

マサバ普通肉中の new カテプシン B の存在

上野 隆二・池田 誠司・青木 恭彦

三重大学生物資源学部

Existence of New Cathepsin B in Mackerel White Muscle

Ryuji UENO, Seiji IKEDA and Takahiko AOKI

Faculty of Bioresources, Mie University

Summary

The present paper was undertaken to investigate the existence of new cathepsin B in mackerel white muscle. The proteinase hydrolyzing Z-Arg-Arg-methylcoumarylamide was separated into two fractions (Peaks-1 and -2) from mackerel muscle by Q Sepharose Fast Flow ion exchange chromatography, followed by Cellulofine GC-200 gel filtration. The enzyme in Peak-1 strongly hydrolyzed Z-Arg-Arg-methylcoumarylamide, and that in Peak-2 hydrolyzed Z-Phe-Arg-Arg- and Bz-Phe-Val-Arg-methylcoumarylamides much more than Z-Arg-Arg-methylcoumarylamide. The enzyme in Peak-1 shared several properties with that in Peak-2 as follows; inhibition by leupeptin, antipain, PCMB, and HgCl₂, activation of sulfhydryl reagents, and degradation of hemoglobin and albumin. Consequently, both enzymes were found to be a cysteine proteinase that show some similarities to cathepsin B. Moreover, the proteinase in Peak-1 was suggested to be a new type of cathepsin B, judging from the result of synthetic substrate specificity.

Key words: new cathepsin B, cysteine proteinase, mackerel, white muscle.

リソゾームに存在するプロテアーゼのうち、システインプロテイナーゼはタンパク質に対して幅広い活性を持ち、種々のタンパク質のターン・オーバーにおける生理的機能に関与していると考えられている。魚類筋肉においてもシステインプロテイナーゼの研究は、生理・病理学的にも、また食品としての魚介類の鮮度保持、加工利用においても重要にもかかわらず、ほとんど見当らなかった。近年、魚類筋肉中のシステインプロテイナーゼの存在が注目されるようになり、いくつかの報告がなされている。すなわち、小長谷¹⁾のシロザケ筋肉中のカテプシン L 様酵素、坂田²⁾らのマサバ普通肉中のカテプシン B および L 様酵素、Bonete *et al*³⁾のボラ筋肉中

のカテプシン B、Makinodan *et al*⁴⁾のシログチ筋肉中の熱耐性アルカリプロテイナーゼ、Hara *et al*⁵⁾のコイ普通肉のカテプシン B などである。

著者らは普通肉および魚類特有の血合肉に存在するリソゾームの性質およびその酵素を生化学的に比較する目的で、一連の研究を行ってきた⁶⁻⁹⁾。その結果、マサバ筋肉中に酸性域でヘモグロビン水解活性を有し、ペプスタチンによって阻害されないプロテアーゼ (pepstatin insensitive protease) が存在することを見出した⁹⁾。マサバ普通肉からこのプロテアーゼを分離・精製し、その性質について調べた結果、本酵素はシステインプロテイナーゼの1つであり、カテプシン L および S 様酵素と推定された^{10,11)}。そこで本研究ではマサバ普通肉中の種々のシステインプロテイナーゼの存在について調べた。

た。その結果、筋肉中に pepstatin insensitive protease および既知のカテプシン B に加えて、new type のカテプシン B の存在が認められたので報告する。

実験方法

1. 実験材料

供試魚として本学近郊の魚市場より入手した極めて鮮度のよいマサバ *Scomber japonicus* を用いた。Pepstatin insensitive protease の基質としてヘモグロビン (Worthington 製, U. S. A.), カテプシン B および L の基質として carbobenzoxy-L-Phe-L-Arg-methylcoumarylamide (Z-Phe-Arg-NHMec, ペプチド研究所製), カテプシン B の基質として carbobenzoxy-L-Arg-L-Arg-methylcoumarylamide (Z-Arg-Arg-NHMec, ペプチド研究所製) をそれぞれ用いた。プロテアーゼ阻害剤としてペプスタチン, ロイペプチンおよびアンチパイン (ペプチド研究所製) を用いた。アゾカゼイン, ふっ化フェニルメチルスルホニル (PMSF), 大豆トリプシンインヒビターおよび benzoyl-Phe-L-Val-L-Arg-methylcoumarylamide (Bz-Phe-Val-Arg-NHMec) は Sigma 製, U. S. A. であった。他の試薬はすべて和光純薬製であった。ゲルろ過用およびイオン交換クロマトグラフィー用担体としてセルロフィン GC-200 (Pharmacia 製, Sweden), Q Sepharose Fast Flow (同製) をそれぞれ用いた。なお, イオン交換クロマトグラフィーには高速タンパク液体クロマトグラフィー (FPLC, Pharmacia 製) を使用した。

2. 酵素液の調製

供試魚の表皮を除去し, 背部普通肉を採取した。筋肉を 5 mM メルカプトエタノールを含む 1% NaCl で洗浄後, 2 倍量の同液を加え, ワーリングブレンダー (佐久間製作所製) で 2 分間ホモジナイズした。これにトリトン X-100 を 0.1% になるように加え, 4°C で 30 分間放置した。遠心分離後, 得られた上清液に 1 N HCl を加え, pH 4.0 に調製し, 30 分間放置した。遠心分離後, 上清液に 1 N NaOH を加え, pH 6.0 に再び調製した。この溶液に硫酸アンモニウムを加え, 40-70% 飽和沈殿区を集めた。得られた沈殿を 5 mM メルカプトエタノールを含む 0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.0, に溶解し, 同緩衝液で透析した。遠心分離後, 上清液を酵素液とした。

3. Q Sepharose Fast Flow によるイオン交換クロマトグラフィー

あらかじめ, 上記緩衝液で平衡化された Q Sepharose Fast Flow カラム (直径 2.6×10 cm) に酵素液 100 ml を添加した。非吸着のタンパク質を同液で溶出した後, 1 M NaCl を含む同液で塩濃度勾配溶出を行なった。流速は 5 ml/min, 分画容量は 20 ml であった。

4. セルロフィン GC-200 によるゲルろ過

あらかじめ, 0.1 M NaCl および 5 mM メルカプトエタノールを含む 0.01 M リン酸緩衝液, pH 6.2, で平衡化されたセルロフィン GC-200 カラム (直径 2.6×100 cm) に酵素液 20 ml を添加し, 同緩衝液で溶出した。流速は 0.5 ml/min, 分画容量は 10 ml であった。

5. 酵素活性測定法

プロテアーゼ活性を次のようにして測定した。酵素液 0.25 ml に 1 mM ペプスタチン 0.25 ml と 2.4% 尿素変性ヘモグロビン (pH 4.0) 1.5 ml とを加えた。37°C で 1 時間保温後, 0.6 M トリクロロ酢酸 2 ml を加え, 反応を停止した。37°C で 30 分間保温後, ろ過し, 得られたろ液を上野ら⁶⁾ による蛍光法で測定した。カテプシン B および L 活性測定には Barret and Kirschke¹²⁾ の方法を用いた。すなわち, 酵素液 0.1 ml に 0.1% Brij 35 0.9 ml と 8 mM システインおよび 4 mM EDTA を含む 0.4 M リン酸緩衝液, pH 6.0, 0.5 ml とを加え, 37°C で 5 分間予温した。これにメチルクマリン誘導体 (20 μM) 0.5 ml を加え, 10 分間保温後, 0.1 M モノクロロ酢酸ナトリウムを含む 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 4.3, 2 ml を加え, 反応を停止した。遊離されたメチルクマリンを Ex 340 nm, Em 460 nm の波長で測定した。

6. 基質特異性

基質としてヘモグロビン, アルブミンを用いた場合, 次のようにして活性を測定した。すなわち, 酵素液 0.3 ml に 10 mM ジチオスレイトール 0.2 ml および基質液, pH 5.0, 1.5 ml を加えた。37°C で 3 時間保温後, 0.6 M トリクロロ酢酸 2 ml を加え, 反応を停止した。生じた沈殿をろ過し, ろ液を上野ら⁶⁾ の方法による蛍光法で測定した。アゾカゼインを用いた場合, Barrett and Kirschke¹²⁾ の方法によって活性を測定した。すなわち,

酵素液 0.1 ml に、0.04 M ジチオスレイトールを含む 0.1 M McIlvaine 緩衝液、pH 5.0、0.1 ml および 6 M 尿素を含む 2% アゾカゼイン 0.5 ml を加えた。37°C で 3 時間保温後、3% トリクロロ酢酸 5 ml を加え、さらに 30 分間保温した。生じた沈殿をろ過し、ろ液を 366 nm の波長で測定した。

7. タンパク質の測定

タンパク質を Lowry 法¹³⁾、又は 280 nm の波長で測定した

結 果

1. Q Sepharose Fast Flow によるイオン交換クロマトグラフィー

サバ普通肉から得られた酵素液を用いて Q Sepharose Fast Flow によるイオン交換クロマトグラフィーを行

なった。その結果を Fig. 1 に示した。ヘモグロビン水解活性は塩濃度 0.25 M 付近で、Z-Phe-Arg-NHMec および Z-Arg-Arg-NHMec 水解活性は塩濃度 0.1–0.3 M の幅広い範囲で検出された。メチルクマリン誘導体水解活性画分の場合、数種の酵素の混在の可能性が考えられたので、この活性画分を集めて次の実験に供した。

2. セルロファイン GC-200 によるゲルろ過

上述のようにして得られたメチルクマリン誘導体水解活性画分に固形硫酸アンモニウムを加え、70%飽和沈殿区を集めた。得られた沈殿区を 0.1 M NaCl および 5 mM メルカプトエタノールを含む 0.01 M リン酸緩衝液、pH 6.2、に溶解し、その溶液につき、セルロファイン GC-200 によるゲルろ過を行なった。その結果、Fig. 2 に示すように、Z-Arg-Arg-NHMec を水解する活性画分 (Peak-1) と Z-Arg-Arg-NHMec および Z-Phe-Arg-NHMec を水解する活性画分 (Peak-2) とに分離された。

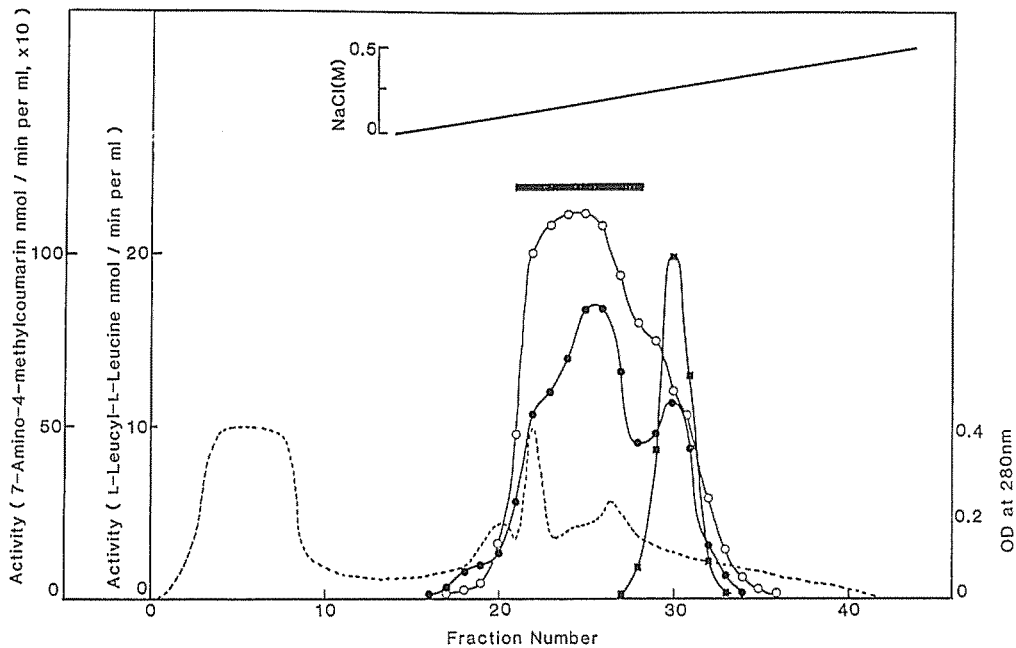


Fig. 1. Q Sepharose Fast Flow ion exchange chromatography of mackerel proteinase after ammonium sulfate fractionation. The enzyme solution (100 ml) was applied to a column of Q Sepharose Fast Flow connected with a FPLC system and eluted in a linear gradient of NaCl in 0.01 M phosphate buffer containing 5 mM mercaptoethanol, pH 7.0, at a flow rate of 5 ml/min. Fractions of 10 ml were collected. ●—● Z-Phe-Arg-NHMec hydrolyzing activity, ○—○ Z-Arg-Arg-NHMec hydrolyzing activity, ■—■ pepstatin insensitive protease activity, ---- protein.

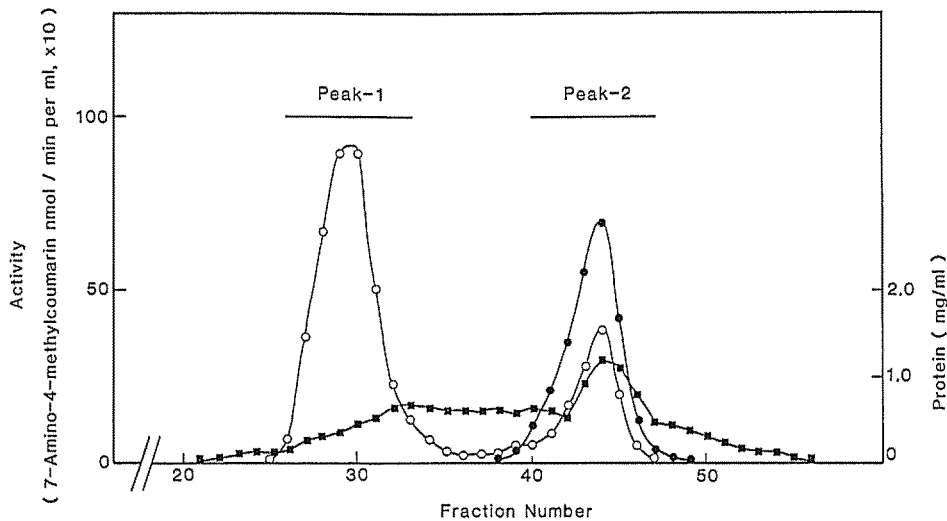


Fig. 2. Cellulofine GC-200 gel filtration of mackerel proteinase after Q Sepharose Fast Flow ion exchange chromatography. The enzyme solution (20 ml) was loaded to a column of Cellulofine GC-200 equilibrated with 0.01 M phosphate buffer containing 0.1 M NaCl and 5 mM mercaptoethanol, pH 6.2, and 10 ml fractions were collected at a flow rate of 30 ml/h. ● —● Z-Phe-Arg-NHMec hydrolyzing activity, ○ —○ Z-Arg-Arg-NHMec hydrolyzing activity, ■ —■ protein.

そこで、これらの活性画分を集め、一般的な酵素学的性質を調べた。

3. 至適 pH

あらかじめ、種々の pH に調製した McIlvaine 緩衝液に溶解した基質を用いてメチルクマリン誘導体活性画分の至適 pH を調べた。その結果、Fig. 3 に示すように、Peaks-1 および 2 の至適 pH はそれぞれ 6.0 と 7.0 であった。

4. 至適温度

Fig. 4 に示すように、Peaks-1 および 2 ではそれぞれ 35 ならびに 50°C で最大活性が得られた。

5. 種々の化学薬品の影響

メチルクマリン誘導体水解活性におよぼす種々の化学薬品の影響について調べた。すなわち、酵素溶液に種々の濃度の試薬を加え、37°C で 15 分間保温後、残存する活性を測定した。その結果を Table 1 に示した。Peaks-1 および 2 では、活性はいずれもペプスタチンによって

阻害されず、ロイペプチン、アンチパイン、 μ -クロロ安息香酸第二水銀 (PCMB)、塩化水銀によって著しく阻害された。セリンプロテイナーゼの阻害剤であるダイズトリプシンインヒビターおよび PMSF によってほとんど影響を受けなかった。また、本活性はメルカプトエタノール、システイン、ジチオスレイトールによって著しく賦活された。

6. 基質特異性

メチルクマリン誘導体水解活性の基質特異性について調べた。その結果を Table 2 および 3 に示した。Peak-1 では Z-Arg-Arg-NHMec をよく水解し、Z-Phe-Arg-NHMec, Bz-Phe-Val-Arg-NHMec およびカテプシン H に対して特異的な基質である Arg-NHMec に作用しなかった。Peak-2 では Z-Arg-Arg-NHMec に比べ、Z-Phe-Arg-NHMec および Bz-Phe-Val-Arg-NHMec を水解し、Arg-NHMec に作用しなかった。なお、両画分において、アルブミンよりヘモグロビンをよく水解したが、いずれもアゾセインに作用しなかった。

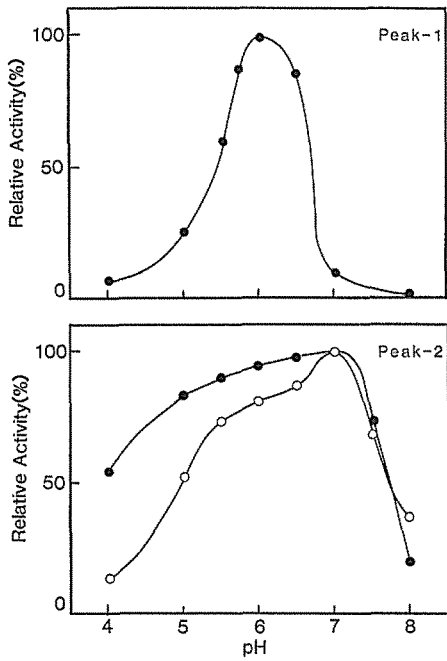


Fig. 3. Effect of pH on the activities of mackerel proteinases, Peaks-1 and -2. The enzyme activity was measured over a pH range from 4.0–8.0 in McIlvaine buffer. The reaction mixture containing Z-Phe-Arg- or Z-Arg-Arg-NHMeC as substrate was incubated at 37°C for 10 min, and the fluorescence was measured. ●—● Z-Arg-Arg-NHMeC hydrolyzing activity, ○—○ Z-Phe-Arg-NHMeC hydrolyzing activity.

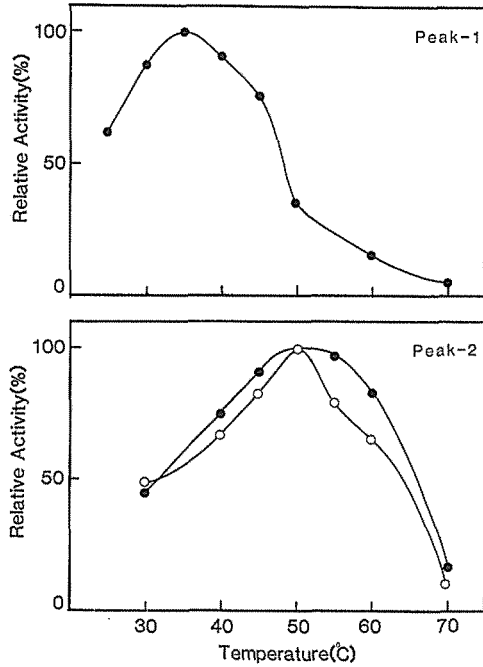


Fig. 4. Effect of temperature on the activities of mackerel proteinases, Peaks-1 and -2. The enzyme activity was assayed under the conditions described in the text except that the temperature was varied as indicated. ●—● Z-Arg-Arg-NHMeC hydrolyzing activity, ○—○ Z-Phe-Arg-NHMeC hydrolyzing activity.

Table 1. Effect of various substances on the activities of mackerel proteinases, Peaks-1 and -2

| Chemicals | Final concentration (mM) | Relative activity (%) | |
|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|--------|
| | | Peak-1 | Peak-2 |
| Cysteine + EDTA | 2, 1 (each) | 100 | 100 |
| Pepstatin | 0.025 | 96 | 94 |
| Leupeptin | 0.025 | 0 | 2 |
| Antipain | 0.025 | 0 | 0.9 |
| PCMB | 1 | 9 | 2 |
| HgCl ₂ | 1 | 0 | 0 |
| Phenylmethylsulfonyl fluoride | 1 | 99 | 89 |
| Soybean trypsin inhibitor | 1 mg/ml | 100 | 96 |

Table 2. Activities of mackerel proteinases, Peaks-1 and -2, against methylcoumarylamide derivatives

| Substrate | Relative activity (%) | |
|----------------------|-----------------------|--------|
| | Peak-1 | Peak-2 |
| Z-Arg-Arg-NHMec | 100 | 100 |
| Z-Phe-Arg-NHMec | 6.6 | 192 |
| Arg-NHMec | 8.0 | 1.9 |
| Bz-Phe-Val-Arg-NHMec | 2.7 | 194 |

Table 3. Activities of mackerel proteinases, Peaks-1 and -2, against various proteins

| Substrate | Activity | |
|--------------------------|----------|--------|
| | Peak-1 | Peak-2 |
| Hemoglobin* ¹ | 144 | 306 |
| Albumin* ¹ | 30 | 24 |
| Azocasein* ² | 0 | 0 |

*¹ The enzyme activities were expressed as L-Leucyl-L-Leucine nmol/hr per ml.

*² The enzyme activities were expressed as O. D. at 366 nm.

考 察

マサバ普通肉に存在する種々のプロテイナーゼの分布を知るため、筋肉抽出液を酸処理、硫酸分画した後、得られた酵素液について Q Sepharose Fast Flow によるイオン交換クロマトグラフィーを行なった。その結果、ヘモグロビン水解活性を示す画分とメチルクマリン誘導体水解活性を示す画分とが得られた。前者はペプスタチンで阻害されず、ロイペプチンによって阻害されることから pepstatin insensitive protease であると推定した^{10,11)}。一方、後者の画分を集め、さらにセルロフィン GC-200 によるゲルろ過を行なったところ、2つの活性画分に分離された。そこで、これらの画分に含まれる酵素の一般的性質を調べた。一般に、システインプロテイナーゼは活性部位に SH 基を持ち、酸性域でタンパク質や合成基質を水解し、ロイペプチン、アンチパインによって阻害されることが知られている。また、現在までカテプシン B, H, L および S などのシステインプロテイナーゼが種々の動物組織中で見いだされている¹⁴⁻²⁰⁾。本実験において、Peaks-1 および 2 の画分に含まれる 2つの

酵素はいずれもヘモグロビンを分解し、ロイペプチン、アンチパイン、PCMB、塩化水銀によって阻害され、かつ SH 保護剤によって賦活されることから、システインプロテイナーゼの 1つであると判断した。またカテプシン B に対して特異的な基質である Z-Arg-Arg-NHMec を強く分解することからカテプシン B 様酵素と推察された。とくに、Peak-2 に存在する酵素はアゾカゼインに作用しないことを除き、既知のカテプシン B の性質に非常に類似していた^{16,20,21)}。最近、Hara *et al.*⁵⁾ はコイ筋肉から精製されたカテプシン B の性質について詳細な報告をしている。その結果と比較すると、Peak-2 の酵素はコイ筋肉カテプシン B と同様のものと推定された。一方、Peak-1 の酵素は、合成基質に対する特異性、至適温度および pH において Peak-2 のそれと異なっていた。この酵素と類似の性質を示す既知のシステインプロテイナーゼはなく、もし Z-Arg-Arg-NHMec に対して強い水解活性を有する酵素をカテプシン B と定義されるならば、本酵素は new type のカテプシン B と推察される。なお、本酵素は、Peak-2 のものと同様にヘモグロビン、アルブミンのようなタンパク質に対して作用することから、筋肉内でのタンパク質のターン・オーバーに関与していると考えられる。それゆえ、今後この酵素を分離・精製し、性質を詳細に調べることにより、生理・生化学的意義を解明するつもりである。

文 献

- 1) KONAGAYA, S. Proteases responsible for softening or chum salmon caught during spawning migration, *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **No. 116**: 39-47 (1985).
- 2) SAKATA, K., M. MATSUMIYA, A. MOCHIZUKI, and S. OTAKE. Thiol proteases in the ordinary muscle of pacific mackerel, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**: 1865-1870 (1985).
- 3) BONETE, M. J., A. MANJON, F. LLOCA, and J. L. IBORRA. Acid proteinase activity in fish II. Purification and characterization of cathepsins B and D from *Mujil auratus* muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, **78 B**: 207-213 (1984).
- 4) MAKINODAN, Y., Y. YOKOYAMA, M. KINOSHITA and H. TOYOHARA. Characterization of an alkaline proteinase of fish muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, **87**

- B: 1041-1046 (1987).
- 5) HARA, K., A. SUZUKI, and T. ISHIHARA. Purification and characterization of cathepsin from carp ordinary muscle, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**: 1243-1252 (1988).
 - 6) 上野隆二, 森下達雄, 高橋 喬, コイ筋肉のリソゾームカテプシン D 活性測定のための蛍光法の検討, 三重大水研報, **5**: 187-195 (1978).
 - 7) 上野隆二, 森下達雄, 高橋 喬, コイ筋肉組織における細胞内酵素の分布および筋肉リソゾームの性質について, 日水誌, **47**: 207-214 (1981).
 - 8) UENO, R., J. LISTON, and Y. HORIGUCHI. Studies of Lysosomal enzymes in fish muscle tissue-III. Intracellular distribution of enzymes and particle properties of lysosomes in mackerel muscle tissue, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**: 895-900 (1986).
 - 9) UENO, R. and Y. HORIGUCHI. Studies of Lysosomal enzymes in fish muscle tissue-IV. Distribution and some enzymatic properties of acid protease in white and red muscles of mackerel, *Bull. Fac. Fish. Mie Univ.*, **13**: 163-172 (1986).
 - 10) UENO, R., K. SAKANAKA, S. IKEDA, and Y. HORIGUCHI. Purification of pepstatin insensitive protease from mackerel white muscle, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**: 691-697 (1988).
 - 11) UENO, R., S. IKEDA, K. SAKANAKA, and Y. HORIGUCHI. Characterization of pepstatin insensitive protease in mackerel white muscle, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**: 699-707 (1988).
 - 12) BARRETT, A. J., and H. KIRSCHKE. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L, in *Methods in Enzymology*, Vol. **80** (ed. by L. LORAND, Academic Press, Inc.) New York/London. p. 535-561 (1980).
 - 13) LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL. Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275 (1951).
 - 14) KIRSCHKE, H., J. LANGNER, B. WIEDERANDERS, S. ANSORGE, and P. BOHLEY. Cathepsin L. A new proteinase from rat liver lysosomes, *Eur. J. Biochem.*, **74**: 293-301 (1977).
 - 15) EVANS, P. and D. J. ETHERINGTON. Characterization of cathepsin B and collagenolytic cathepsin from human placenta, *Eur. J. Biochem.*, **83**: 87-97 (1978).
 - 16) TOWATARI, T., K. TANAKA, D. YOSIKAWA, and N. KATSUNUMA. Purification and properties of a new cathepsin from rat liver, *J. Biochem.*, **84**: 659-671 (1978).
 - 17) TOWATARI, T., Y. KAWABATA, and N. KATSUNUMA. Crystallization and properties of cathepsin B from rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **102**: 279-289 (1979).
 - 18) SCHWARTZ, W. N. and A. J. BARRETT. Human cathepsin H, *Biochem. J.*, **191**: 487-497 (1980).
 - 19) LOČNIKAR, P., T. POPOVIĆ, T. LAH, I. KREGAR, J. BABNIK, M. KOPITAR, and V. TURK. The bovine cysteine proteinases, cathepsin B, H and S, in *Proteinases and Their Inhibitors, Structure, Function and Applied Aspects* (ed. by V. TURK and L. VITALE), Mladinska Knjiga, Ljubljana, p. 109-116 (1981).
 - 20) MASON, R. W., M. A. J. TAYLOR, and D. J. ETHERINGTON. The purification and properties of cathepsin L from rabbit liver, *Biochem. J.*, **217**: 209-217 (1984).
 - 21) KIRSCHKE, H., P. LOČNIKAR, and V. TURK. Species variations amongst lysosomal cysteine proteinases, *FEBS Letter*, **174**: 123-127 (1984).
 - 22) 勝沼信彦, リソゾームのプロテアーゼと細胞内酵素の分解. 蛋白質・核酸・酵素, **25**: p. 425-433 (1980).