

Streptomyces griceus プロテアーゼ によるセリシンの加水分解

小笠原真次*・坂口育三*

Shinji OGASAWARA and Ikuzo SAKAGUCHI: Hydrolysis of Sericin with
the Protease of *Streptomyces griceus*

(1960年9月1日受理)

酵素によるセリシンの加水分解に関しての基礎的研究は西沢氏等^{1~4)}によりなされているがその数は余り多くはない。最近、強力な蛋白分解能と広範な基質特異性を有する *Streptomyces griceus* のプロテアーゼについて野本氏等^{5~9)}が詳しい報告をしている。筆者等はこのプロテアーゼによるセリシンの加水分解における基礎的な知見を得るため、Mosher¹⁰⁾の方法により分離したセリシンAおよびBについて実験を行い、次のような結果を得た。

試料及び実験法

1 素酵：使用せる *Streptomyces griceus* のプロテアーゼは科研化学株式会社提供のプロテアーゼPと呼ばれる高純度の化学研究用の酵素である。この他、比較に供するため市販のペプシンおよびトリプシンをいずれも精製することなしに使用した。

酵素活性の測定は萩原氏¹¹⁾の方法に従い、カゼイン0.5%の基質濃度、至適 pH において1分間にチロシン 1 μ 相当量の Folin 呈色を示すトリクロル酢酸可溶性物質を生成する酵素活性をもって1単位とした。*Streptomyces griceus* のプロテアーゼは熱に対して比較的安定であり、40~60°C において見掛け上最大の活性を示すことから、このプロテアーゼを単独で扱う場合には40°Cにおける活性度を基準にとり、他酵素との比較に際しては各々30°Cにおける活性度を基準にとつた。酵素単位は萩原氏の方法に準じて各々 $[\text{PU}]_{\text{tyr.}}^{\text{Cas. } 40^{\circ}\text{C, FR.}}$ 、 $[\text{PU}]_{\text{tyr.}}^{\text{Cas. } 30^{\circ}\text{C, FR.}}$ で表わされる。以下、必要のない場合はPUと略記する。

2 セリシンAおよびBの調製：日124号×支124号の生菌層を20倍量の水と共にオートクレーブ中110~115°Cで60分間加熱してセリシン液を得、これを酢酸緩衝液で pH 4.1とし、一夜放置後セリシンBの沈澱を遠心分離し、同 pH、同濃度の酢酸緩衝液にて洗滌した後、所要量の水を加えてセリシンB液を得た。次に上澄液に対して等量の無水メタノールを加えてセリシンAを沈澱せしめ遠心分離し、同様に沈澱を水に分散してセリシンA液を得た。各液中の全窒素量を kjeldahl 法で定量し、実験に便ならしめるために全窒素の濃度が各々 1.000 mg/cc となる様に両液を稀釈した。

3 酵素作用の測定法：酵素によるセリシンの加水分解で生じたトリクロル酢酸可溶性物質のアミノ態窒素を Yemm-Cocking エンヒドリン比色法¹²⁾で定量し、同じ試料を塩酸により完全加水分解したもののアミノ態窒素を同様の方法で定量した値に対する百分率をもって分解率とした。塩酸による加水分解は試料を40倍量の 6N HCl と共に還流冷却器つきの分解ビン中にて120~130°Cで20時間加熱して行つた。使用した蛋白沈澱剤は酢酸緩衝液を含むトリクロ

* 信州大学繊維学部繊維化学科天然繊維化学教室

Table 1 Hydrolysing ability of each enzyme on several substrates

Enzyme*	Condition of reaction	0.5%Sericin**	0.05%Glutamine***	0.05%Asparagine***
Pepsin	pH 1.8 37°C 24hrs	65.5γ/cc	++++	+
Trypsin	pH 8.5 37°C 24hrs	88.6γ/cc	+++	++
Pronase-P	pH 8.0 40°C 24hrs	150.5γ/cc	+	-

* Concentration of enzyme: $20[\text{PU}]_{\text{r tyr.}}^{\text{Cas. } 30^\circ\text{C, FR.}} / \text{cc}$

** Amino-N, soluble in trichloroacetic acid sol'n, is determined by Yemm-Cocking's photometric ninhydrin method.

*** Ammonia liberated is estimated by Nesslerization.

ル酢酸水溶液で、沈澱完了時の終濃度は CCl_3COOH 0.05M, CH_3COONa 0.10M, CH_3COOH 0.15Mである。pHの測定にはアンチモン電極 pHメーターを使用し、補助として指示薬法を併用した。また使用した緩衝液は pH 6~7ではリン酸緩衝液, pH 8~10ではホウ酸緩衝液を用い、ペプシンの作用時には緩衝液を使用しなかつた。

Streptomyces griseus プロテアーゼを用いる場合は其の失活を防ぐため酵素が常に0.01M酢酸カルシウム溶液中にある様留意し、酵素溶解時は pH 7, 酢酸カルシウム 0.01M 溶液を使用し、反応溶液も終濃度において酢酸カルシウムを加え0.01Mとなる様に調整した⁷⁾。ペプシン及びトリプシンにおいては全く同様のことを食塩によつて行つた¹¹⁾。

実験および考察

まず予備実験として *Streptomyces griseus* プロテアーゼがセリシンをどの程度加水分解するかについてペプシンおよびトリプシンと比較した結果, Table 1 に示す如く 0.5%未分別セリシン溶液において両酵素の2倍近くの加水分解能を有することがわかつた。またグルタミン, アスパラギンに対するアミダーゼ作用は両酵素に比して極く小さいか, またはほとんど無いことを確かめた。

以下は *Streptomyces griseus* プロテアーゼについての実験である。

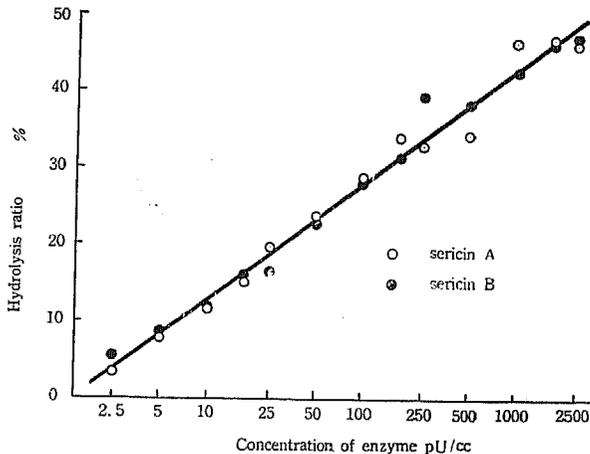


Fig. 1 Hydrolysis ratios at various concentrations of enzyme.

1 酵素濃度と各分別セリシンの加水分解率変化: セリシンAおよびBの加水分解に適する酵素濃度を求めるために各基質溶液に種々な濃度の酵素を加えて加水分解を行わしめた。反応液の組成および反応条件を次に示す。

基質濃度 全窒素量 0.5mg/cc

ホウ酸緩衝液濃度 0.025M

酢酸カルシウム濃度 0.01M

トルオール量 0.1%

酵素濃度 2.5~2500

$[\text{PU}]_{\text{r tyr.}}^{\text{Cas. } 40^\circ\text{C, FR.}} / \text{cc}$

反応条件 pH 8.0 40°C 24hrs

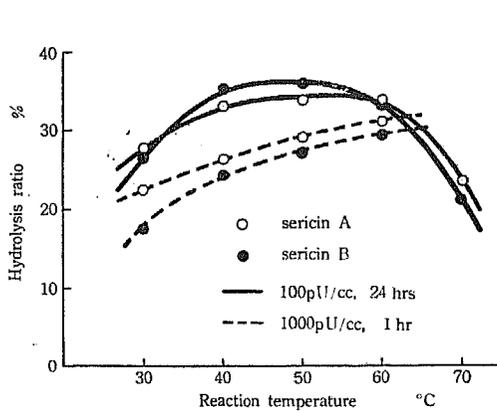


Fig. 2 Hydrolysis ratios at various temperatures.

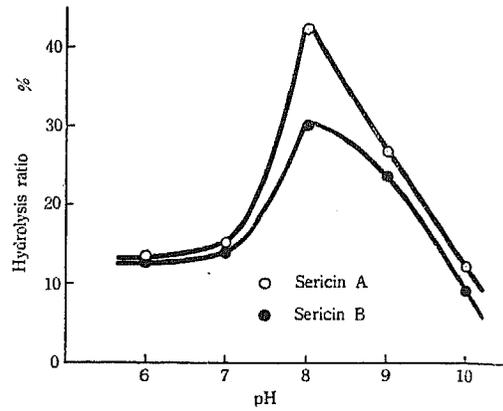


Fig. 3 Changes in hydrolysis ratios by pH

測定の結果は Fig. 1 の如くである。これより見てセリシン A 及び B の加水分解率は各酵素濃度において同様な値を示すことがわかる。カゼイン及び K C P (精製脱脂大豆粉) にこの酵素を作用させた場合では、基質全窒素量を 0.5mg に換算すると約 $50[\text{PU}]_{\text{Cas. } 40^{\circ}\text{C, FR.}}^{\text{tyr.}}$ 以下の酵素量を用い、ほぼ同一の反応条件下で反応の大半を終らせたと報告されているが⁹⁾、セリシンを基質とした場合にはセリシン A および B は共に前記基質に比して大なる抵抗性を有し、全窒素量 0.5mg 当り 2500PU の酵素を用いてもなおその加水分解率は 50% を越えない。2500PU の酵素はこの場合全窒素量にして約 0.25mg であり、基質蛋白のその半量に近い値であることを考えると実際にこの様な多量の酵素を使用することは出来ない。このため便宜上、基質全窒素量 0.5mg 当り 100PU の酵素を用いることにした。この場合の酵素量は基質の 2% 以下であり加水分解率は約 30% である。

2 反応温度：この酵素は熱に対して比較的安定⁹⁾であることから、他酵素よりも比較的高温において見掛け上最大の活性を示すことが予想される。高温においては反応速度が大であると同時に酵素の失活も大となるであろうから、加水分解の最適条件は温度と時間の兼ね合いということが出来る。比較的低温において長時間反応を行わしめるならば低濃度の酵素によつても大なる加水分解率が得られるわけである。ここでは実験の反応条件を酵素濃度 100PU/cc 区は 24 時間、1000PU/cc 区は 1 時間、温度はいずれも 30~70°C とし、他は実験 1 と同様に行つた。測定の結果を Fig. 2 に示す。この場合セリシン A 及び B はほぼ同様の加水分解率を示し、酵素量 100PU/cc の場合 50°C 附近、1000PU/cc の場合には 60°C 以上の温度において最大の値を示すことがわかる。

3 pH の影響：最適 pH に関しては Casein-Folin 色法で 8.0、Casein-formol 滴定法で 8.0~9.0 なる値が報告⁹⁾されている。ここでは反応液に正確な pH 値を保たしめるため、緩衝液濃度を 0.1M に高め、酵素濃度 100PU/cc、50°C、各種 pH とし以下実験 1 と同様な条件下で実験を行つたがその結果は Fig. 3 の如くである。セリシン A および B は共に pH 8.0 附近で最大の活性度を示し、pH 8.0 の上下いずれに移動しても加水分解率が著しく減少することがわかる。

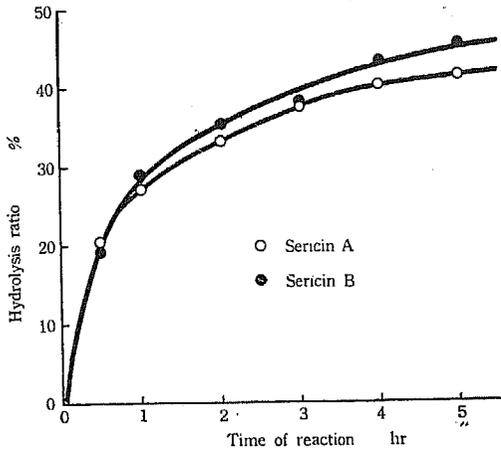


Fig. 4 Relation between hydrolysis ratio and time of reaction.

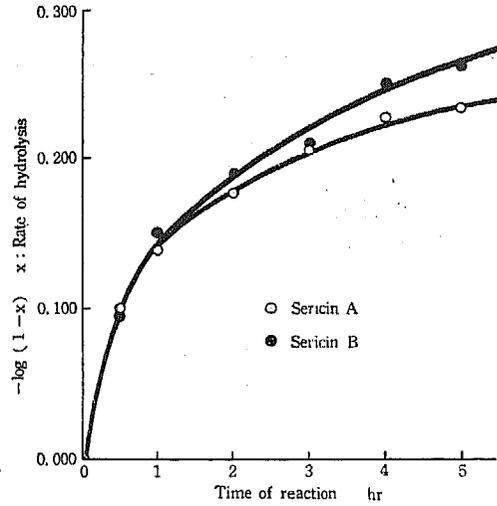


Fig. 5 Relation between reaction velocity and time of reaction.

4 酵素的に見たセリシンA及びBの性質：これまでの結果より見て、セリシンAとセリシンBが良く似た性質のものであることが想像される。両者が化学的にどのように異なるものであるかについての決論はまだ決っていない。例えば最近のアミノ酸分析結果¹³⁾によればこれは同一でなく、赤外線スペクトル等の物理的研究¹⁴⁾ではそのアミノ酸の結合順序及び結合の大きさにおいて相異しているとの見方がなされているようである。

ここではそのことに関して少しく別の面から検討するべく実験を行なった。即ち分別両セリシンに対するこの酵素の反応速度変化について測定を行なつて見るとその結果は Fig. 4および Fig. 5 に示す如くである。この結果を解析して見るに、反応は簡単な合成基質に見られたような一次反応⁹⁾でもなければまた更に高次の単一な反応というわけでもない。これは時間と共に消長する何種類かの反応の集積なのであり、各種のペプチド結合一個毎に割りつけた反応速度定数の全体から得られる曲線と見ることが出来よう。若しこの酵素の基質特異性が高く、特に両セリシンの含有アミノ酸中その含有量に大きな差のあるアミノ酸の結合点に主として反応するような場合には、当然両セリシンの分解曲線に大きな差異が表われるであろう。ところがこの *Streptomyces griseus* プロテアーゼは広範な基質特異性を有するため、両セリシンのアミノ酸組成並びに結合順序が全体的に似ているならば一部に僅小の差があつたとしても両者の間では殆ど同様の曲線が得られるはずである。この実験の結果から見ると分別両セリシンのアミノ酸組成及びその結合順序は非常に近いものであることが想像される。

なお筆者等はこの酵素を用いてセリシン中の不安定物質の分析を研究中である。

総 括

Mosher 法により得たセリシンAおよびBに対する *Streptomyces griseus* プロテアーゼの作用を検討し、次の如き結果を得た。

1. この酵素はセリシンに対してペプシンおよびトリプシンの約2倍の加水分解能を有する。

2. セリシンAおよびBに対する作用はほぼ同じであり、分別両セリシンの抵抗性はカゼインおよびKCPに比して可なり大である。加水分解最適 pH 8.0, 最適温度は24時間反応において約50°C, 1時間反応においては60°C以上である。

3. *Streptomyces griceus* プロテアーゼによる加水分解の各種条件下において、分別両セリシンは同一の反応を示すことから互に極く近いアミノ酸組成およびアミノ酸結合順序を有するものと見られる。

文 献

- 1) 西沢一俊・小河原茂：日蚕誌 21 240 (1952)
- 2) ————：——— 22 39 (1953)
- 3) 金子英雄・中沢義男：農化誌 10 356 (1934)
- 4) MOSHER, H. : Canad. Text. J., 51 31 (1934)
- 5) 野本正雄・奈良橋快子：理研報告 34 381, 393, 399 (1958)
- 6) ————：——— 35 84 (1959)
- 7) ————：——— 35 90 (1959)
- 8) ————・村上 碩：35 154 (1959)
- 9) ————・———：35 261 (1959)
- 10) MOSHER, H. : Am. Dys. Rept., 21 341 (1932)
- 11) 萩原 文二：酵素研究法Ⅱ 240 (1956) (赤堀四郎編, 朝倉書店)
- 12) YEMM, E. W., COCKING, E. C. : Analyst, 80 209 (1955); Biochem. J., 58 12 (1954)
- 13) 例えば渡辺忠雄：日蚕誌 29 15 (1960)
- 14) 島 保・平尾ちよう蔵：日蚕誌 29 192 (1960)

Summary

The author studied on the action of *Streptomyces griceus* protease on the sericin fractions A and B, prepared by means of Mosher's method. The results obtained are as follows;

1 This protease has a high efficiency in hydrolysis of sericin about two times as much as those of pepsin and trypsin. The optimum pH is 8.0 and the optimum temperature is about 50°C for protease to digest sericins during 24 hours, or about 60°C for the digestion during 1 hour.

2 Since the both sericin fractions, which are less hydrolyzed than casein and KCP, are almost equally acted by this protease, it seems that each of the sericins is almost equally in the amino acid contents and the linkage order of these amino acids.

(Laboratory of Natural Textile Chemistry, Faculty of Textile and Sericulture, Shinshu University)