

ヤリイカ, *Dorytheuthis bleekeri*, の肝臓の Cathepsin B (B1 と B2) の Affinity Chromatography

稲葉 喬・岩永孝二郎*・藤永典久・太田順二郎**

(生物化学教室)

昭和 53 年 5 月 31 日 受理

Affinity Chromatography of Cathepsin B (B1 and B2)
from the Liver of Squid, *Dorytheuthis bleekeri*

Takashi INABA, Kojiro IWANAGA, Norihisa FUJINAGA and Junjiro OHTA

(Laboratory of Biological Chemistry)

Received May 31, 1978

Summary

For the effective purification of cathepsin B (B1 and B2) [EC 3. 4. 22. 1] from the homogenate of tissues, affinity chromatography was attempted. Peptide fragments containing arginine residues were prepared by the hydrolysis of protamine sulfate with cathepsin B1, which had been isolated from the liver of squid, *Dorytheuthis bleekeri*, and were used as ligands. The Arg-peptides were bound to Sepharose 4B by a cyanogen bromide method. The Arg-peptide-Sepharose 4B, which had been equilibrated in 0.01 M acetate buffer, pH 4.7, containing 20 mM β -mercaptoethanol and 1.0 mM EDTA·2Na, adsorbed cathepsin B in a crude enzyme solution from the liver of *D. bleekeri*. The adsorbed cathepsin B was eluted with the same buffer containing 0.5 M sodium chloride. The eluate gave a main protein band and two minor protein bands when tested on polyacrylamide gel electrophoresis. Cathepsin B1 and B2 were able to be separated each other by the gel filtration of the eluate through a Sephadex G-100 column, which had been equilibrated with 0.01 M acetate buffer, pH 4.7, containing 0.2 M sodium chloride. This affinity chromatography on Arg-peptide-Sepharose 4B gave excellent results for the purification of cathepsin B1 and B2 from the crude enzyme solution.

緒 言

種々の哺乳動物の組織から cathepsin B [EC 3. 4. 22. 1] を精製するために多くの努力が払われてきた^{1)~7)}。哺乳動物の組織には、 α -N-benzoyl-L-argininamide (BAA) と α -N-benzoyl-L-arginine-2-naphthylamide (BANA) の加水分解を触媒する cathepsin B1 と BAA の加水分解のみを触媒する cathepsin B2 が存在することが明らかにされた⁸⁾。

筆者らは、スルメイカ, *Ommatostrephes sloani pacificus*, の肝臓から pH 4.5-5.0 で BAA を加水分解する cathepsin B1^{5),7)} を, またヤリイカ, *Dorytheuthis bleekeri*, の肝臓から pH 4.5 で BAA および BANA を加水分解する cathepsin B1 に相当する酵素を単離した⁹⁾。しかしながら,

* 佐賀県立佐賀農業高等学校, 現在, 佐賀県立多良高等学校

** 現在, グリコ栄食 (株)

それらの精製過程にはイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、限外ろ過および焦点電気泳動などの操作が組み入れられたために、それだけ酵素活性の収量が低下した。

cathepsin B (B1 と B2) の精製法の改良のためには、Axén ら⁹⁾ によって開発された affinity chromatography が有効であろうと考えられた。半場ら¹⁰⁾ は trypsin の affinity chromatography のリガンドとしてプロタミン硫酸塩の trypsin による限定加水分解物を用いた。

cathepsin B1 の基質特異性は trypsin のそれと類似していることに注目して、cathepsin B1 によるプロタミン硫酸塩の限定加水分解によって得られる Arginine 残基を含むペプチドを Sepharose 4B に結合させた結合体 (Arg-peptide-Sepharose 4B) を用いて、cathepsin B (B1 と B2) の affinity chromatography を試みた。

本報告では、cathepsin B (B1 と B2) の精製への Arg-peptide-Sepharose による affinity chromatography の有用性について記載する。

実験方法

材料と試薬 ヤリイカ, *Dorytheuthis bleekeri*, の肝臓は鮮魚店 (佐賀市) から提供され、使用するまでディープ・フリーザー中に保存された。

α -N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide·HCl (BANA) と α -N-benzoyl-L-argininamide·HCl (BAA) はタンパク質研究奨励会 (大阪) から購入された。プロタミン硫酸塩は東京化成 (株) から得られた。Sepharose 4B と Sephadex 類 (G-25, G-75 と G-100) は Pharmacia Japan (株) から購入された。cathepsin B1 は、前報⁶⁾ に従ってヤリイカの肝臓から精製された、均一な標品であった。

BANA および BAA 加水分解活性の定量 cathepsin B1 の BANA 加水分解活性と cathepsin B1 と B2 の BAA 加水分解活性は前報⁶⁾ に記載された方法に従って定量された。

タンパク質の定量 タンパク質濃度は、280 nm における吸光度を測定することによって定量された。

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 Davis¹²⁾ の方法によって 15% ゲルを用いて pH 9.5 において行われた。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、ゲルに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¹³⁾ の方法に従って 0.25% comassie brilliant blue G-250 を用いて染色された。

プロタミン硫酸塩から Arginine 残基を含むペプチド断片 (Arg-Peptide) の調製 ヤリイカの肝臓から単離された cathepsin B1 を用いてプロタミン硫酸塩を限定加水分解することによって Arg-peptide を調製した。反応混合液は、1.0 g のプロタミン硫酸塩、1.2 mg の cathepsin B1、40 mM 2-mercaptoethylamine, 1.0 mM EDTA·2Na と 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 4.5 から成り、その全容量は 3.0 ml であった。その混合液を 37°C で 2 時間インキュベートと、その後加水分解反応を停止させるため 100°C で 30 分間加熱した。放冷後、その混合液をあらかじめ 25% 酢酸に平衡化しておいた Sephadex G-75 (2.5×100 cm) を用いてゲルろ過した。Fig. 1 はその溶出パターンである。坂口反応による発色において陽性であったフラクションを集めて、凍結乾燥した。

Arg-Peptide-Sepharose 4B の調製 その凍結乾燥物 (910 mg) を 80 ml の 0.1 M ホウ酸緩衝液, pH 9.0 に溶解した溶液に、Cuatrecasas の方法¹¹⁾ に従って臭化シアンを用いて活性化しておいた Sepharose 4B を 50 ml 加えた分散液を 4°C で 24 時間インキュベートした。Sepharose 4B に結合しなかった Arg-peptide を除去するために、上記の分散液を 1.0 M 炭酸水素ナトリウムで十分に洗った。

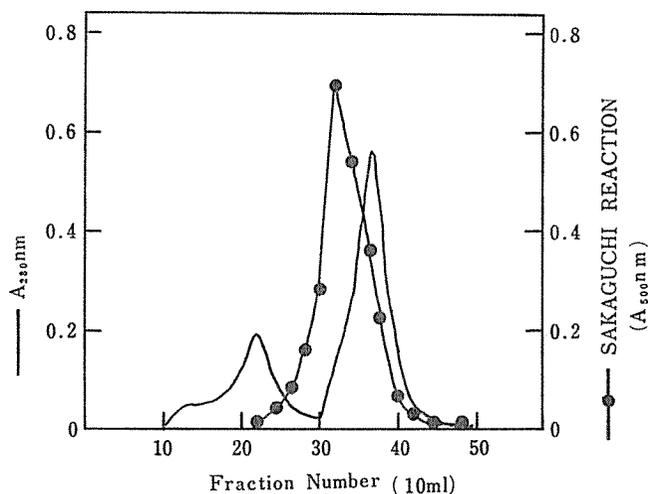


Fig. 1. Separation of Arg-peptides from the hydrolysate of protamine sulfate by squid cathepsin B1 with Sephadex G-75 column (2.5×100 cm).

Table 1 Amino Acid Analysis of Arg-Peptide-Sapharose 4B (6 N HCl, 20 hr)

Amino acid	$\mu\text{moles/ml}$ of gel
Arginine	18.9
Serine	2.21
Proline	1.72
Glycine	3.04
Valine	1.35
Isoleucine	0.42

このように調製されたゲルに Arg-peptide が結合しているか否かについて調べるために、そのゲルを 6 N HCl に溶解し、真空封管中、 110°C で 20 時間加水分解した。その分解中のアミノ酸含量をアミノ酸自動分析機 (日立, KLA-3B) を用いて分析した。調製した Sepharose 4B ゲル 1.0 ml 中に含まれたアミノ酸の種類と含量を Table 1 に示す。

粗酵素液の調製 cathepsin B1 と B2 を含む粗酵素液は、前報⁶⁾に従って、ヤリイカの肝臓を材料として用いて調製された。粗酵素液を、あらかじめ 20 mM β -mercaptoethanol と 0.1 mM EDTA \cdot 2Na を含む 0.01 M 酢酸緩衝液、pH 4.5 に平衡化しておいた Sephadex G-25 カラムを用いてゲルろ過することによって、粗酵素液中に含まれる cathepsin B1 と B2 を活性化した。

結果および考察

cathepsin B1 によってプロタミン硫酸塩を加水分解した後、その加水分解物を Sephadex G-75 カラムを用いてゲルろ過した時、Fig. 1 に見られるように、カラムの void volume よりもかなり遅れて溶出されたフラクションに坂口反応 ($A_{500\text{nm}}$) の大きなピークが観察された。Arginine 残基を含むペプチド断片は、その鎖長と Arginine 残基の含量などの点で不均一であると思われる。

たが、得られたペプチド断片をそのままリガンドとして使用することにした。

Table 1 に示されるように、Arg-peptide-Sepharose 4B の塩酸加水分解物から検出されたアミノ酸は Arginine, Serine, Proline, Valine と Isoleucine であった。問題の Arginine はゲル 1.0 ml 当たり約 19 μ moles 検出された。Serine, Proline, Valine と Isoleucine の含量は Arginine のそれに比べてかなり低かったことから、ある一本のペプチド断片にはかなり多くの Arginine 残基が含まれていることが暗示された。調製されたゲルには確かに Arg-peptide が結合していると思われたので、その Arg-peptide-Sepharose 4B を cathepsin B (B1 と B2) の affinity chromatography の担体として使用した。

20 mM β -mercaptoethanol と 1.0 mM EDTA \cdot 2Na を含む 0.01 M 酢酸緩衝液、pH 4.7 に平衡化しておいた Arg-peptide-Sepharose 4B カラム (0.9 \times 10 cm) に、すでに活性化しておいた粗酵素液を 3 回に分けて添加した。Fig. 2 に見られるように、カラムを素通りしたフラクションには cathepsin B1 と B2 の活性は全く検出されなかった。しかしながら、0.5 M NaCl を含む 0.01 M 酢酸緩衝液、pH 4.7 によって溶出してきたフラクションに BAA 加水分解と BANA 加水分解活性が検出された。なお、1.0 M NaCl を含む 0.01 M 酢酸緩衝液、pH 4.7 を用いてゲルに吸着されたタンパク質の溶出を試みたが、タンパク質は殆んど全く溶出してこなかった。

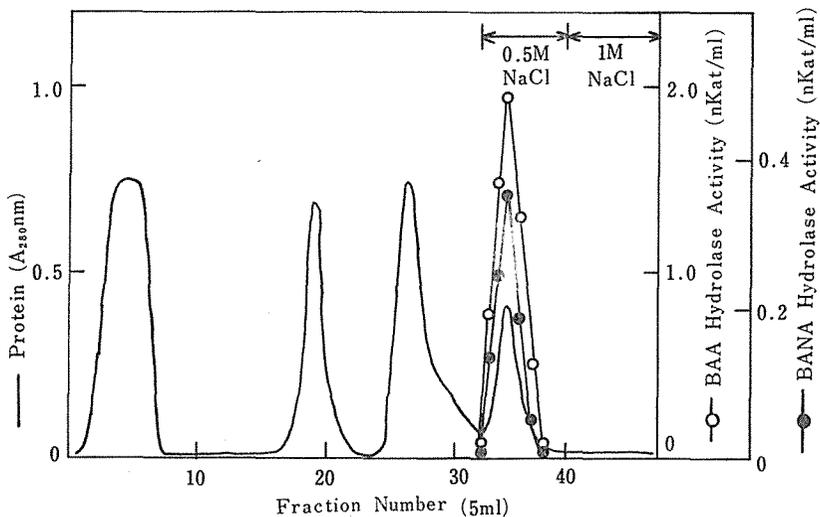


Fig. 2. Affinity chromatography of cathepsin B in the crude enzyme solution from the liver of *D. bleekeri* on Arg-peptide-Sepharose 4B.

BANA と BAA に対して活性なフラクションに含まれているタンパク質成分の数を調べるために、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その泳動パターンを Fig. 3 に示す。強く染色された 1 本のタンパク質バンドと弱く染色された 2 本のタンパク質バンドが観察された。1 段階のカラム操作で、わずかに 3 成分のタンパク質にまで精製されたことになること、また BANA 加水分解活性の収量は約 100% であり、BAA 加水分解活性のそれは約 90% であったことから、この chromatography はいわゆるイオン交換的ではなく、親和性にもとづいていると考えられる。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動において 3 成分のタンパク質が観察されたことから、上記の BANA と BAA に対して活性なフラクションには cathepsin B1 の他に cathepsin B2 が含まれていると考えられた。その活性フラクションを、あらかじめ 0.2 M NaCl を含む 0.01 M 酢酸緩衝

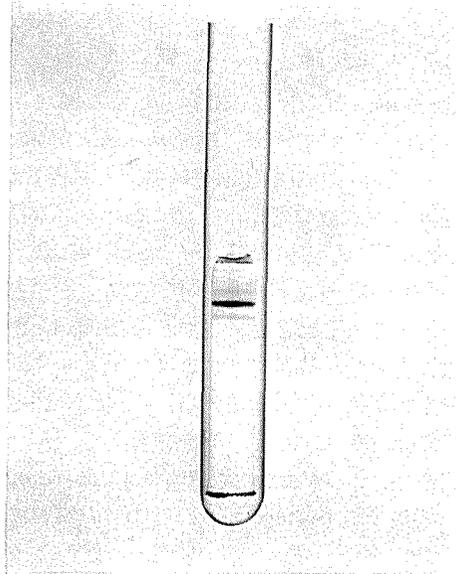


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of active fraction from affinity chromatography.

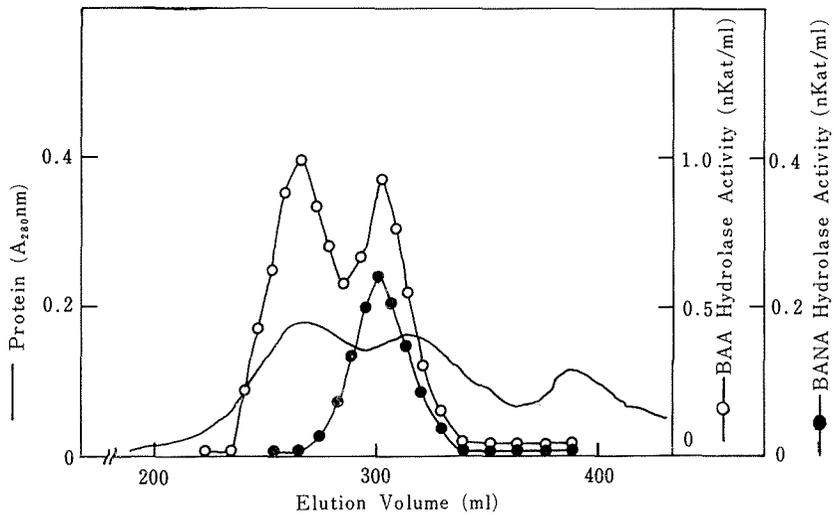


Fig. 4. Gel filtration of active fraction from affinity chromatography on Sephadex G-100. (2.5×90 cm)

液, pH 4.7 で平衡化しておいた Sephadex G-100 カラム (2.5×90 cm) を用いてゲルろ過した。Fig. 4 はその溶出パターンである。そのゲルろ過によって, BAA 加水分解のみを触媒する cathepsin B2 と BAA と BANA の加水分解を触媒する cathepsin B1 が分離された。なお, cathepsin B1 よりも遅れて溶出される未知の物質が存在した。

これらの実験事実にもとづいて, Arg-peptide-Sepharose 4B による affinity chromatography は粗酵素液から cathepsin B1 と B2 を精製する方法として非常にすぐれていると思われる。

摘 要

組織のホモジネートから cathepsin B (B1 と B2) [EC 3. 4. 22. 1] を効率的に精製するために affinity chromatography を試みた. ヤリイカ, *Dorytheuthis bleekeri*, の肝臓から単離された cathepsin B1 によるプロタミン硫酸塩の限定加水分解によって得られる arginine 残基を含むペプチド断片 (Arg-peptide) をリガンドとして使用した. 臭化シアン法によってその Arg-peptide を Sepharose 4B に結合させた. その Arg-peptide-Sepharose 4B は, 20 mM β -mercaptoethanol と 1.0 mM EDTA \cdot 2Na を含む 0.01 M 酢酸緩衝液, pH 4.7 に平衡化されたとき, 粗酵素液に含まれる活性化された cathepsin B を吸着した. 吸着された cathepsin B は 0.5 M NaCl を含む上記の緩衝液によって溶出された. この溶出液はポリアクリルアミドゲル電気泳動において1本の主バンドの他に2本の副バンドを与えた. この溶出液を, 0.2 M NaCl を含む 0.01 M 酢酸緩衝液, pH 4.7 に平衡化しておいた Sephadex G-100 カラムを用いて, ゲルろ過することによって, cathepsin B1 と B2 を互に分離することができた. Arg-peptide-Sepharose 4B によるこの Affinity chromatography は粗酵素液からの cathepsin B1 と B2 の精製に対してすばらしい結果をもたらした.

文 献

- 1) Snellman, O. (1969). *Biochem. J.*, **114**, 673.
- 2) Otto, K. (1967). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 1449.
- 3) Barrett, A. J. (1973). *Biochem. J.*, **131**, 809.
- 4) Ogino, K. and K. Nakanishi (1974). *J. Biochem.*, **75**, 723.
- 5) 稲葉 喬, 原 松次, 末永邦雄, 藤井 実 (1975). 佐賀大農彙, **38**, 31.
- 6) Inaba, T., N. Shindo and M. Fujii (1976). *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1159.
- 7) 稲葉 喬, 山田和久, 竹井 宏 (1978). 佐賀大農彙, **45**, 27.
- 8) Otto, K. (1971). *Tissue Proteinase*, ed. by A. J. Barrett and J. T. Dingle, North-Holland Publishing, Amsterdam, pp. 1.
- 9) Axén, R., J. Porath and S. Ernback (1967). *Nature (London)*, **214**, 1309.
- 10) 半場考義, 中田裕康, 横沢英良, 石井信一 (1974). 生化学, **46**, 430.
- 11) Cuatrecasas, P. and I. Paritkh (1972). *Biochemistry*, **11**, 2291.
- 12) Davis, B. J. (1964). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404.
- 13) Diezel, W., G. Kopperschlager and E. Hofman (1972). *Anal. Biochem.*, **48**, 617.