

三重大水産研報
第13号 : 163-172
1986年11月15日

魚類筋肉組織のリソゾーム酵素に関する研究 - IV
サバ普通肉および血合肉における酸性プロテアーゼの分布と
二・三の酵素学的性質について

上野隆二・堀口吉重
三重大学水産学部

Studies of Lysosomal Enzymes in Fish Muscle Tissue - IV
Distribution and Some Enzymatic Properties of Acid
Protease in White and Red Muscles of Mackerel

Ryuji UENO and Yoshishige HORIGUCHI
Faculty of Fisheries, Mie University

The present work was undertaken to investigate the distribution and some enzymatic properties of acid protease in white and red muscles of mackerel. The acid proteases, which had hemoglobin hydrolyzing activity and the optimum pH at 4.0, were separated into six fractions from mackerel muscles by Sephacryl S-200 gel filtration and SI-17 ion exchange chromatography. These fractions of white muscle were designated as WMs-1, -2 and -3, and those of red muscle were as RMs-1, -2 and -3. The proteases in WM-1 and RMs-1 and -2 were inhibited strongly by pepstatin, and those of WMs-2 and -3 and RM-3 by leupeptin. Cathepsins B and C activities were not detected in any of the fractions, but cathepsin A activity was slightly in WMs-1, -2 and -3 and RM-1. Consequently, it might be that the proteases in WM-1 and RMs-1 and -2 were carboxyl proteinase such as cathepsin D, and those of WMs-2 and -3 and RM-3 were thiol proteinase such as cathepsins L and S. The ratio of carboxyl proteinase activity to thiol proteinase activity in mackerel muscle homogenates was 50 : 50 for white muscle and 90 : 10 for red muscles.

Key words : acid protease, muscle lysosomal enzymes, distribution, enzymatic properties, mackerel

種々の動物組織・器官に広く分布する酸性プロテアーゼは、細胞顆粒中おもにリソゾームに存在し、細胞内蛋白質の分解に重要な役割を果たしている。SIEBERT (1962) はほ乳動物に比べ、魚類の死後における魚類の鮮度低下の速さの要因として、後者の高い酸性プロテアーゼ (カテプシン) 活性を指摘した。

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 (上野ら 1978, 1981, 1986)。その結果、サバ普通肉および血合肉を分画遠心法によって細胞分画した際、分画後のリソゾームの標識酵素として用いたカテプシンD活性が血合肉では高く、普通肉では低い回収率を示す結果を得た (上野ら 1986)。一方、コイ普通肉および血合肉 (上野ら 1981)、キンギョ普通肉 (BIRD *et al.* 1969) およびミズテング普通肉 (WARRIER *et al.* 1972) では、分画後における同活性の高い回収率を示す結果を報告している。彼らはこれらの事を細胞分画による筋肉中に存在するカテプシンD活性阻害剤の除去が原因であると推論している。それ故、サバ両筋肉間におけるカテプシンD活性の回収率の相違は阻害剤の存在の有無によると考えられるが、また、カテプシンDの酵素学的性質や存在する種々の酸性プロテアーゼ (カテプシンDを含む) の分布の相違も大きな要因と推察される。そこで、本実験ではサバ普通肉および血合肉における酸性プロテアーゼの分布および二・三の酵素学的性質について調べた。

実験材料および実験方法

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良い マサバ *Scomber japonicus* を用いた。酸性プロテアーゼ、カテプシンA, BおよびCの基質としてそれぞれヘモグロビン (Worthington 製), N-CBZ-L-glutamyl-L-tyrosine (CGT と略す, Sigma 製), Benzoyl-L-argininamide (BAAと略す, Sigma 製) および Glycyl-L-tyrosinamide (GTA と略す, Sigma 製) を用いた。プロテアーゼの阻害剤として生理活性ペプチドであるペプスタチンおよびロイペプチン (ペプチド研究所製) を用いた。他の試薬は全て和光純薬製を用いた。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 Sephacryl S-200 (Pharmacia 製) および Polyanion SI-17 μm (Pharmacia 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は高速蛋白液体クロマトグラフィー (Pharmacia 製) を使用した。

2. 酵素液の調整

供試魚の表皮をはぎとり、普通肉、血合肉をそれぞれ採取した。両筋肉を1% NaClで洗浄後、普通肉の酸性プロテアーゼ活性がとくに微弱なため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 Triton X-100を0.1%になるように加え、4°C, 30分間放置した。遠心分離後得られた上清液を酵素液とした。

3. Sephacryl S-200によるゲルろ過

あらかじめ、0.1M NaClを含む0.01M リン酸緩衝液, pH 7.0, で平衡化にされた Sephacryl カラム (直径 2.6×80 cm) に酵素液20 mlを添加し、流速0.4 ml/minで溶出した。分画容量は10 mlであった。

4. SI-17 カラムによるイオン交換クロマトグラフィー

あらかじめ、0.01M リン酸緩衝液, pH 7.0, で平衡化された SI-17 カラム (直径 1×10 cm) に酵

素液 5 ml を添加し、非吸着の蛋白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 2.0 ml/min, 分画容量は 2 ml であった。

5. 酵素活性測定法

酸性プロテアーゼ活性は次の様にして行なった。酵素液 0.5 ml に 2.4% 尿素変性ヘモグロビン 1.5 ml, pH 4.0, を加え、37 °C, 2 時間反応後、0.6 M トリクロル酢酸 (TCA と略す) 2 ml 加え反応を停止した。37 °C, 20 分間保温後、生じた沈殿をろ過し、得られた TCA 可溶画分を上野ら (1978) による蛍光法で測定した。カテプシン A 活性は基質として CGT を用い、MAKINODAN and IKEDA (1976) の方法によって反応させ、遊離するアミノ酸を YEMM and COCKING (1955) のニンヒドリン法によって測定した。カテプシン B および C 活性は MAKINODAN and IKEDA (1971) によって反応させ、遊離したアンモニアを林・畝本 (1960) の方法によって測定した。

6. 蛋白質の測定

蛋白質を Lowry 法 (LOWRY *et al.* 1955) で測定した。

結 果

1. Sephacryl S-200 によるゲルろ過

サバ普通肉および血合肉から得た酵素液を用いて Sephacryl S-200 によるゲルろ過を行なった。その結果を Fig. 1 に示した。酸性プロテアーゼ活性は全体的に血合肉の方が高く、また、その溶出曲線も若干の差が認められた。そこで、全プロテアーゼ活性画分を集め、次の実験に供した。

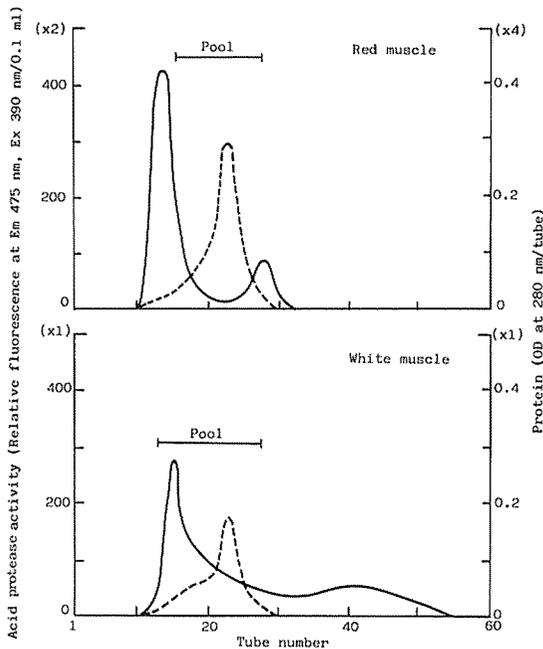


Fig. 1. Gel filtration of acid proteases in mackerel muscles on Sephacryl S-200. column: 2.6×80 cm, eluent: 0.01 M phosphate containing 0.1 M NaCl, pH 7.0, flow rate: 0.5 ml/min, sample volume: 25 ml, fraction volume: 10 ml.
 — protein
 - - - acid protease activity

2. SI-17 カラムイオン交換クロマトグラフィー

上述のようにして得られた酸性プロテアーゼ活性画分を限外ろ過によって濃縮し、さらに PD-10カラム (Pharmacia 製) によって緩衝液交換を行なった後、弱陰イオン交換体である SI-17 カラムを用いて高速蛋白液体クロマトグラフィーを行なった。その結果、Fig. 2 に示すように普通肉では0.6 M, 0.9 Mおよび1 MのNaCl濃度で溶出される三つの酸性プロテアーゼ活性画分 (WMs-1 および -3 と称す) が得られた。血合肉では、0.15 M, 0.45 Mおよび1 MのNaCl濃度で溶出される三つの酸性プロテアーゼ活性画分 (RMs-1, -2 および -3 と称す) が得られた。そこで、これらの画分につき、二・三の酵素学的性質を調べた。

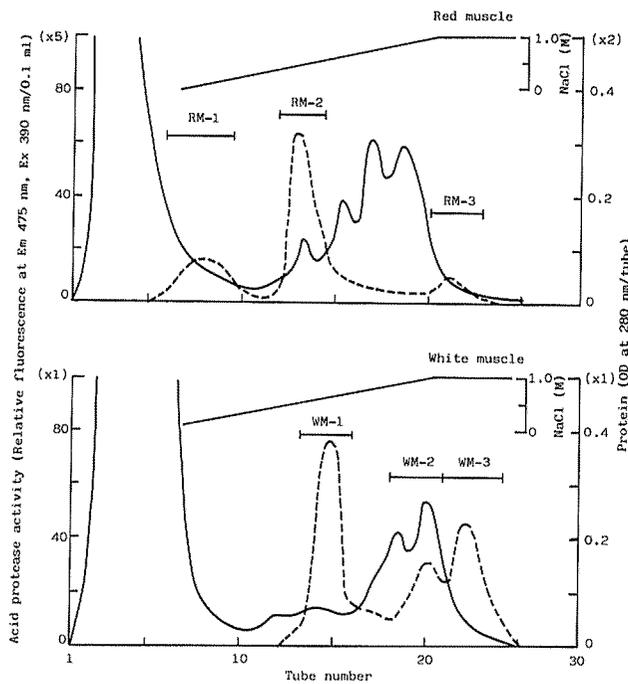


Fig. 2. Ion exchange chromatography of acid proteases in mackrel muscles on SI-17 column.

column: 1×10 cm, eluent: 0.01 M phosphate, pH 7.0 and the same buffer containing 1 M NaCl, flow rate: 2 ml/min, sample volume: 2 ml, fraction volume: 2 ml.

————— protein - - - - - acid protease activity

3. 至適 pH

種々の pH に調整したヘモグロビン基質を用いて活性画分の至適 pH を調べた。その結果、Fig. 3 に示すように、いずれの画分でも pH 4 付近で最大活性が得られた。

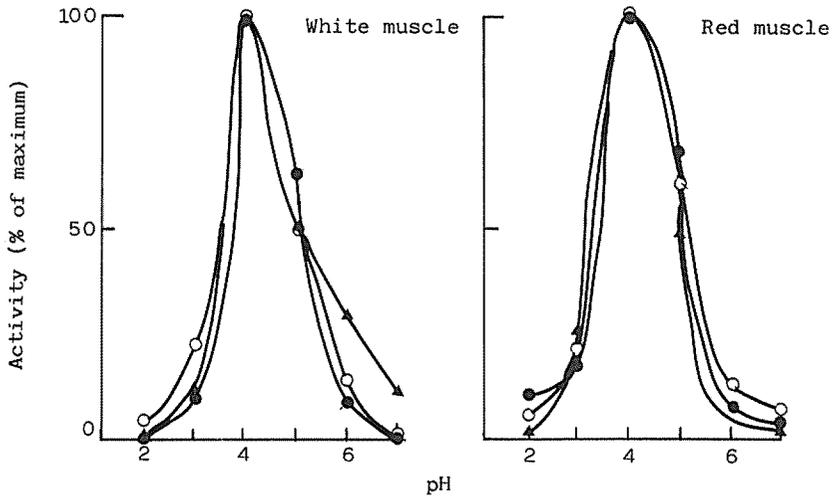


Fig. 3. Effect of pH on the activity of acid proteases in mackerel muscles. Incubation was 37 °C for 60 min. Acetate buffer (0.05 M) was used.
● : WMs- and RM-1, ▲ : WMs- and RM-2, ○ : WMs- and RM-3

4. 至適温度

各画分における酸性プロテアーゼの至適温度を求めた。その結果, Fig. 4 に示すように, WMs-1, -2 と -3 では, 50 °C で最大活性が得られたが, RM-1 では60 °C であった。

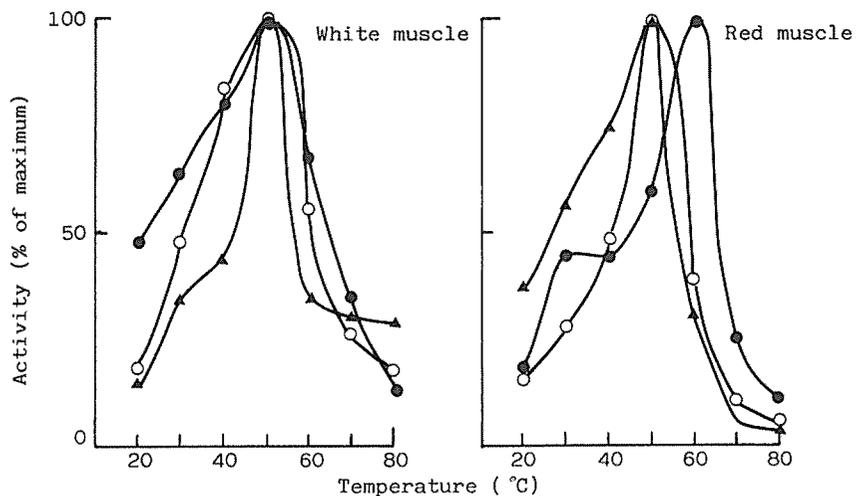


Fig. 4. Effect of temperature on the activity of acid proteases in mackerel muscles. Incubation was at the desired temperature for 60 min.
● : WMs- and RM-1, ▲ : WMs- and RM-2, ○ : WMs- and RM-3

5. 種々の化学薬品の影響

酸性プロテアーゼ活性におよぼす種々の化学薬品の影響について調べた。その結果を Table 1 に示した。普通肉の場合、WM-3では Zn^{2+} に対して 33% の阻害を受けたが、 Na^+ 、 K^+ 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、EDTA および KCN に対していずれの画分も有意な影響を受けなかった。SH基保護剤であるシステイン、2-メルカプトエタノールではWM-3で若干の阻害を受ける傾向を示した。SH試薬である PCMB や IAA ではいずれの画分でも有意ある影響を受けなかった。一方、血合肉の場合、RM-2で Ni^{2+} に対して32%の阻害を受けたが、一価および二価金属イオンやEDTAに対しいずれも影響を受けなかった。KCNではRMs-1および-2が若干活性化される傾向を示した。システインや2-メルカプトエタノールおよびPCMBやIAAでは、RM-3で2-メルカプトエタノールに対し32%の阻害を受けたが、RMs-1や-2では有意な影響は認められなかった。

Table 1. Effect of chemical reagentss on the activity of acid proteases in mackerel muscles

Reagents	WM			RM		
	1	2	3	1	2	3
	% control					
NaCl	96	90	96	95	101	90
KCl	92	90	91	98	105	99
ZnCl ₂	102	98	67	93	102	91
CoCl ₂	95	97	94	102	100	94
NiCl ₂	94	92	93	105	68	90
EDTA	93	103	103	98	105	97
KCN	98	92	91	121	112	99
Cys	109	90	72	95	99	86
2-ME	91	93	62	91	105	68
PCMB	86	86	80	100	96	82
IAA	95	94	91	102	100	94

The enzyme solution containing 1 mM chemical reagents was preincubated at 37°C for 3 min. Incubation was at 37°C for 60 min.

6. 生理活性ペプチドの影響

酸性プロテアーゼにおよぼす生理活性ペプチドの影響について検討した。その結果を Figs. 5 および 6 に示した。

普通肉の場合、WM-1ではペプスタチンに強く阻害されたが、WMs-2と-3ではまったく阻害されなかった。また、WM-1ではロイペプチン 0.5 mM において約40%の活性が阻害されていたが、WMs-2と-3ではほとんど阻害されていた。

血合肉の場合、RMs-1と2ではペプスタチンによって強く阻害されたが、RM-3では0.5 mM においても10%の阻害しか認められなかった。また、RMs-1、-2および-3ではロイペプチンに

対して濃度が増すにつれて阻害を受け、0.5 mMにおいてそれぞれ48, 16および87%の活性が阻害された。

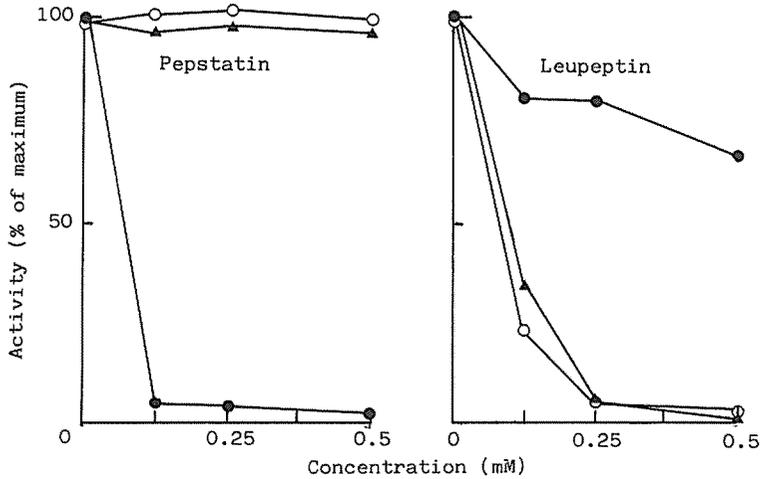


Fig. 5. Effect of pepstatin and leupeptin on the activity of acid proteases in mackerel white muscle. The enzyme solution containing various amounts of the peptides was preincubated at 37 °C for 3 min. Incubation was 37 °C for 60 min. ● : WM-1, ▲ : WM-2, ○ : WM-3

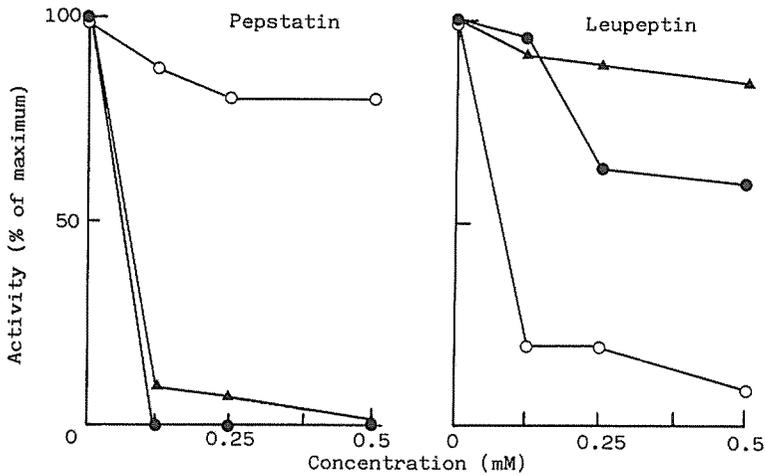


Fig. 6. Effect of pepstatin and leupeptin on the activity of acid proteases in mackerel red muscle. The enzyme solution containing various amounts of the peptides was preincubated at 37 °C for 3 min. Incubation was 37 °C for 60 min. ● : RM-1, ▲ : RM-2, ○ : RM-3

7. 天然基質に対する特異性

酸性プロテアーゼの種々の天然基質に対する特異性について調べた。その結果, Table 2 に示すように, いずれの画分でもヘモグロビンに対してよく水解活性を示した。なお, カゼインに対する水解活性はWM-2で最も高い値を示した。

Table 2. Specificity against protein substrates

Substrates (2.4%)	Frs	WM	RM
		Activity (%)	
Hemoglobin (pH 4.0)	1	100	100
	2	100	100
	3	100	100
Casein (pH 3.5)	1	37	20
	2	68	18
	3	16	38
Albumin (pH 4.0)	1	0	0
	2	0	7
	3	0	7

The parentheses show the pH in the reaction mixture. Incubation was at 37°C for 60 min.

8. 各画分中のカテプシンA, BおよびCの存在

各画分中の酸性プロテアーゼのうち, 合成基質を用いて種々のエキソペプチダーゼ活性の存在有無について検討した。その結果, Table 3 に示すように, いずれの画分にもBAAを分解するカテプ

Table 3. Presence of cathepsins A, B and C in the fractions of acid proteases separated from mackerel muscles by ion exchange chromatography on SI-17

Peptides	Frs	WM	RM
		NH ₃ liberated (mg)	
BZ-arg-NH ₂ (pH 6.5)	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
Gly-L-tyr-NH ₂ (pH 6.5)	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
		Tyr. liberated (μmole)	
CBZ-L-glu-L-tyr (pH 5.5)	1	15.0	2.0
	2	44.3	0
	3	2.2	0

The parentheses show the pH in the reaction mixture. Incubation was at 37°C for 17 hours.

シンB, GTAを分解するカテプシンCの存在は認められなかった。一方, CGTを分解するカテプシンAは, 普通肉の場合いずれの画分からも検出され, とくにWM-2に高い活性を示した。血合肉の場合, RM-1に微弱な活性が得られた以外, 他の画分ではほとんど活性が認められなかった。

考 察

現在まで動物組織から見い出されている酸性プロテアーゼは古くから存在が知られているカルボキシルプロティナーゼであるカテプシンDおよびE以外に, チオールプロティナーゼであるウシリンバ筋のカテプシンS (TURNSEK *et al.* 1975), ラット肝臓のペプスタチン insensitive protease (DE MARTINO *et al.* 1977) およびカテプシンL (KIRSCHKE *et al.* 1977) などがある。本研究においてサバ普通肉および血合肉から得られたそれぞれ三つの酸性プロテアーゼ活性画分はいずれも 4.0 に至適 pH, 50~60°Cに至適温度をもち, 強いヘモグロビン水解活性を有する互いに共通した性質をもつが, 種々の化学薬品の影響を調べたところ, 若干の性質の相違が認められた。しかしながら, これらの画分はいずれも部分精製のため, 酸性プロテアーゼの種類を推定することが困難であった。一方, 近年放線菌により見い出された生理活性ペプチドであるペプスタチンやロイペプチンはプロテアーゼを非常に特異的に阻害するため, その識別に常用されている (AOYAGI and UMEZAWA 1975)。すなわち, 一般にペプスタチンはカルボキシルプロティナーゼを, ロイペプチンはチオールプロティナーゼを阻害する。そこで, 生理活性ペプチドの影響から各画分中の酸性プロテアーゼの類別を試みた。すなわち, WM-1 および RMs-1 と -2 ではペプスタチンによって強く阻害されることからおもにカテプシンDが存在すると考えられる。WMs-2 と -3 およびRM-3 では, ロイペプチンによって強く阻害されることからチオールプロティナーゼの存在が考えられる。普通肉から得られた酸性プロテアーゼ活性画分のうち, とくにWM-2中に高いカテプシンA活性が検出された。カテプシンAは一般にペプスタチンによって阻害されるが, WM-2ではペプスタチンを添加したにもかかわらず, 酸性プロテアーゼ活性がほとんど抑制されてないことからWM-3にふくまれるチオールプロティナーゼのアイソザイムではないかと推定される。

サバ普通肉中におけるチオールプロティナーゼの存在については最近, 原ら* (1983) のカテプシンS様酵素や坂田ら (1985) のカテプシンL様酵素が報告されているが, これらの酵素はいずれも部分精製されただけのものであり, 詳細な酵素学的性質は不明である。それ故, 今後サバ普通肉より本酵素を精製し, 上述の二種のチオールプロティナーゼとの関連について検討するつもりである。

なお, イオン交換クロマトグラフィーによって分画されたカルボキシルプロティナーゼとチオールプロティナーゼとの両筋肉における活性の割合を比較すると全酸性プロテアーゼ活性を100とした場合, 普通肉では50:50, 血合肉では90:10であり, 明らかに筋肉間における酸性プロテアーゼの分布の相違が認められた。

※脚注 原 研治・坂井堅太郎・豊田泰之・石原 忠: 昭和58年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 155.

文 献

- AOYAGI, T. and H. UMEZAWA, 1975. Protease and biological control. In "Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation." (ed. E. REICH, D.B. RITKIN and E.N. SHAW), Cold Spring Harbor Lab., New York, Vol. 2, pp. 429-454.
- BIRD, J.W.G., T. BERG, A. MILANESI and W.T. STAUBER, 1969. Lysosomal enzymes in aquatic species- I. Distribution and particle properties of muscle lysosome of the goldfish. *Comp.Biochem. Physiol.*, **30** : 457-467.
- 林 誠・畝本 力, 1961. 腐敗アミン. 化学の領域, **47** : 61-63.
- KIRSCHKE, H., J. LANGNER, B. WIEDERANDERS, S. ANSORGE and P. BOHLEY, 1977. Cathepsin L. *Eur. J. Biochem.*, **74** : 293-301.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL, 1955. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275.
- MAKINODAN, Y and S. IKEDA, 1971. Studies on fish muscle protease-V. On the existence of Cathepsins A, B and C. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **37** : 1002-1006.
- and ———, 1976. Studies on fish muscle protease-VI. Separation of carp muscle cathepsins A and D, and some properties of carp muscle cathepsin A. *Ibid.*, **42** : 239-247.
- DE MARTINO, G.N., T.W. DOEBBER and L.L. MILLER, 1977. Pepstatin-insensitive proteolytic activity of rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* **252** : 7511-7516.
- 坂田一浩・松宮政弘・望月 篤・大竹茂夫, 1985. マサバ普通肉における酸性チオールプロテアーゼについて. 日水誌, **51** : 1865-1870.
- SIBERT, G., 1962. Enzymes of marine fish muscle and their role in fish spoilage. In "Fish in Nutrition" ed. by E. HEEN and R. KREUZER), London Fishing News, London, pp 80-82.
- TURNSEK, T., I. KREGAR and D. LEBEZ, 1975. Acid sulphydryl protease from calf lymph nodes. *Biochim. Biophys. Acta*, **403** : 514-520.
- 上野隆二・森下達雄・高橋 喬, 1978. コイ筋肉組織のリソゾームカタペシンド活性測定のための蛍光法の検討. 三重大水研報, **5** : 187-195.
- . ——— . ———, 1981. 魚類筋肉組織のリソゾーム酵素に関する研究-II. 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. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **47** : 207-214.
- UENO, R., J. LISTON and Y. HORIGUCHI, 1986. Studies of lysosomal enzymes in fish muscle tissue-III. Intracellular distribution of enzymes and particle properties of lysosomes in mackerel muscle tissue. *Ibid.*, **52** : 895-900.
- WARRIER, S.B.K., V. NINJOOR, P.L. SWANT and U.S. KUMTA, 1972. Lysosomal enzymes in drip and muscle of *Harpodon nehereus*. *Indian J. Biochem. Biophys.*, **9** : 207-209.
- YEMM, E.W. and E.C. COCKING, 1955. Determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst*, **80** : 209-213.