

Lysozyme に対するセリンプロテアーゼの活性能評価

日大生産工 ○高橋 大輔, 和泉 剛

【緒論】

細胞分裂によって細胞構成成分をリセットできる通常の細胞とは異なり、個体の寿命とほぼ同等の期間、ほとんど分裂することなしに機能を保持しなくてはならない中枢神経系の細胞では、細胞内における異常タンパク質の修復（リフォールディング）および除去が非常に重要であり。そのための生理的な防御システムとして分子シャペロン系とタンパク質分解系が存在している。最近の研究からアルツハイマー病，パーキンソン病，ポリグルタミン病，プリオン病などの神経変性疾患に共通して見られる病理学的所見としてユビキチン陽性の神経細胞内封入体—ミスフォールドした異常タンパク質が凝集して生じた構造物—の形成が報告されており，神経変性疾患とタンパク質分解系であるユビキチン・プロテアソーム系との関係が示唆されている¹⁾。

ユビキチン・プロテアソーム系は基質分子を特異的に認識し小さなタンパク質であるユビキチンを複数個（ポリユビキチン鎖）付加するユビキチン化酵素と，ポリユビキチン化された基質分子を認識しATP 依存的に分解する巨大なプロテアーゼ複合体であるプロテアソームの二つの酵素系で構成されている。プロテアソームの触媒活性中心は，2つの 20S プロテアソーム ($\alpha 1$ - $\beta 1$ -7 からなる 15-16S の前駆体が対称に会合した構造体) にある $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ に位置しており，それぞれ酸性，塩基性，疎水性アミノ酸の C 末端側のペプチド結合を切断するカスパーゼ様，トリプシン様，キモトリプシン様活性を有している²⁾。

また，生体活動に伴い生じる活性酸素などの

酸化ストレスにより，細胞内において DNA やタンパク質・酵素の変性が起こることが指摘されている。これらはアポトーシスや老化現象に繋がっており，DNA の修復機構やタンパク質分解機構に影響を与えていることが示唆される。

これまで本研究室では，界面活性剤およびシクロデキストリンなどの糖類を用いた変性還元 Lysozyme のリフォールディング方法(人工シャペロン)³⁾および Lysozyme アミロイド線維の形成⁴⁾について検討を行ってきた。また，RNA 分解酵素である Ribonuclease A (RNase) の oligomer の特性評価についても検討を行ってきた。

そこで，本研究ではモデルタンパク質として Trypsin を選択し，Trypsin oligomer および活性酸素処理した酸化 Trypsin の調製を行い，その構造および Lysozyme に対する酵素活性能について検討することを目的とした。

【実験】

1. 試料 酵素試料として，牛膵臓由来 Trypsin および鶏卵白由来 Lysozyme を使用した。基質として $N\alpha$ -ベンゾイル-DL-アルギニン- p -ニトロアニリド (BANA) および *Micrococcus lysodeikticus* (M.I.) を使用した。また，阻害剤として可逆的競合阻害剤であるベンズアミジンを使用した。

2. Trypsin oligomer および酸化 Trypsin の調製

Trypsin oligomer は，(1)RNase oligomer と同様 50%酢酸溶液に溶解後，凍結乾燥により形成させる方法，(2)固定化酵素の調製法と同様，アジポイルクロリド誘導体を用いた化学修飾により Trypsin 間にアミド結合を形成させる方法により調製した。得られた試料は，透析・凍結乾燥後，

HPLC(日本分光(株)製)により分析・分取した。

また、酸化 Trypsin は 1mM CuSO₄ 溶液 25cm³ に Trypsin を溶解させた後、10mM H₂O₂ 溶液 25cm³ を添加し、25°C で 3 時間反応により調製した。尚、溶液の調製には EDTA-HCl 水溶液を使用した。

3. Trypsin 存在下における Lysozyme の活性能

5μM Trypsin 溶液 2.0cm³ および 0.250g/dm³ Lysozyme 溶液 2.5cm³ を混合した後、温度 38°C で所定時間反応させた。その後、10mM ベンズアミジン溶液 0.5cm³ の添加により Trypsin の酵素反応を停止させた。反応溶液 0.2cm³ と 0.16g/dm³ M.I. 溶液 2.3cm³ を混合した後、波長 450nm における混合溶液の吸光度を 120sec 間測定し、吸光度の経時変化から酵素活性能を評価した。尚、溶液調製には Trypsin の安定化剤として Ca²⁺ (*I*=0.001 mol/dm³) を含有する Tris /HCl 緩衝溶液 (pH7.8, *I*=0.1mol/dm³) を使用した。

【結果および考察】

1. 酸化 Trypsin の酵素活性能評価 表 1 に酸化 Trypsin の Lineweaver Burk (LB) プロットより得られた *K_m* および *V_{max}* 値を示す。酸化 Trypsin の LB プロットは、混合型の阻害様式と類似のプロットを示した。H₂O₂ 溶液未添加で酸化 Trypsin と同様の方法により処理した native Trypsin の *K_m* および *V_{max}* 値は未処理の native Trypsin の活性能とほとんど違いは見られなかった。しかしながら、酸化 Trypsin の *K_m* および *V_{max}* 値 (1.01mM および 3.14×10⁻⁴mM/s) は native Trypsin の *K_m* および *V_{max}* 値に対して共に減少した。細胞内では活性酸素による酸化により、断片化や架橋形成、リジン残基の ε-アミノ基やヒスチジン残基のイミダゾール基のカルボニル基への置換が起こっている。酸化により基質と酵素との親和性が向上 (*K_m* 値が低下) しているものの酸化 Trypsin の溶媒への溶解性が低くなっていることから、酸化による Trypsin の構造変化が示唆された。

Table 1. Kinetic parameters obtained from Lineweaver-Burk plots for native and oxidized trypsin toward BANA at 25°C

	Native trypsin	Oxidized trypsin
<i>K_m</i> [mM]	2.64	1.01
<i>V_{max}</i> [mM/s]	6.09×10 ⁻⁴	3.14×10 ⁻⁴

2. Trypsin 存在下における Lysozyme の活性能

Trypsin 存在下における Lysozyme の活性能測定に先立ち、(1)2μM Trypsin の酵素反応を 10mM ベンズアミジンにより阻害できることおよび (2)ベンズアミジン存在下で Lysozyme の *M.I.* に対する酵素反応に影響がないことを確認した。次に、38°C において Trypsin 添加後の Lysozyme の活性能の経時変化について検討した。Trypsin との混合直後には Lysozyme の *M.I.* に対する加水分解反応速度の減少が見られたが、1 時間以降は変化せずまた約 80% の溶菌活性能の保持が見られた。これは、Trypsin による Lysozyme の切断箇所が多いことから高い反応性が推測されたが、Trypsin 自身の加水分解反応 (BANA に対する活性能の低下) も見られたためと考えられる。

本講演会では、Trypsin oligomer および酸化 Trypsin の活性能への調製条件の影響について議論する。

【参考文献】

- 1) 畠山鎮次, ユビキチン・プロテアソームシステムと神経変性疾患, 生化学, Vol.77, No.5, 389-399 (2005)
- 2) 田中啓二, プロテアソームの分子生物学, 生化学, Vol.73, No.9, 1115-1127 (2001)
- 3) 古園智洋, 平成 16 年度修士論文 両親媒性化合物を用いた変性還元リゾチームのリフォールディング
- 4) ジスルフィド結合の切断に伴う Lysozyme のアミロイド繊維化, 朝本紘充, 高橋大輔, 和泉剛, 第 54 回高分子討論会, 3Pd114 (2005)