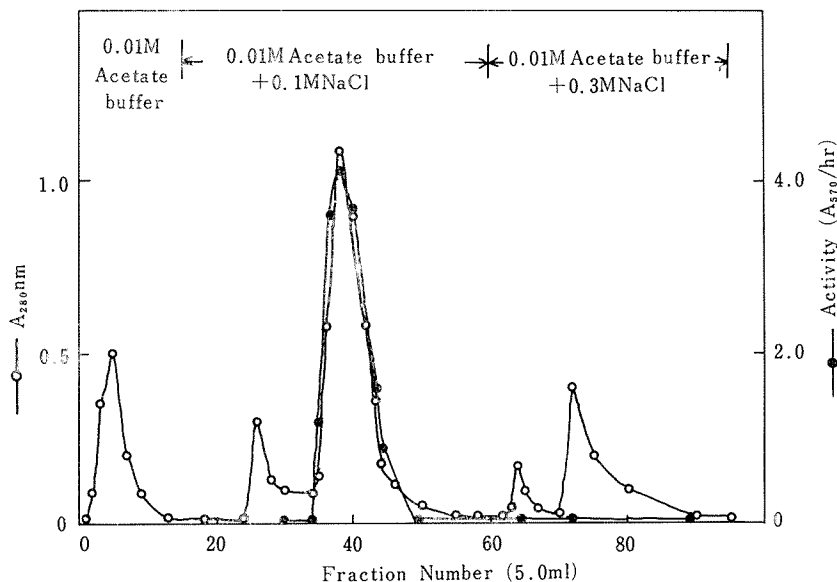


Fig. 4 DE-23 cellulose column chromatography.

vii) **焦点電気泳動 (pH 4-6)** 前段階で得られた酵素液を UM-20E を用いて濃縮し, 1.0% glycine に対して十分透析した. その酵素液を, pH 4-6 の範囲の ampholine を用いて, 前記の方法によって等電点分別した. Fig. 5 はその溶出パターンである. Z-Glu-Tyr 加水分解活性のピークはタンパク質のピークとほぼ一致したが, タンパク質の山の後半に小さな肩が認められた. フラクション番号11から18までの部分を集めて, Sephadex G-50 カラムを用いてゲルろ過することによって ampholine と sucrose を除去した. 得られた酵素液を cathepsin A (F-I) として用いた.

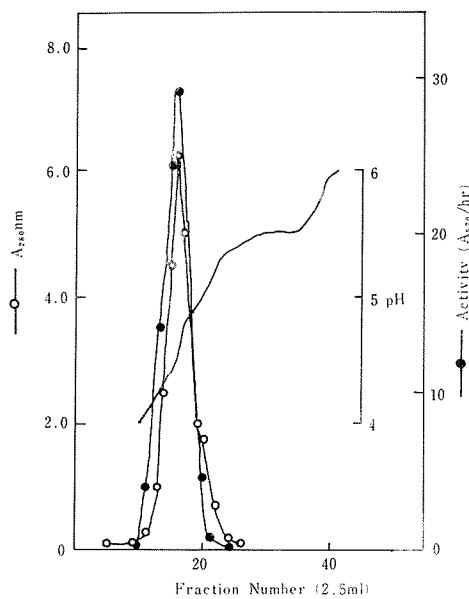


Fig. 5 Isoelectrofocusing (pH 4-6).

結 果

cathepsin A (F-I) の精製によって、最終的に 5.8 mg の均一な cathepsin A (F-I) が得られ、それは pH 5.0, 37°C において 1 時間に 92.4 μ moles/ml の Z-Glu-Tyr を加水分解する活性を有

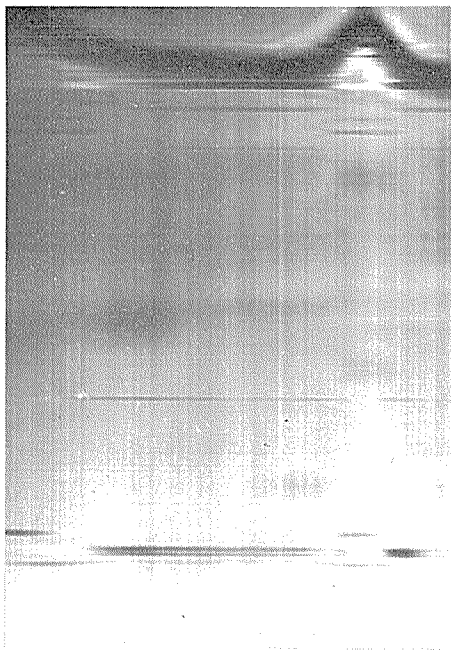


Fig. 6 Ultracentrifugal sedimentation pattern of cathepsin A (F-I).

した。その活性の収量は、抽出液の活性を基準にすると、0.26%であった。

最終的に精製された cathepsin A (F-I) はポリアクリルアミドゲル電気泳動的に均一であったので、さらに超遠心沈降法によって、その均一性を調べた。Fig. 6 は定速 52,640 rpm における沈降パターンの一つである。cathepsin A (F-I) は単一のピークを示し、しかもそのピークは対称的であった。算出された $S_{20,w}$ の値は 7.94×10^{-13} であった。

Fig. 7 は Sephadex G-100 によるゲルろ過による各標準タンパク質と cathepsin A (F-I) の溶出容量とそのカラムの void volume との比を、それらのタンパク質の分子量の常用対数に対してプロットした図である。その結果から、cathepsin A (F-I) の分子量は 100,000-105,000 であると推定された。

cathepsin A (F-I) の紫外吸収スペクトルを EPS-3T 型日立自記分光光度計を用いて測定した結果を Fig. 8 に示す。そのスペクトラムから、cathepsin A (F-I) 溶液は、pH 5.0 において、

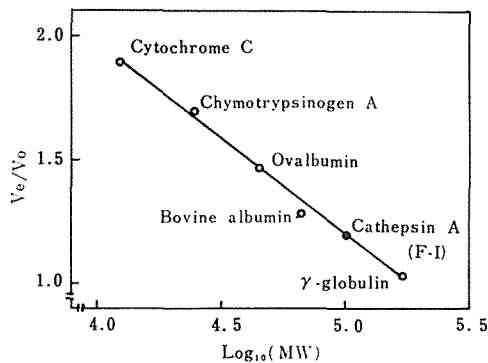


Fig. 7 Determination of molecular weight of cathepsin A (F-I) by gel filtration on Sephadex G-100.

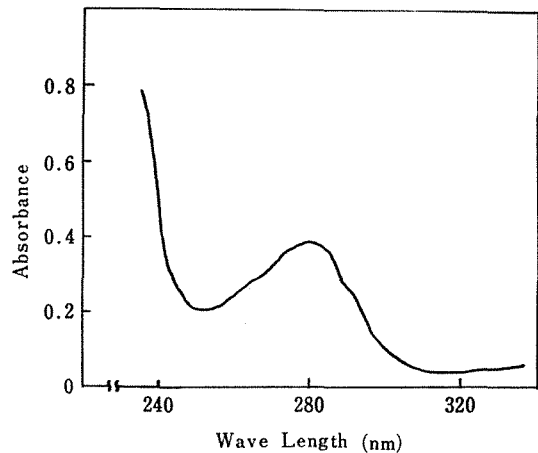


Fig. 8 UV-spectrum of cathepsin A (F-I).

$A_{280\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ は 1.50 であり、 $E_{\text{cm}, 280\text{nm}}^{1\%}$ は 17.3 であると算出された。

cathepsin A (F-I) の基質 Z-Glu-Tyr と Z-Glu-Phe の濃度に対する依存性を、Linweaver-Burk のプロット法によって作図して調べた結果を Fig. 9 と Fig. 10 に示す。0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で 37°C という条件下で、Z-Glu-Tyr の加水分解反応における K_m 値は 1.8 mM であり、また Z-Glu-Phe のそれにおける K_m 値は 2.8 mM であると算出された。次に、各種の合成 dipeptide 誘導体に対する cathepsin A (F-I) の作用を調べた結果を Table 1 にまとめて示している。cathepsin A (F-I) は Z-Glu-Tyr および Z-Glu-Phe を最もよく加水分解し、17 時間では 100% の加水分解率を示した。Z-Gly-Phe の加水分解は 17 時間で 42%、また Z-Gly-Leu のそれは 25% しか進行しなかった。なお、Bz-Gly-Lys および Z-Gly-Pro に対しては全く、cathepsin A (F-I) は作用しなかった。

cathepsin A (F-I) は pH 4.5-5.0 の範囲で Z-Glu-Tyr を最もよく加水分解した。また、4°C で 18 時間種々の pH で静置した時、cathepsin A (F-I) は pH 5.0-7.4 の範囲で安定であったが、pH 7.4 より高い pH では極度に不安定であった。

cathepsin A (F-I) は 33 μM の PCMB の存在下で 59% 阻害された。また、5 mM N-ethyl-

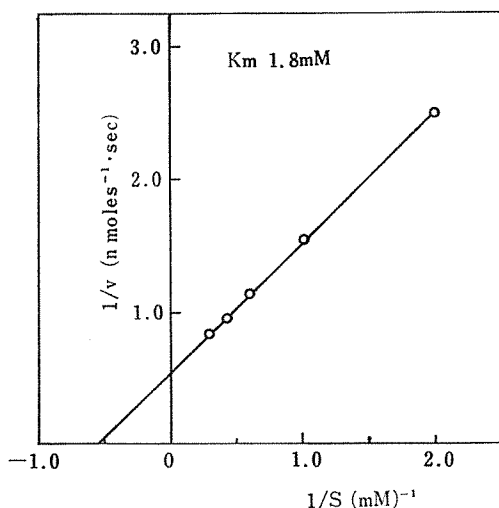


Fig. 9 Lineweaver-Burk plot of Z-Glu-Tyr concentration against cathepsin A (F-I) activity.

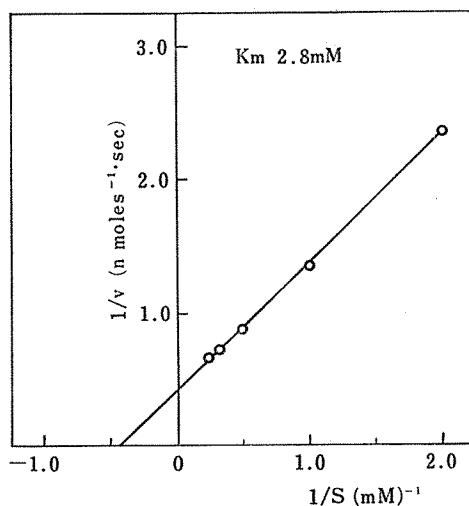


Fig. 10 Lineweaver-Burk plot of Z-Glu-Phe concentration against cathepsin A (F-I) activity.

Table 1. Hydrolysis of Various Dipeptide Derivatives by cathepsin A (F-I).

dipeptide derivatives	reaction time	L-Amino acid μ mloes	Hydrolysis (%)
Z-Glu-Tyr	0 min	0	0
	45 min	0.80	20
	90 min	1.73	43
	17 hr	4.40	110
Z-Glu-Phe	0 min	0	0
	45 min	1.01	25.2
	90 min	1.83	45.6
	17 hr	0	112
Z-Gly-Phe	0 min	0	0
	45 min	0.12	3.2
	90 min	0.21	5.3
	17 hr	1.68	42
Z-Gly-Leu	0 min	0	0
	45 min	0.11	2.8
	90 min	0.21	5.3
	17 hr	1.01	25
Z-Gly-Pro	17 hr	0	0
Bz-Gly-Lys	17 hr	0	0

The reaction mixture contained 0.2 ml of the enzyme solution, 0.4 ml of 10 mM dipeptide derivative and 0.2 ml of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0. The mixture was incubated for various periods of time at 37°C. Aliquots of 0.2 ml were taken from the mixture and subjected to the measurement of the activity, as described in the previous papers⁷⁻⁸⁾.

maleimide の存在下で 57.5%, 1.7 mM の 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) の存在下で, 33%, 1.0 mM DFP の存在下で 95%, それぞれ阻害された。

考 察

スルメイカ, *O. sloani pacificus*, の肝臓から調製された粗酵素液を CM-23 cellulose カラムクロマトグラフィーによって分別した時, Z-Glu-Tyr に対して活性を有する 2つの画分が得られ, それは cathepsin A (F-I) と cathepsin A (F-II) と呼ばれた⁷⁾。同様なクロマトグラムは, ヤリイカの肝臓の cathepsin A についても観察された⁸⁾。スルメイカ肝臓の cathepsin A (F-II) はさらに 2つの活性な成分に分離され, それらは cathepsin A (F-II-A) と cathepsin A (F-II-B) と呼ばれた。その cathepsin A (F-II-B) は部分的に精製され, その分子量は約 57,000 であると報告された。また ヤリイカの肝臓から部分的に精製された cathepsin A (F-II) の分子量は約 58,000 であった。

これまでに, ネズミの肝臓から 3種類の cathepsin A (AI, AII と AIII と呼ばれた)⁹⁾ が, また豚のじん臓から 2種類の cathepsin A (S と L)^{4), 5), 6)} が得られた。cathepsin AI, AII と AIII の分子量はそれぞれ 100,000, 180,000 と 400,000 であり, また cathepsin A (S) と A (L) のそれらはそれぞれ 100,000 と 500,000 であると報告され, cathepsin A の多様性が論じられてきた。

しかしながら, スルメイカの肝臓から調製された粗酵素液を 0.01 M 酢酸緩衝液, pH 5.0, を溶媒として用いて Sephadex G-100 によってゲルろ過した時, cathepsin A (F-I) に相当する唯一のピークのみが観察された。また, 1.0 M NaCl を含む上記の緩衝液を溶媒として用いてゲルろ過した時, cathepsin A (F-I) に相当するピークの他に cathepsin A (F-II-A) と cathepsin A (A-II-B) に相当するピークが観察された。これらの事実は, スルメイカ, *O. sloani pacificus*, の肝臓には cathepsin A (F-I) のみが存在していて, cathepsin A (F-II-A) と (A-II-B) は, cathepsin A (F-I) が塩濃度に依存して解離して生じた成分であろうという可能性を示した。この可能性を明らかにするためには, まず均一な cathepsin A (F-I) をスルメイカの肝臓から得ることが必要であると考えられた。

我々は前記の操作によってスルメイカ肝臓の cathepsin A (F-I) を精製する方法を確立した。得られた cathepsin A (F-I) はポリアクリルアミドゲル電気泳動的に, また超遠心的に均一であった。その沈降定数, $S_{20,w}$ は 7.94×10^{-13} であり, Sephadex G-100 によるゲルろ過によって, その分子量は 100,000-105,000 であった。焦点電気泳動の結果から, cathepsin A (F-I) の等電点は約 4.7 であった。スルメイカ肝臓の cathepsin A (F-I) の Z-Glu-Tyr と Z-Glu-Phe 加水分解に対する Km 値はそれぞれ 1.8 mM と 2.8 mM であり, それらの値はスルメイカ肝臓の cathepsin A (F-II-A)⁷⁾ とヤリイカ肝臓の cathepsin A (F-II)⁸⁾ の Km 値とほぼ一致した。

スルメイカ肝臓の cathepsin A (F-I) の基質特異性は, 豚じん臓から得られた cathepsin A (S と L)^{4), 5), 6)} スルメイカ肝臓の cathepsin A (F-II-A)⁷⁾ およびヤリイカ肝臓の cathepsin A (F-II)⁸⁾ のそれとよく一致していた。

スルメイカ肝臓の cathepsin A (F-I) は, スルメイカ肝臓の cathepsin A (F-II-A) およびヤリイカ肝臓の cathepsin A (F-II) と同様に, DFP によって最も強く阻害されたが, また PCMB, N-ethylmaleimide と 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) によっても 33-59% 阻害された。

摘 要

スルメイカ, *Ommatostrephes sloani pacificus*, の肝臓の cathepsin A は, その粗酵素液を CM-

23 cellulose カラムクロマトグラフィーによって2つの活性画分 (F-I と F-II) に分離された. cathepsin A (F-I) は Sephadex G-100 によるゲルろ過, 焦点電気泳動 (pH 3.5-10), DE-23 cellulose カラムクロマトグラフィーと焦点電気泳動 (pH 4-6) によって精製された. 精製された cathepsin A (F-I) 標品はポリアクリルアミドゲル電気泳動的にまた超遠心的に均一であった. その沈降定数, $S_{20,w}$ は 7.94×10^{-13} であり, その分子量は 100,000-105,000 であると推定された. その紫外吸収スペクトラムから, $E_{1cm,280nm}^{1\%}$ は 17.3 であると算出された. 焦点電気泳動 (pH 4-6) の結果から, cathepsin A (F-I) の等電点は 4.7 であった. cathepsin A (F-I) は, Z-Glu-Tyr と Z-Glu-Phe を pH 5.0 で強力に加水分解した. それらの基質に対する K_m 値は 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 5.0, 中で 37°C において, それぞれ 1.8 mM と 2.8 mM であった. cathepsin A (F-I) は pH 5.0 において diisopropylphosphofluoridate (DFP) によって強く阻害されたが, PCMB, N-ethylmaleimide および 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) によっても阻害された.

文 献

- 1) Tallen, H. H., M. E. Jones and J. S. Fruton (1952). *J. Biol. Chem.*, **194**, 793.
- 2) Iodice, A. A. (1967). *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 241.
- 3) Matsubara, K. and E. Misaka (1975). *J. Biochem.*, **78**, 71.
- 4) Kawamura, Y., T. Matoba, T. Hata and E. Doi (1974). *J. Biochem.*, **76**, 915.
- 5) Kawamura, Y., T. Matoba, T. Hata and E. Doi (1975). *J. Biochem.*, **77**, 729.
- 6) Kawamura, Y., T. Matoba, T. Hata and E. Doi (1977). *J. Biochem.*, **81**, 435.
- 7) Kisu, M. and T. Inaba (1978). *Agr. Bull. Saga Univ.*, **44**, 1.
- 8) 池田栄子, 稲葉 喬, 藤井 実 (1976). 佐賀大農彙 **41**, 9.
- 9) Iodice, A. A., V. Leong and I. M. Weinstock (1966). *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 447.
- 10) Moore, S. and W. H. Stein (1954). *J. Biol. Chem.*, **211**, 907.
- 11) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. D. Randall (1951). *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
- 12) Hartree, E. F. (1972). *Anal. Biochem.*, **48**, 422.
- 13) Davis, B. J. (1964). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404.
- 14) Diezel, W., G. Kopperschlager and E. Hofman (1972). *Anal. Chem.*, **48**, 617.
- 15) Vesterberg, O. (1971). *Methods in Enzymol.*, Vol. XXII, ed. by W. B. Jakoby, Academic Press, New York, N. Y. pp. 389.
- 16) 林 勝哉 (1971). 生物化学実験法, C-2, 蛋白質の分子量・分子形, 瓜谷・志村・中村・船津 編, 東京大学出版会, 東京, pp. 9.