

魚類幽門垂プロティナーゼに関する研究 IV

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	3711
掲載ページ	p. 1110-1114
発行年月	1971年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



魚類幽門垂プロティナーゼに関する研究—IV.

サバ幽門垂プロティナーゼによる N-ベンゾイル
-L-アルギニンアミドの分解反応の速度論

大 城 善 太 郎

(1971 年 6 月 7 日受理)

Studies on Proteinase in the Pyloric Caeca of Fishes—IV.
Kinetic Studies on the Hydrolysis Reaction of N α -Benzoyl-L-
arginineamide Catalyzed by Mackerel Proteinase

Zentarō OOSHIRO*

Kinetic studies have been made on the hydrolytic reactions of synthetic peptide catalyzed by purified mackerel proteinase. The kinetic constant, the apparent Michaelis constant K_m and the apparent maximal velocity V_{max} , were determined for the hydrolysis of N α -benzoyl-L-arginineamide.

It is important to note that the factors which influence the velocity of enzyme reactions may be produced by either one of the following: by an effect on the formation, or an effect on the breakdown, of the enzyme-substrate complex.

The Michaelis constant K_m and the maximal velocity V_{max} were found to be 0.79×10^{-3} M and 27.7 M per mole of enzyme per min. respectively, at pH 9.0 and 35°C. The activation energy for the mackerel proteinase is calculated to be 6.5 K cal.

Judging from the results of kinetic analysis, it was proposed that, combined with substrate in the activated complex, a sort of ES-complex is readily formed by the mackerel proteinase.

先に著者¹⁻²⁾は、サバ幽門垂中に含まれているプロティナーゼが、カゼインのペプチド結合の 70% 相当を水解开裂し、また N α -benzoyl-L-arginineamide, chloroacetyl-L-leucine, chloroacetyl-L-methionine を迅速に水分解するなどの基質特異性を有する点で明らかに“トリプシン”とは異なるものであることを指摘した。

本報告では、精製したサバ幽門垂プロティナーゼによる N α -benzoyl-L-arginineamide の分解反応につき反応速度論的検討を行ない、ミハエリス定数 K_m 、最大反応速度 V_{max} および活性化エネルギー E_a を求めて、反応機作につき推定し、併せて本酵素の物理化学的性質の解明を行ない、若干の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

使用酵素 精製サバ幽門垂プロティナーゼ³⁾を用いた。

基質 使用した N α -benzoyl-L-arginineamide 塩酸塩は約 10 倍量の熱水から再結晶して精製したものをを用いた。

* 鹿児島大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Kagoshima Univ., Shimoaratacho, Kagoshima).

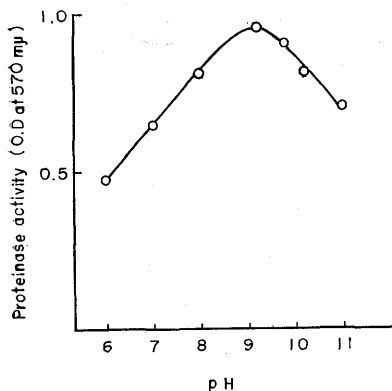


Fig. 1. pH-activity curve of purified mackerel proteinase. Proteinase activity was assayed by incubating a mixture of 1 ml. of 0.02 M N_{α} -benzoyl-L-arginineamide in 0.1 M phosphate, tris and carbonate buffer solution and 1 ml. of enzyme solution (0.056 mg-N/ml.) at 37°C for 10 minutes. The liberated NH_3 was measured by colorimetric ninhydrin method of YEMM-COCKING.

りて、作用至適 pH は 9.0 であり、カゼインに対する作用¹⁾の場合と同じであることを確認した。

K_m および V_{max} の決定 pH 9.0 のトリス緩衝液にとがして得た種々濃度の N_{α} -benzoyl-L-arginineamide 溶液を基質とし、5°, 15°, 25°, 35° および 45°C の各温度においてサバ幽門垂プロティナーゼを作用させた。各温度における分解反応の経時変化を測定して求めた反応初速度 v と、基質濃度 $[S]$ との関係を図 2 に示した。

ここに得られた v と $[S]$ の関係から、三種のプロットを図 3-a, b および c に示すごとく行なつたが、い

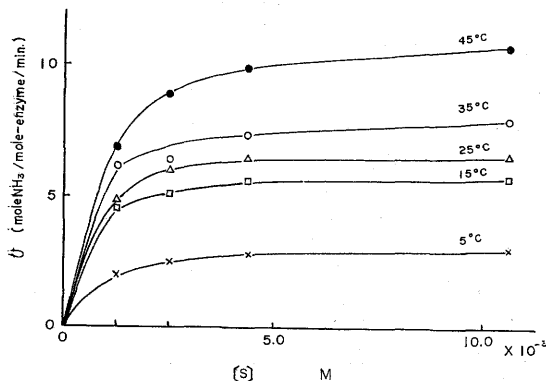


Fig. 2. The reaction velocity of mackerel proteinase as a function of the substrate concentrations in the case of the hydrolysis of N_{α} -benzoyl-L-arginineamide at various temperatures.

反応速度の測定 種々の濃度の N_{α} -benzoyl-L-arginineamide 溶液 (pH 9.0) を基質とし、5°, 15°, 25°, 35°, 45°C の各温度において酵素を作用させ、遊離生成するアンモニア量を YEMM-COCKING⁴⁾ のニンヒドリン呈色法により測定し、サバ幽門垂プロティナーゼの分子量 30,000¹⁾ との関係より反応速度 v を求め、基質濃度との関係 (v - S 曲線) からミハエリス-メンテンの理論に基づく三種の表示法によつて K_m , V_{max} を求めた。さらに酵素反応の速度と反応温度の関係から活性化エネルギー E_a を算出した。

実験結果

酵素作用の pH 依存性 いろいろな pH のトリスおよび炭酸塩緩衝液に溶解して得た 0.02 M N_{α} -benzoyl-L-arginineamide 溶液を基質とし、37°C において酵素作用を行なわせ、所定時間反応後 0.4 M トリクロル酢酸を添加して反応を停止させ、酵素作用によつて遊離生成されたアンモニア量をニンヒドリン呈色法により測定して酵素作用の pH 依存性を調べた。その結果は Fig. 1 に示す通り

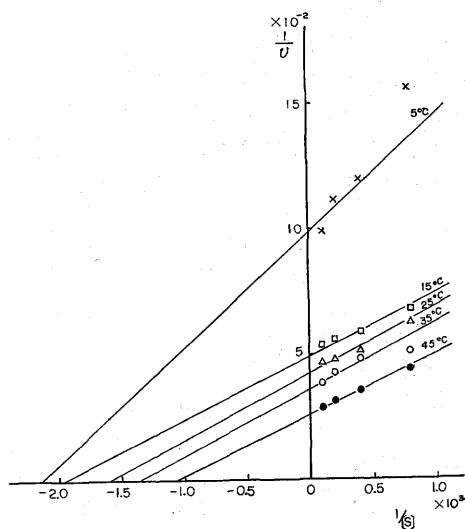


Fig. 3-a. Determinations of K_m and V_{max} values in the hydrolysis of N_{α} -benzoyl-L-arginineamide by mackerel proteinase. LINEWEAVER-BURK plot.

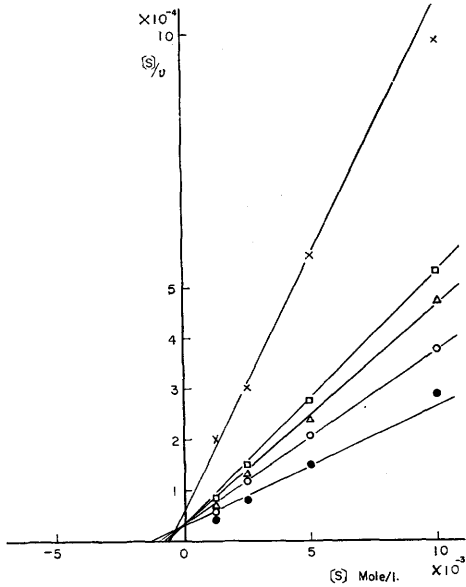


Fig. 3-b. Determinations of K_m and V_{max} values in the hydrolysis of N_α -benzoyl-L-arginineamide by mackerel proteinase. WOLF plot

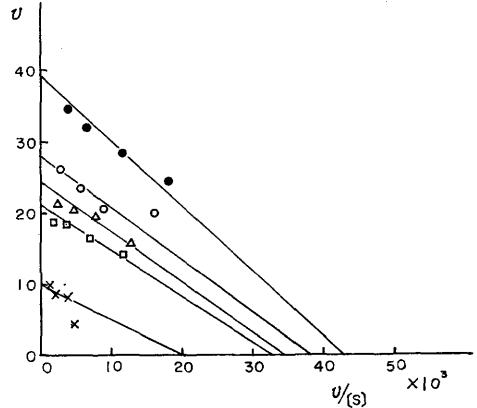


Fig. 3-c. Determinations of K_m and V_{max} values in the hydrolysis of N_α -benzoyl-L-arginineamide by mackerel proteinase. HOFSTEE plot

平均値はそれぞれ $0.79 \times 10^{-3} M$ および $27.7 M/mole$ enzyme/min であつた。

活性化エネルギーの測定 Table 1 に示した サバ幽門垂プロティナーゼによる各温度における N_α -benzoyl-L-arginineamide の加水分解反応の V_{max} を用い、 $\log V$ と $1/T$ に関し Arrhenius プロットを行なつた結果を Fig. 4 に示す。図に示すような反応温度 $5^\circ \sim 45^\circ C$ の範囲内では直線関係が得られ、その勾配よりサバ幽門垂プロティナーゼの活性化エネルギー E_a は $6.5 K cal/mole$ と求められた。

また Table 1 の K_m の値を用いて温度との相関すなわち pK_m と $1/T$ との関係を求めると Fig. 5 に示す通りである。図に示すように測定した温度範囲では直線関係が得られ、その勾配よりサバ幽門垂プロティナーゼと基質 N_α -benzoyl-L-arginineamide の結合反応のエンタルピーを求めると $-2.9 K cal$ であつた。

Table 1. K_m and V_{max} value of mackerel proteinase measured on the hydrolysis of N_α -benzoyl-L-arginineamide at various temperatures.

Temperature °C	$K_m \times 10^3$ M				V_{max} mole of $NH_3/mole$ of enzyme/min.			
	L	W	H	Mean value	L	W	H	Mean value
5	0.47	0.55	0.50	0.51	10.1	8.3	10.3	9.6
15	0.52	0.60	0.64	0.59	20.4	15.0	21.2	18.9
25	0.63	0.80	0.71	0.71	23.8	22.8	24.3	23.6
35	0.74	0.90	0.74	0.79	27.8	27.3	27.9	27.7
45	0.96	1.20	0.92	1.03	38.6	40.0	39.4	39.5

L: LINEWEAVER-BURK plot
 W: WOLF plot
 H: HOFSTEE plot

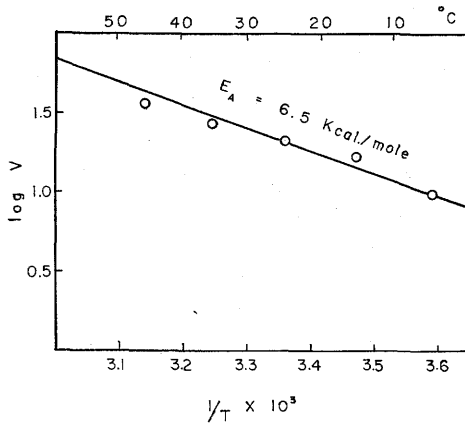


Fig. 4. Arrhenius diagram of mackerel proteinase drawn on the hydrolysis of N_α -benzoyl-L-arginineamide.

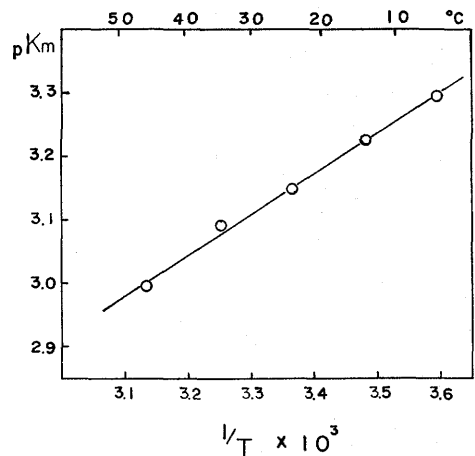


Fig. 5. Effect of temperature on K_m of mackerel proteinase.

考 察

精製サバ幽門垂プロティナーゼの物理化学的諸性質を明らかにするため反応速度論的検討を行なった。すなわち N_α -benzoyl-L-arginineamide を基質としたときの K_m は $0.79 \times 10^{-8} M$ ($35^\circ C$) であった。この値はペプシン⁵⁾、パバイン⁶⁾およびトリプシン⁷⁾の K_m に比較し小さい値を与えた。また V_{max} は $27.7 M/mole$ enzyme/min であった。 V_{max} ならびに K_m の値の温度との相関を示す Fig. 4, Fig. 5 で明らかなように、いずれのプロットも直線関係を示すことから遷移温度 (折点) は存在せず、したがって測定した温度範囲では酵素蛋白の立体構造の変化はないものと推定された。Fig. 4 より活性化エネルギーは $6.5 K cal$ と計算され、牛脾臓より抽出精製されたトリプシン⁷⁻⁸⁾ の活性化エネルギー $15.0 K cal$ よりもはるかに低い値であることが明らかにされた。 K_m が酵素-基質結合反応の解離定数に等しいとすると Fig. 5 よりサバ幽門垂プロティナーゼと N_α -benzoyl-L-arginineamide との結合反応のエンタルピーは $-2.9 K cal$ であることが明らかとなった。 K_m は酵素と基質の親和性を示すパラメーターとなり、また V_{max} はその基質に対する触媒能を示すパラメーターとなるから、これらのパラメーターを比較することにより酵素の特性を推定することも可能である。

サバ幽門垂プロティナーゼが、パバイン、トリプシンなどに比し、 K_m が小さく V_{max} が大きいこと、さらに活性化エネルギーが小さいことから考察すると、サバ幽門垂プロティナーゼは基質である N_α -benzoyl-L-arginineamide と結合して、いわゆる ES-complex を形成するが、この際の平衡は ES-complex 側にずれ、容易に、したがって速やかに ES-complex が形成され、同時に ES-complex から反応生成物への分解が促進されるものと推定される。これらの因子は大きな V_{max} を支える原因となるものであると考えられる。以上のことから、サバ幽門垂プロティナーゼは N_α -benzoyl-L-arginineamide と結合して安定な ES-complex の形成を容易にするために活性化エネルギーは低下し、従って分解物の生成を促進することによつて触媒反応全体の速度を増加するものであると考えられる。

要 約

精製サバ幽門垂プロティナーゼによる N_α -benzoyl-L-arginineamide の分解反応における反応速度の測定結果の解析から、ミハエリス定数 K_m 、最大反応速度 V_{max} および活性化エネルギー E_a を求めて本酵素の物理化学的性質を検討し、つぎの結果を得た。

1. N_α -benzoyl-L-arginineamide を基質としたときのサバ幽門垂プロティナーゼの K_m の値は $0.79 \times$

10^{-3} M であり、 V_{\max} の値は $27.7 \text{ M/mole enzyme/min}$ であることが明らかにされた。

2. 酵素反応の速度と反応温度との関係から、活性化エネルギー E_a を計算すると 6.5 K cal となつた。また K_m の値の温度依存性から、酵素と基質との結合反応のエンタルピーを計算すると -2.9 K cal であつた。

3. 以上の速度論的解析から得られたパラメーターをババインや陸棲動物の類縁酵素のそれに比較すると、 K_m および E_a の値はいずれも小さい傾向を示した。

文 献

- 1) 大城善太郎: 本誌, **37**, 145~148 (1971).
- 2) 大城善太郎: 本誌, **37**, 638~641 (1971).
- 3) 大城善太郎: 本誌, **34**, 847~852 (1968).
- 4) E. W. YEMM and E. C. COCKING: *Analyst*, **80**, 209~213 (1955).
- 5) E. J. CASEY and K. J. LAIDLER: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2159~2164 (1950).
- 6) A. STOCKELL and E. L. SMITH: *J. Biol. Chem.*, **227**, 1~26 (1957).
- 7) J. A. V. BUTLER: *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 2971~2974 (1941).
- 8) E. A. MOELWYN-HUGHES: in "The Enzymes" (J. B. SUMNER and K. MYRBÄCK, ed.), Vol. 1, 28~78, Academic Press, New York (1950).