

大豆たん白質溶液の濁度変化を指標とした 簡便かつ新規なプロテイナーゼ活性測定法の開発

井上國世*・永井宏平

京都大学大学院農学研究科

A Novel and Convenient Assay Method for Proteinase Activity by Measuring Turbidity Change in Proteolytic Digestion of Soy Protein Isolates

Kuniyo INOUE and Kouhei NAGAI

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502

ABSTRACT

A novel, convenient and accurate assay method for proteinase activity was developed. This method is based on measuring the turbidity change directly in the proteolytic digestion of soy protein isolates (SPI). For all proteases examined, bromelain (Bro), β -chymotrypsin (Chy), ficin (Fic), subtilisin BPN' (SB), subtilisin Carlsberg (SC), thermolysin (TLN), and pronase (Pro), the initial velocity (v_0) of the turbidity decrease changed depending on the enzyme and substrate concentrations following the Michaelis-Menten equation. Values of the catalytic constant (k_{cat}) and Michaelis constant (K_m) were evaluated for the respective proteinases: The k_{cat} values ((OD units/min)/(g/L)) were 11 ± 0 for Bro, 3.9 ± 0.1 for Chy, 29 ± 0 for Fic, 77 ± 1 for SB, 66 ± 1 for SC, 13 ± 0 for Pro and 277 ± 3 for TLN; the K_m values (mg/mL) were 0.83 ± 0.07 for Bro, 0.97 ± 0.08 for Chy, 0.60 ± 0.06 for Fic, 0.58 ± 0.06 for SB, 0.93 ± 0.05 for SC, 1.3 ± 0.1 for Pro and 1.3 ± 0.1 for TLN. The k_{cat} values obtained with turbidity measurement showed high correlation ($R=0.995$) with those evaluated in the SPI digestion accompanied with acid treatment, which was the general assay method for the proteinase activity. It was demonstrated that the turbidity measurement in the proteolytic digestion of SPI could provide us with a convenient and accurate method for evaluating proteolytic activity without pre- and post-treatment of the samples and reaction solutions. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 48-51, 2004.

Key words : soy protein isolates, proteinase, proteolytic activity, turbidity

*〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

プロテイナーゼ（エンドペプチダーゼ）の活性を評価するのに合成のオリゴペプチドが基質として広く用いられている¹⁾。しかし、プロテイナーゼの基質特異性は種類によって様々であり、それに合ったペプチド基質を用いなければ酵素活性を正しく評価することはできない。特に、基質特異性の未知なプロテイナーゼの活性を評価する時には、様々なアミノ酸配列を有する高分子のたん白質基質を用いる必要がある。

しかし、ペプチド基質に比べ、たん白質を基質とした活性測定の方法は非常に限られている。一般的に広く用いられているのは、カゼイン、アルブミン、ヘモグロビンなどを基質とし酸可溶性ペプチドの増加量を指標に活性を評価する方法である²⁾。プロテイナーゼ活性が使用するたん白質の種類によって大きく影響を受けることを考慮すれば、様々なたん白質基質を用いて、プロテイナーゼ活性を評価する必要がある。本研究では、分離大豆たん白質 (soy protein isolates, SPI) を基質とし、分解に伴う反応溶液の濁度減少の速度を指標とする新規プロテイナーゼ活性測定法の開発を試みた。

方 法

SPI溶液の調製

SPI (フジプロR) を40 mg/mLとなるように標準緩衝液 (20 mM リン酸緩衝液, 0.05% azide) に懸濁し、室温で3時間攪拌させた。この懸濁液をwhatman No.41濾紙でろ過し、ろ液をSPI溶液とした。SPI濃度はローリー法³⁾によって求めた。

酵素溶液の調製

subtilisin Carlsberg (以下SC, Lot 120K1145) と ficin (Fic, Lot 31K7665) はSigmaより, subtilisin BPN' (SB, Lot 6577188) はNagase Chemtexより, thermolysin (TLN, Lot T7LA991) はDaiwa Kaseiより, α -chymotrypsin (Chy, Lot PLE7616) はWako Pure Chemicalsより, bromelain (Bro, Lot M9G9630) と pronase (Pro, Lot B27274) はNacalai Tesqueより購入した。プロテイナーゼは標準溶液に溶解し、濃度は、 $A_{280}(1\%)=8.6(\text{SC}), 11.7(\text{SB}), 20.5(\text{Chy}), 21.0(\text{Fic}), 20.1(\text{bro}), A_{277}(1\text{mg/mL})=1.83(\text{TLN})$ を用いて⁴⁻⁸⁾、プロテイナーゼは秤量によって決定した。

濁度変化測定

SPI溶液をセル内に入れ37℃で10分インキュベートした後に、酵素溶液 (10~80 μL) を添加した。酵素添加後、30秒後から濁度 (OD_{660}) 変化を測定した。

酸沈殿法によるプロテイナーゼ活性測定法

SPIの終濃度が10 mg/mLと成るようにSPI溶液3 mL

に酵素溶液1 mLを加えることで反応を開始させた。反応溶液に4 mLの酸溶液 (0.11 Mトリクロロ酢酸, 0.22 M酢酸ナトリウム, 0.33 M酢酸) を加えることで、反応を停止させると同時に、たん白質を酸沈殿させた。反応溶液をWhatman No.2ろ紙でろ過し、上澄みの A_{275} を測定した。SPI分解活性の1 unit (PU)は、1分間に反応溶液に1.0 μg のチロシンを遊離した時の ΔA_{275} 値を与える酵素量と定義した。

結果と考察

SPI溶液の濁度測定によるプロテイナーゼ活性評価

Fig. 1にSCによってSPI溶液を処理した時の濁度変化の一例を示す ($[\text{SC}]_0=0.54 \mu\text{M}$, $[\text{SPI}]_0=10 \text{ mg/mL}$, pH 8.0, 37℃)。SPI溶液はコロイド溶液であり、反応前には濁っているが、プロテイナーゼによるSPIの分解によって濁度が減少していく。この濁度減少の初速度から、ブランク値 (酵素なし) の減少速度をひいた値 (v_0) をプロテイナーゼ活性の指標と見なした。

様々な濃度のプロテイナーゼ (SC, SB, TLN, Bro, Fic, Chy, Pro) で、10 mg/mLのSPI溶液を処理し、 v_0 の酵素濃度依存性を調べたところ、 v_0 は、十分に低い酵素濃度において、酵素濃度に対して比例的に増加し、酵素活性を正確に反映していることが示唆された。更に、一定濃度のプロテイナーゼを用いて、0~18 mg/mLのSPI溶液を処理し、 v_0 の基質濃度依存

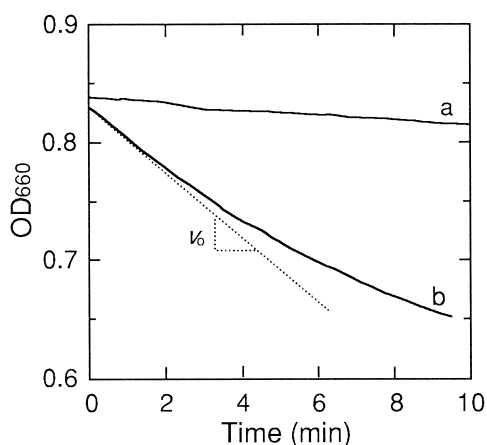


Fig. 1. Change in turbidity of SPI solution treated by subtilisin Carlsberg. $[\text{SPI}]=10 \text{ mg/mL}$ and $[\text{subtilisin Carlsberg}]=0.54 \mu\text{M}$ at pH 8.0 and 37℃. The turbidity change was measured by the change in OD_{660} . Curve a: SPI not treated by subtilisin Carlsberg (blank). Curve b: SPI treated by subtilisin Carlsberg.

性を調べた。その結果、 v_0 は、 $[SPI]_0=0\sim12$ mg/mLの範囲においてミカエリス・メンテン式、 $v_0=k_{cat}[E]_0/[S]_0/(K_m+[S]_0)$ によくフィッティングされる基質濃度依存性を示した。そこから各プロテイナーゼの見かけの k_{cat} 値 ((OD units/min)/(g/L)) は、SCで 66 ± 1 、SBで 77 ± 1 、TLNで 277 ± 3 、Broで 11 ± 0 、Ficで 29 ± 0 、Chyで 3.9 ± 0.1 、Proで 13 ± 0 、 K_m 値 (mg/mL) はSCで 0.93 ± 0.05 、SBで 0.58 ± 0.06 、TLNで 1.3 ± 0.1 、Broで 0.83 ± 0.07 、Ficで 0.60 ± 0.06 、Chyで 0.97 ± 0.08 、Proで 1.3 ± 0.1 と見積もられた。基質濃度が12 mg/mLよりも高くなると、 v_0 はミカエリス・メンテン式から予測された値よりも低い値を示したが、何らかの光学的な理由によって、濁度が反応を正確に反映することが出来ないためではないかと考えられた。

濁度変化測定法によって求められたプロテイナーゼ活性の有効性を評価するために、酸可溶性ペプチドの増加速度から評価する方法（酸沈殿法）を用いて求められたSPI分解活性との比較を行った。このとき、活性測定に用いたSPI濃度（10 mg/mL）は K_m 値よりも十分に高いと考えられるため、プロテイナーゼの単位重量当たりの酵素力価（unit数）は、見かけの k_{cat} 値に相当すると考えることができる。そこで、酸沈殿法によって求められたプロテイナーゼ1 mgあたりの酵素力価（units/mg protein）を濁度変化測定によって求められた見かけの k_{cat} 値に対してプロットし両者の相関を調べた（Fig. 2）。その結果、両者は相関係数 $R=0.995$ という高い相関を示し、濁度変化測定法の有効性が示唆された。濁度変化測定法は、酸沈殿法に比べ

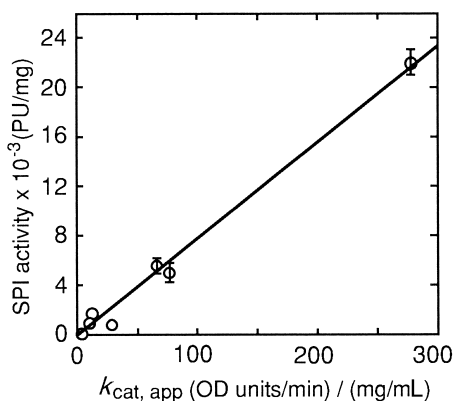


Fig. 2. Relationship between proteolytic activities determined by turbidity measurement method and acid-precipitation method. The proteolytic activities (PU/mg protein) of seven proteases towards SPI (subtilisin Carlsberg, subtilisin BPN', thermolysin, bromelain, ficin, α -chymotrypsin, and pronase) were determined by acid-precipitation method. The activities determined from the turbidity measurement were expressed by apparent k_{cat} values [(OD unit/min)/(mg/mL)].

て、(1)操作が簡便である。(2)測定にかかる時間が短い。(3)トリクロロ酢酸のような危険な試薬を使わない。(4)反応の経時的な追跡が可能であり、より正確な解析が可能である。といった利点が存在するため、従来法である酸沈殿法に変わりうる新規なプロテイナーゼ活性評価法として使用できると考えている。

要 約

分離大豆たん白質（SPI）を基質とし、たん白質の分解に伴う反応溶液の濁度減少の速度を指標とした簡便かつ新規なプロテイナーゼ活性評価法の開発を試みた。20 mMのリン酸緩衝液に溶解したSPI溶液（0～12mg/mL）を、pH 8.0、37℃の条件で、7種類のプロテイナーゼ（subtilisin Carlsberg, subtilisin BPN', α -chymotrypsin, thermolysin, bromelain, ficin, pronase）で処理した。濁度減少の初速度は、全ての酵素で、ミカエリス・メンテン式型の酵素濃度、および、基質濃度依存性を示し、そこから、各酵素の k_{cat} 値と K_m 値が求められた。この k_{cat} 値は、一般的に広く用いられている方法である酸可溶性画分の増加速度から求められたSPI分解活性と高い相関を示し、濁度変化測定が簡便かつ正確なプロテイナーゼ活性測定法として使用できることが示された。

文 献

- 1) Sarath G, De La Motte RS and Wagner FW (1989): Protease assay methods in proteolytic enzymes. *In: A Practical Approach*. Beynon RJ and Bond JS, eds., IRL Press, New York, pp. 25-55.
- 2) Inouye K, Tonomura B, Hiromi K, Sato S and Murao S (1977): The stoichiometry of inhibition and binding of a protein proteinase inhibitor from *Streptomyces* (*Streptomyces subtilisin inhibitor*)

- against subtilisin BPN¹, *J Biochem*, **82**, 961-967.
- 3) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
 - 4) Markland FS and Smith EL (1971): Subtilisins: Primary structure, chemical and physical properties. *In: The Enzymes, 3rd ed. Vol. 3.* Boyer D, eds., Academic Press, New York, pp. 561-608.
 - 5) Bender ML, Kedzy FJ and Wedler FC (1967): α - Chymotrypsin: enzyme concentration and kinetics. *J Chem Educ*, **44**, 84-88.
 - 6) Murachi T (1970): Bromelain enzymes. *In: Methods in Enzymology Vol. 19*, Perlmann GE and Lorand L, eds., Academic Press, New York, pp. 273-284.
 - 7) Liener IE and Friedenson B (1970): Ficin. *In: Methods in Enzymology Vol. 19*, Perlmann GE and Lorand L, eds., Academic Press, New York, pp. 261-273.
 - 8) Inouye K (2003): Thermolysin. *In: Handbook of Food Enzymology*. Whitaker JR, Voragen AGJ and Wong DWS, eds., Marcel Dekker, New York, pp. 1019-1028.