

Cathepsin B1 の阻害因子の存在とその部分的精製

稲葉 喬・平山弥生樹・蒲地 敦子・藤永 典久

(生物化学教室)

昭和53年5月31日 受理

Occurrence of Inhibitory Factor of Cathepsin B1 and Its Partial Purification

Takashi INABA, Yaoki HIRAYAMA, Atsuko KAMOCHI
and Norihisa FUJINAGA

(Laboratory of Biological Chemistry)

Received May 31, 1978

Summary

An inhibitory factor of cathepsin B1 [EC 3. 4. 22. 1] which had been isolated from the liver of squid, *Dorytheuthis bleekeri*, was found to occur in the same tissue. It was kept stable when treated at 100°C for 10 min. It passed through a Visking tube (#18/32) for dialysis and a PM-10 membrane filter for ultrafiltration, while it was retained on an UM-2 membrane filter for ultrafiltration.

The inhibitory factor was partially purified from the homogenate of the same tissue by the following procedures: heat treatment for 15 min at 100°C, gel filtration on Sephadex G-10 and G-50, and DEAE-Sephadex A-25 column chromatography. The partially purified inhibitory factor was most stable at pH 5-6, considerably stable at pH 6-10, and slightly unstable at pH 5 or below. The gel filtration of the factor on Sephadex G-75 showed that it had a molecular weight of about 2,500. The mode of the inhibition of cathepsin B1 by the inhibitory factor was found to be competitive.

緒 言

動物の臓器のタンパク質加水分解酵素のインヒビターに関するこれまでの多数の資料は R. Vogel ら¹⁾ によってまとめられている。

我々はすでにスルメイカ, *Ommatostrephes sloani pacificus*, およびヤリイカ, *Dorytheuthis bleekeri*, の肝臓から cathepsin B1 を単離したが^{2),3)} 肝臓の抽出液を硫酸分別する過程で, しばしば cathepsin B1 の活性が増大した。この現象は, ヤリイカの肝臓の抽出液に cathepsin B1 を阻害する因子が含まれていることを暗示した。Greenbaum ら⁵⁾ は, 牛のヒ臓から cathepsin B をはじめて部分的に精製した時, その阻害因子が存在する可能性を示唆していたが, これまでその本体は全く知られていない。

ヤリイカの肝臓から単離した cathepsin B1 を用いて, 同じ組織中に存在するであろうと考えられた阻害因子の本体を究明することは意義があると考えられる。

本研究では, ヤリイカ肝臓におけるその存在とその部分的精製について述べる。

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, 使用されるまでディープ・フリーザー中に保存された。

α -N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide (BANA) と α -N-benzoyl-L-argininamide (BAA) はタンパク質研究奨励会 (大阪) から購入された。cytochrome C および bacitracin は Schwarz/Mann 社から得られた。insulin B chain は, Sigma Chemical 社から購入された牛の insulin を, われわれの研究室において Sanger の方法¹⁾ に従って過ギ酸々化した後, 分離・調製された標品であった。cathepsin B1 は, 前報³⁾ に従ってヤリイカの肝臓から精製された標品であった。DEAE-Sephadex A-25 および Sephadex 類 (G-10, G-50 および G-75) は Pharmacia Japan 社から購入された。

限外ろ過膜 (PM-10 および UM-2) および加圧セル (UF-202 および UF-12) は Amicon Far East 社から得られた。

Cathepsin B1 に対する阻害活性の測定

cathepsin B1 の BANA 加水分解活性に対する阻害活性を測定する場合は, cathepsin B1 溶液 300 μ l に阻害因子水溶液 900 μ l を加えて混合液から 500 μ l 分取した後, 前報³⁾ に従って残存する BANA 加水分解活性を定量した。コントロールとして, 阻害因子水溶液の代りに水を加えた混合液について同じ操作を行った。阻害因子の活性は相対活性で表示された。また, cathepsin B1 の BAA 加水分解活性に対する阻害活性を測定する場合は, cathepsin B1 溶液と阻害因子水溶液を含む上記の混合液から 100 μ l 分取した後, 前報³⁾ に従って残存する BAA 加水分解活性を定量した。その活性は相対活性で表示された。

阻害因子の濃度の測定

阻害因子の濃度は, 阻害因子を含む水溶液の波長 270 nm における吸光度 (A_{270nm}) を測定することによって定量された。

阻害因子の濃縮

種々の塩を含む阻害因子水溶液を, あらかじめ水に平衡化しておいた Sephadex G-10 カラムを用いてゲルろ過した後, そのカラムの void volume の位置で溶出するフラクションを集めて, 凍結乾燥することによって, 阻害因子を濃縮した。

結果および考察

阻害因子の存在

ヤリイカ, *D. bleekeri*, の肝臓中に cathepsin B1 を阻害する因子が存在するという可能性を検討するために, 下記の実験を行った。前報³⁾ に従って, 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 4.7, を用いてヤリイカ肝臓の抽出液を調製した。その抽出液を固体硫酸を用いて分別することによって, 0-30%飽和画分, 30-80%飽和画分と80-100%飽和画分を得た。それらのうち30-80%飽和画分には cathepsin B1 が含まれたので, それを粗酵素液として用いた。その他の画分には cathepsin B1 活性は検出

されなかった。一定濃度の粗酵素液に種々の量の 0-30%飽和画分を加えた混合液について、残存する cathepsin B1 活性を調べた。Fig. 1 に見られるように、0-30% 飽和画分の存在下で、BAA 加水分解活性と BANA 加水分解活性はいずれも低下した。粗酵素液のタンパク質濃度と 0-30% 飽和画分のタンパク質濃度の比が 1 のとき、BANA 加水分解活性は約 25% 低下し、また BAA 加水分解活性は約 90% 低下した。なお、80-100% 飽和画分には全く阻害活性は検出されなかった。

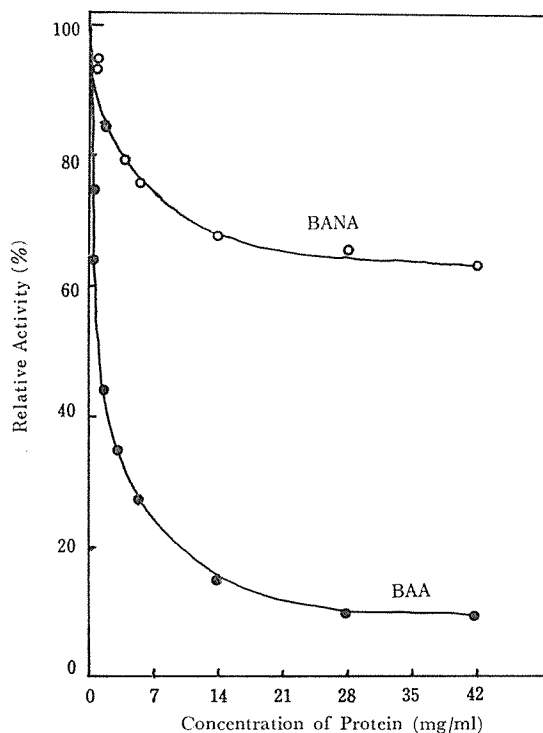


Fig. 1. Inhibition of BAA and BANA hydrolase activities in crude enzyme solution by ammonium sulfate fraction (0-30% saturation).

この事実から、ヤリイカ肝臓の抽出液に cathepsin B1 を阻害する未知の因子が含まれていることが推察された。阻害因子のおおよその大きさを調べるために、種々の限外ろ過膜を用いてその透過性を調べた。阻害因子を含む抽出液を Visking tube (#18/32) に入れて、0.01 M 酢酸緩衝液、pH 4.7、に対して 4°C で 17 時間透析した後、透析内液に残存している阻害活性を調べた。また、限外ろ過膜 PM-10 (分子量 10,000 以上のタンパク質を保持する) と UM-2 (分子量 1,000 以上のペプチドを保持する) を用いて、阻害因子の膜透過性を調べた。それらの結果は Table 1 にまとめられている。その阻害因子は、透析によって完全に外液に失われた。限外ろ過において、阻害因子は PM-10 膜に保存されず、膜を通過したろ液にその阻害活性が検出された。また、その阻害因子は UM-2 膜に保持された。それらの事実から、その阻害因子は、分子量 1,000-10,000 の範囲の分子であろうと推察された。次に、阻害因子の耐熱性を調べるために、上記の抽出液を沸とう水上で 10 分間加熱した。生じた沈でん物を遠心分離 (6,000×g, 20 分間) によって除去することによって得られた上清について阻害活性を調べた。Table 2 に見られるように、その熱処理に対して阻害因子は安定であるように思われた。

Table 1 Permeability of Inhibitory Factor of Cathepsin B1 through Membranes

Membrane		Relative Inhibitory Activity (%)
Visking Tube (#18/32)	Inner Solution	113
	Outer Solution	49
PM-10	Inner Solution	126
	Inner Solution	59
	Outer Solution	100
	Control	100

Table 2 Thermal Stability of Inhibitory Factor of Cathepsin B1

	Relative Inhibitory Activity (%)
Before Treatment	100
After Treatment at 100°C for 10 min	84

それらの実験事実から, cathepsin B1 が存在するヤリイカの肝臓には, それを阻害する因子が存在していることが示唆された. その因子は熱に対して非常に安定であり, しかもその分子量は 1,000-10,000 の範囲にあることが推察された.

阻害因子の部分的精製

阻害因子の本体を明らかにするために, その精製を試みた.

1. 抽出 ヤリイカの肝臓を細切し, その重量と等容量の水を加えてワーリング・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, ただちにそのろ液を 100°C で 15 分間加熱した. 生成した沈でん物を除去するために, その混合物を 10,000×g で 20 分間遠心分離した. 得られた上清は凍結乾燥された.

2. Sephadex G-10 によるゲルろ過 凍結乾燥物 (1.5 g) を 15 ml の水に溶解した後, その水溶液を, あらかじめ水に平衡化しておいた Sephadex G-10 カラム (3.5×33 cm) を用いてゲルろ過した. Fig. 2 に見られるように, 3 つの A_{270nm} のピークが観察されたが, カラムの void volume の位置に溶出されたピークのみが阻害活性と一致した. 阻害活性を有するフラクションを集めて, 凍結乾燥した.

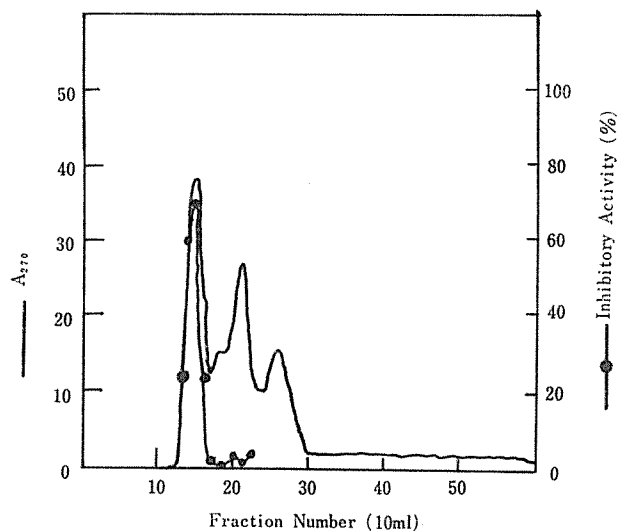


Fig. 2. Gel filtration of crude inhibitory factor on Sephadex G-10.

3. Sephadex G-50 によるゲルろ過 上記の乾燥物 (約 800 mg) を水に溶解した後、あらかじめ水に平衡化しておいた Sephadex G-50 カラム (5×37 cm) を用いてゲルろ過した。Fig. 3 に見られるように、阻害因子はカラムの void volume の位置からかなり遅れて溶出された。阻害活性を示したフラクションを集めて、凍結乾燥した。

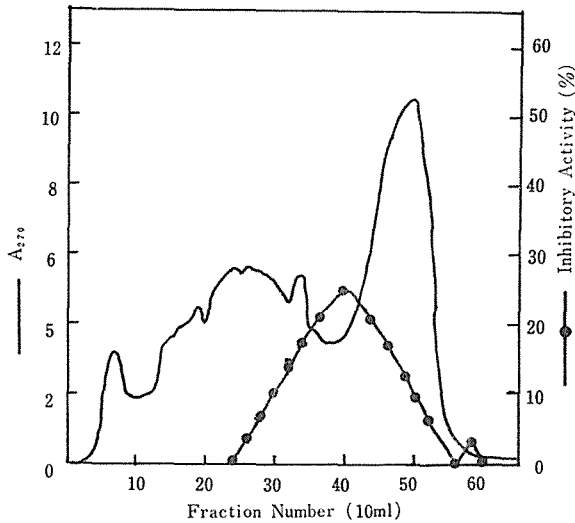


Fig. 3. Gel filtration of inhibitory factor on Sephadex G-50.

4. DEAE-Sephadex A-25 によるカラムクロマトグラフィー 上記の乾燥物 (100 mg) を 0.02 M ギ酸アンモニウム (pH 6.8) に溶解した。その溶液を、同じ溶媒に平衡化しておいた DEAE-Sephadex A-25 カラム (1.3×15 cm) に添加した後、塩濃度を 0.02-2.0 M まで直線的に上げながら溶出を行った。Fig. 4 にそのクロマトグラムを示す。カラムを素通りしたフラクション

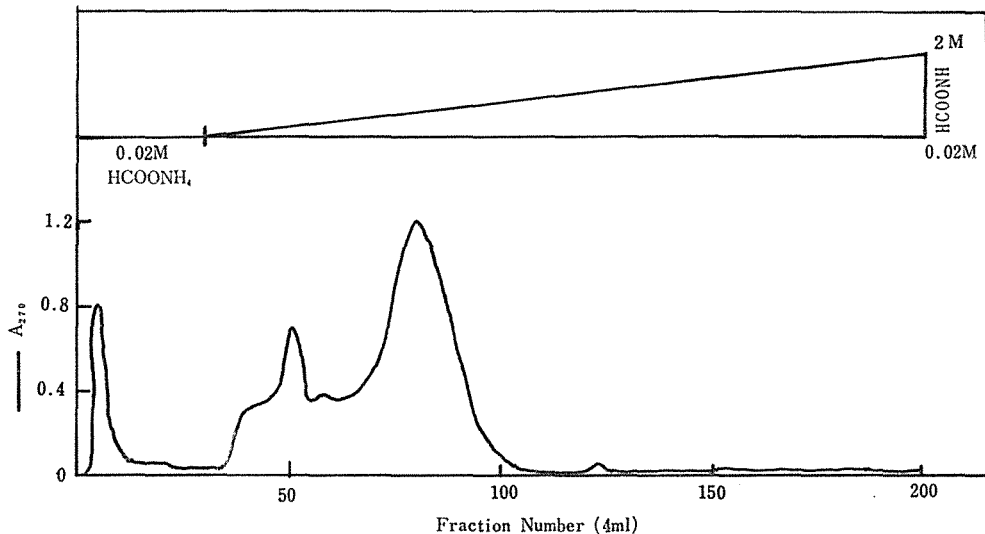


Fig. 4. DEAE-Sephadex A-25 column chromatography.

(番号 3-13), 0.25 M 附近で溶出したフラクション (番号 35-53) と 0.6 M 附近で溶出したフラクション (番号 66-100) を別々に集めた. それらのフラクションを, 別々に, あらかじめ水に平衡化しておいた Sephadex G-10 カラムを用いてゲルろ過した. Fig. 5, Fig. 6 および Fig. 7 にそれらの溶出パターンと阻害活性を示す. 素通りのフラクションと 0.6 M ギ酸アンモニウムで溶出されたフラクションには阻害活性は殆んど認められなかったが, Fig. 6 に見られるように, 0.25 M ギ酸アンモニウムで溶出されたフラクションに阻害活性が検出された. この段階まで精製された阻害因子の比活性は, Sephadex G-10 によるゲルろ過の溶出液のそれを基準にして, 約7.5 倍に上昇した. この段階まで精製された標品を用いて, 阻害因子の性質を調べた.

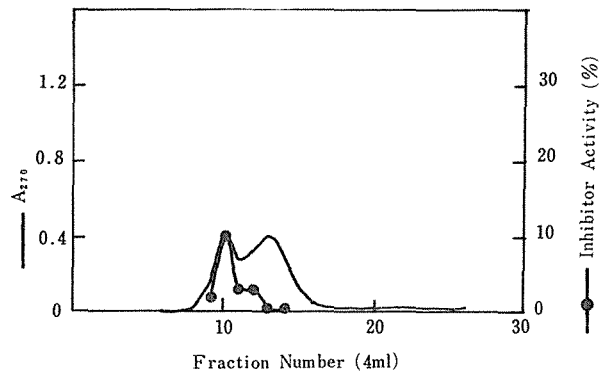


Fig. 5. Gel filtration of fraction passing through the column of DEAE-Sephadex A-25 on Sephadex G-10.

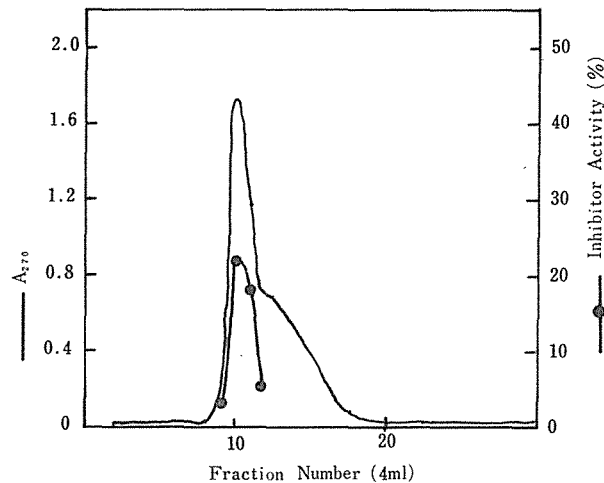


Fig. 6. Gel filtration of fraction eluted at 0.25 M HCOONH₄ through Sephadex G-10 column.

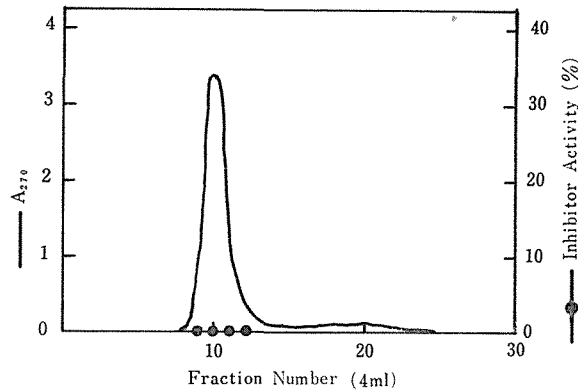


Fig. 7. Gel filtration of fraction eluted at 0.6 M HCOONH₄ through Sephadex G-10.

部分的に精製された阻害因子の性質

Table 3 にまとめられているように、この阻害因子標品は、ビュレット反応、ニンヒドリン反応、キサントプロテイン反応、坂口反応に陽性であった。しかしながら、20% TCA (trichloroacetic acid) によって沈でんしなかった。また、Fehling 反応、Molish 反応、Anthrone 反応、フェノール-硫酸反応、および Somogyi-Nelson 反応に対してすべて陰性であった。従って、その部分的に精製された標品には糖は存在せず、ポリペプチド性の物質である可能性が強くなったように思われた。

Table 3 Some Qualitative Tests of Inhibitory Factor

Reaction	
Biuret	+
Ninhydrin	+
Xanthoprotein	+
Sakaguchi	+
Folin	+
20% TCA	-
1.0% CuSO ₄	-
Fehling	-
Molisch	-
Anthrone	-
Aminosugar	-
Phenol-H ₂ SO ₄	-
Somogyi-Nelson	-

阻害因子の分子量を推定するために、阻害因子水溶液を、あらかじめ 0.2 M NaCl に平衡化された Sephadex G-75 カラム (1×100 cm) を用いてゲルろ過した。カラムの void volume は blue dextran 2000 を用いて測定された。標準タンパク質或いはポリペプチドとして、cytochrome C (M. W. 12,400), insulin B chain (5,388.6) と bacitracin (1,450) を用いた。各標準物質と阻害因子の溶出容量 (V_e) と void volume (V₀) との比をたて軸に、横軸にはそれらの分子量の常用対数

をプロットした。Fig. 8 に示されているように、阻害因子の分子量は約2,500であると推定された。

Fig. 9 に見られるように、部分的に精製された標品は275nmに極大吸収を示し、257nmに吸収の極小値を与えた。すなわち、トリプトファン残基にもとづく280nmにおける強い吸収は認められず、むしろチロシン残基にもとづく270nm附近に極大吸収が認められた。

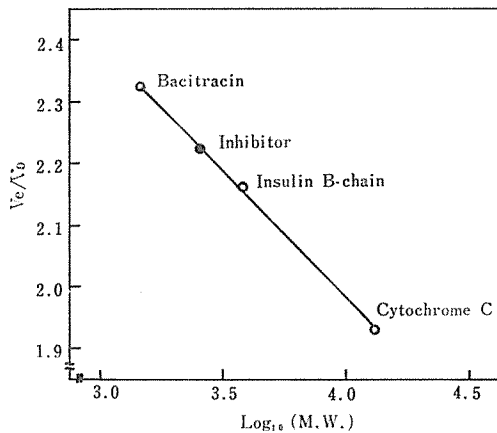


Fig. 8. Determination of molecular weight of inhibitory factor by gel filtration on Sephadex G-75.

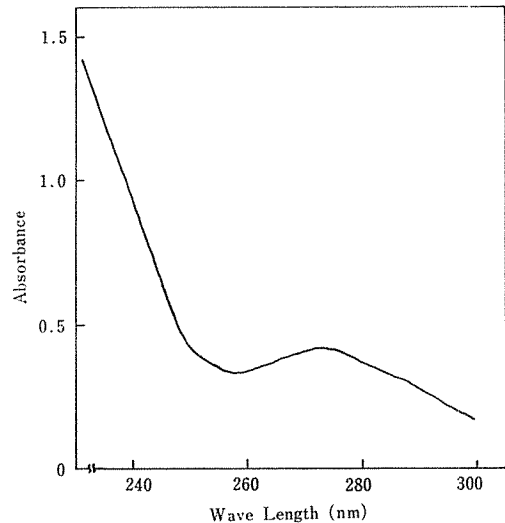


Fig. 9. UV-spectrum of partially purified preparation of inhibitory factor.

阻害因子による cathepsin B1 の阻害様式を調べるために、阻害因子の存在下と非存在下において種々の濃度の BANA を用いて、cathepsin B1 による BANA 加水分解反応の初速度を測定した。その結果を Fig. 10 に示す。阻害因子による cathepsin B1 の阻害は典型的に拮抗型であった。

阻害因子の pH 安定性を調べるために、部分的に精製された標品をイオン強度 0.1 の各種緩衝液、すなわち酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液と炭酸ナトリウム緩衝液、および 0.1 M HCl と 0.1 M NaOH 中で 3 日間、4°C に静置した。各混合液の pH を 4.5 に調整し、容量を一定に調整した後、残存する阻害活性を測定した。Fig. 11 に見られるように、阻害因子は pH 5.5 以下でやや不安定であったが、pH 5.5-pH 10 までの範囲で安定であった。また、0.1 M NaOH 中でも、阻害因子の残存活性は 97.5% であった。

上記の実験結果から、cathepsin B1 が存在する肝臓中には確かにそれを阻害する因子が存在することが明らかになった。その阻害因子はかなり高度に精製されたように思われたが、その均一性について検討されていない。しかしながら、間接的な知見にもとづいて、その阻害因子はポリペプチドであると考えられる。また、その分子量は Sephadex G-75 によるゲルろ過法によって約 2,500 であると推定された。cathepsin B1 の阻害因子がかなり小さなポリペプチドであることは、その治療面への応用の可能性¹⁾を今後追求する時、特に興味深い。実際、その阻害因子は、これまで種々の臓器から単離されたタンパク質分解酵素のインヒビター¹⁾(分子量約 6,000-12,000)よりもはるかに小さな分子であろう。また、その阻害因子による cathepsin B1 の阻害が拮抗的であったという事実から、その因子に代謝調節的機能があるのではないとも考えられる。

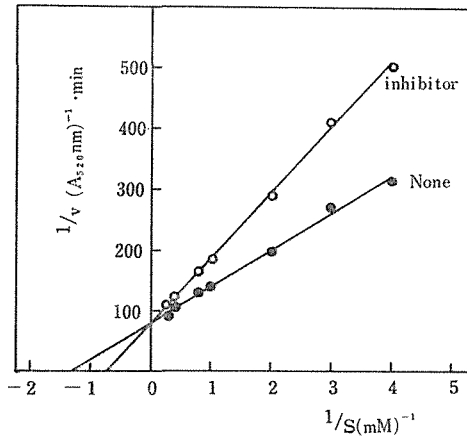


Fig. 10. Lineweaver-Burk plot of BANA concentration against activity of cathepsin B1 in the presence and in the absence of inhibitory factor.

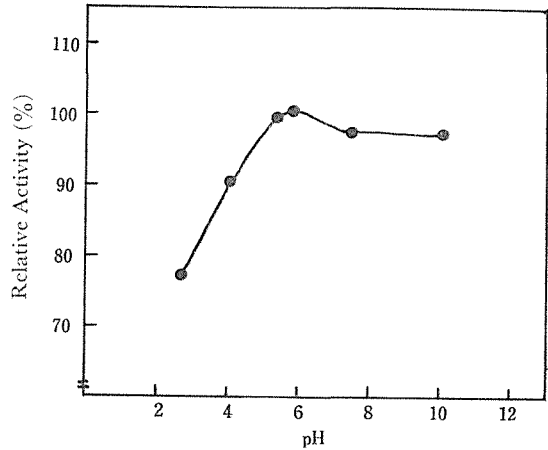


Fig. 11. pH-stability of inhibitory factor.

摘 要

ヤリイカ, *Dorytheuthis bleekeri*, の肝臓の cathepsin B1 (EC 3. 4. 22. 1) を阻害する因子が同じ肝臓中に存在することが見出された。その阻害因子は、100°C で10分間処理された時も安定であった。阻害因子は透析用の Visking tube (#18/32) の膜を透過し、限外ろ過膜 PM-10 を透過したが、限外ろ過膜 UM-2 に保持された。その阻害因子は、肝臓のホモジネートから下記の操作によって部分的に精製された：100°C で15分間の熱処理、Sephadex G-10, G-50 によるゲルろ過と DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィー。部分的に精製された阻害因子は pH 5-6で最も安定であり、pH 6-10 の範囲でもかなり安定であったが、pH 5 以下ではやや不安定であった。Sephadex G-75 によるゲルろ過によって、その阻害因子の分子量は約2,500であることが推定された。阻害因子による Cathepsin B1 の阻害は拮抗的であった。

文 献

- 1) Vogel, R., I. Trautschold and E. Werle (1966). *Naturürliche Proteinase-Inhibitoren*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 蛋白質分解酵素インヒビター, (1974). 鈴木友二, 長沢滋治, 山口 登 訳 共立出版, pp. 77-120
- 2) 稲葉 喬, 原 松次, 末永邦雄, 藤井 実 (1975). 佐賀大農彙, 38, 31
- 3) Inaba, T., N. Shindo and M. Fujii (1976). *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1159.
- 4) Bailey, J. L. (1967). *Techniques in Protein Chemistry*, Elsevier Publishing Co., Amsterdam-London-New York, pp. 114.
- 5) Greenbaum, L. M. and J. S. Fruton (1957). *J. Biol. Chem.*, 226, 173.