

パピンの γ 線によるアクリルアミドゲル包括とその保護試薬

誌名	食品照射 = Food irradiation, Japan
ISSN	03871975
著者	河邊, 誠一郎
巻/号	15巻1/2号
掲載ページ	p. 24-29
発行年月	1980年9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



<Note>

パパインの γ -線によるアクリルアミドゲル包括とその保護試薬

岡山理科大学理学部基礎理学科

河邊 誠一郎

Immobilization of Papain by Polyacrylamide under γ -Ray
Irradiation in the Presence of Protective Agents

Seiichiro Kawabe

Department of Fundamental Natural Science, Okayama University
of Science, Okayama, Japan.

SUMMARY

Papain was immobilized in crosslinked polyacrylamide gel by γ -ray irradiation. Generally, acrylamide monomer acts denaturing agent and γ -ray decreases the activity of SH-enzymes.

We obtained the results that sulfur compounds such as glutathion, cysteine, or cysteamine (Fig. 1) and sodium p-chloromercuribenzoate (Fig. 2) decreased the denaturation of papain by γ -ray. Then, to protect papain against denaturing phenomena during polymerization, protective agents were added and compared with untreated papain. When sodium p-chloromercuribenzoate was used for protective agent, the activity yield attained up to about 1.7 fold (Fig. 3). But such protective effect was not obtained for sulfur compounds because they stop the radical polymerization and papain released from polyacrylamide gel.

The enzyme characteristics of gel entrapped papain was compared with that of native papain. Temperature, pH optima and the Michaelis constant were not affected by the immobilization (Fig. 4). Lyophilized beads exhibited good stability without loss of enzymatic activity when stored at 4°C for 30 days.

緒 言

放射線による酵素の固定化はDo, bo¹⁾らによって報告されて以来、前田ら²⁾川嶋らなど種々な固定化法が提案されている。しかし放射線を利用する場合、活性中心がスルフヒドリル(SH)基であるパパインのような酵素は、放射線に対して敏感で、すみやかに失活してしまうという欠点がある。これに対してPihlら⁴⁾はSH基をマスクし、照射後にこれを元に還元すれば活性はきわめてよく保持されることを示した。またBrighentiら⁵⁾は酵素溶液に芳香族アミノ酸や含イオウ化合物を添加することにより、放射線に対して保護効果があることを見出している。また宮本ら⁶⁾はアクリルアミ

ドモノマーがSH基を活性中心に持つ酵素に対して変性作用があることを述べ、これに対して基質を添加することにより、またSH基をEllman試薬で前処理することによりアクリルアミドモノマーによる変性から保護することができると報告している。そこで筆者らはアクリルアミドモノマーによるパピンの固定化の際に、SH基と選択的に結合するp-クロルマーキュリー安息香酸ナトリウム(PCMB)によって保護した場合と、システアミン(β -メルカプトエチルアミン塩酸塩)、L-システイン、グルタチオンなどの含イオウ化合物を添加した場合について、これらのr線に対する保護作用を検討した。

実験方法

PCMB化パピンの調製 Sannerら⁷⁾の方法を一部改変して行った。すなわちパピン(東京化成工業株)500mgを含むpH6.8、0.1Mリン酸緩衝液12mlを0.005M L-システインと0.002M EDTAによって活性化した後、これに0.1M NaOH溶液8mlに過剰のPCMB(100mg)を溶解したものを添加する。

この溶液を1昼夜透析し得られたPCMB化パピン溶液を遠心分離し濾過して得られた溶液を標準PCMB化パピン溶液とした。

固定化方法 アクリルアミドモノマー(AA)2.7g、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(MBA)0.3g、可溶性デンプン0.25gを蒸留水7ml中に溶解し、後述の保護剤添加(1mM)またはPCMB化した酵素液(3ml)をr線照射直前に混合した。

線源にはコバルト60r線(線量率 5.0×10^4 rad/hr)を窒素雰囲気下で250Krad照射し固定化パピンを得た。これを40~100 meshに調製し繰返し蒸留水で洗浄、凍結乾燥し実験に供した。

活性化測定法 固定化パピン200mg(乾燥物)を0.005M L-システイン、0.002M EDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)5mlで、40°C、20min間活性化した後、30mM N- α -benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid-HCl(BAPA)のリン酸緩衝液(Dimethylsulfoxide(DMSO)5%を含む)3mlを加え、40°Cで30min間反応させ、3%酢酸水溶液2mlで反応を停止した。そして生成したp-ニトロアニリン量を波長410nmで測定した。これに対してnativeパピンは活性化酵素液(3mg/ml)に1.2mM BAPA緩衝液を加え同様に反応させ測定した。

実験結果および考察

重合素材の影響 nativeパピンにゲル重合素材であるA.AとMBAを別個に加え、1hr 30°C pH6.8でインキュベートした。その結果、MBAは10mg/ml添加してもほとんど影響をおよぼさなかったが、A.Aでは添加量に従って活性が低下した。この結果は宮本ら⁶⁾の結果とよく一致するので、A.Aによってパピンの活性中心であるSH基が変化したものと考えられる。⁸⁾そこで固定化パピンを得る場合、酵素液と重合素材の混合は照射直前とした。

r線に対する保護物質の影響 一般にアミノ酸の放射線感受性はイオウを含むもの、芳香族を含むものが大きいとされている。そこでパピンのSH基を保護するために、これらの構造を持つアミノ酸を用い、r線に対する保護作用について検討した。その結果をFig. 1に示す。nativeパピンに

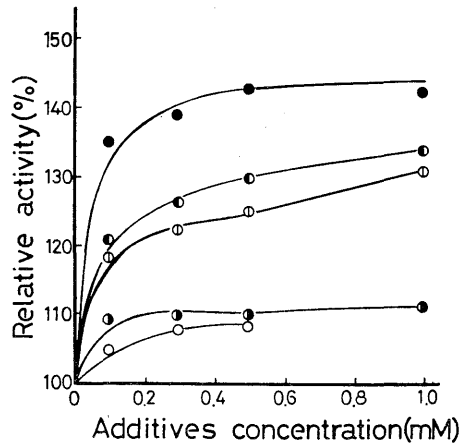


Fig. 1. Effect of concentration of protective agents added before γ -ray irradiation (100 Krad).

○ L-tyrosine, ○ L-methionine, ○ L-cysteine,
 ○ glutathione, ● cysteamine.

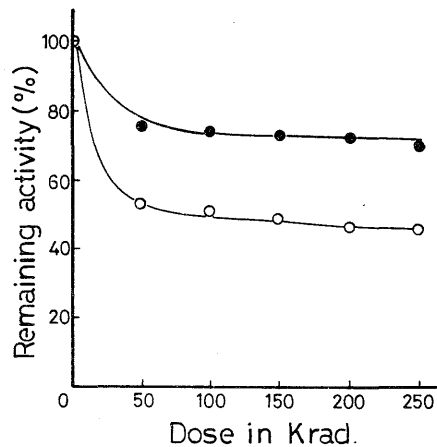


Fig. 2. The γ -ray inactivation.

○ native papain, ● PCMB papain

対し 0.5 mM 以上のシステアミン、グルタチオン、L-システインなどが γ 線に対する有効な保護剤であることがわかる。

つぎに SH 酵素の阻害剤である PCMB を加え、活性中心である SH 基を保護した状態で γ 線照射した。この結果を Fig. 2 に示したが、Sanner ら⁹⁾ の結果と類似したものであり、パパインの PCMB 化も γ 線に対する有効な手段であることがわかった。

パパインの固定化 (a) 照射線量とゲル収率 モノマー (A.A) 濃度 1.5 W/V%, 架橋剤 (MBA) 添加比 A.A/MBA = 1.5 の水溶液に γ 線を照射し生成したゲルの乾燥重量を測定した結果 50 Krad 以上でゲルの収率は 100% に達することがわかった。

筆者らはパパインをゲル包括する際、川嶋³⁾の固定化法に従いモノマー濃度を30%とし、可溶性デンプンを添加し、照射線量はゲル生成を完全にするために250 Kradとし、固定化パパインを調製した。

(b) 洗浄の影響 得られた固定化パパインの酵素脱離をLowry-Folin法で測定した。その結果1~2回の洗浄で脱離が完全になくなることがわかったので、以後蒸留水50 ml 2回の洗浄したものを凍結乾燥して固定化標品とした。

(c) モノマー比の変化 モノマー濃度を30%とし、AAとMBAの添加比を変えてゲルの性状および活性発現率を求めた。モノマー比(A.A/MBA) 1.4および9が一番高活性を示すことがわかったが、ゲル強度を考慮してモノマー比9を採用した。

(d) 保護剤共存下における固定化 native パパインでは含イオウ化合物のr線に対する保護効果が認められたが、固定化に際しこれらを各々1 mM添加してパパインを固定化した。その結果は期待されたような保護効果は認められず、逆に無添加のものよりはるかに低い活性の固定化物が得られた。これは洗浄時に酵素の脱離が著しいことから、添加物が重合反応を阻害しゲル格子が大きくなるためと思われる。つぎにパパインのSH基をPCMBで修飾した酵素を同様に固定化した。その結果をFig. 3に示す。nativeなものよりも約1.7倍活性の高い固定化パパインが得られた。固定化パパインの性質 固定化パパインの反応条件を検討した。固定化パパイン量200 mg(乾燥物)までは直線関係が成り立ち(Fig. 3)またこの200 mgを用いて反応させた時、90 min位まで生成物量は時間に比例していることがわかった。そこで30 minの反応で決定した、Fig. 4は固定化およびnative パパインの酵素活性におよぼすpH, 反応温度, 熱安定性, および低濃度基質(0.375~3.00 mM)における酵素活性からLineweaver-Burkプロットを求めた結果を示した。いずれの場合もNative パパインと固定化パパインはほぼ同一の値, 傾向を示し電的に中性をアクリ

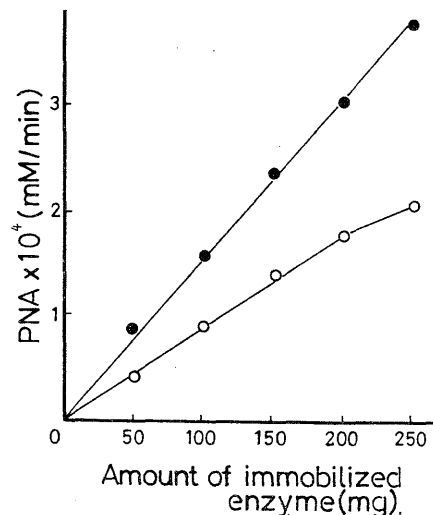


Fig. 3. Effect of concentration of immobilized enzyme on reaction rate.

○ native papain ● PCMB papain

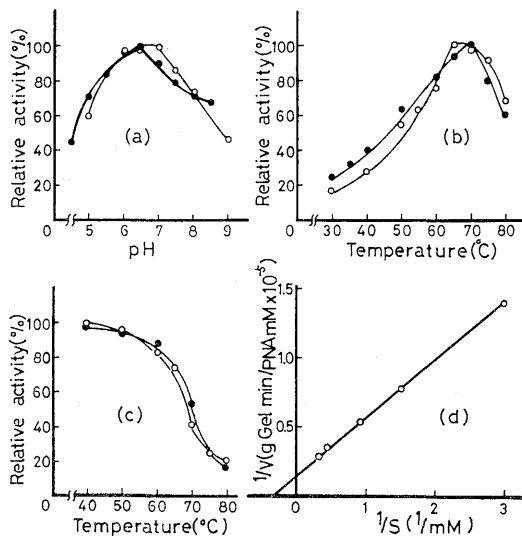
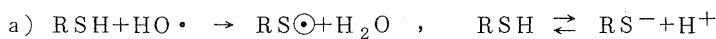


Fig. 4. (a). pH-activity curve, (b). Temperature-activity curve, (c). Thermal stability, (d). Lineweaver-Burk plots.
 ○ immobilized papain, ● native papain.

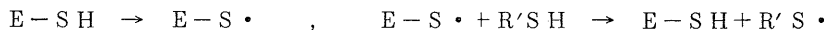
ルアミドの包括例と良く一致した。¹⁰⁾ なお固定化パピンの見掛けのMichaelis定数Kmは2.5 mMとなり, native パピンのそれと同一値を示した。

考 察

native パピンの溶液中では含イオウ化合物はつぎのような理由によって酵素を保護したものと考えられる。¹¹⁾



b) パピンの活性中心であるSH基上に生成したラジカルと化学反応してつぎのような修飾反応を行う。



c) パピンのSH基をマスクしてHO \odot などの作用から保護する。



d) 分子内, 分子間のエネルギー転位を受け他の部位の損傷を防ぐ。

e) 溶存酸素と反応し, これを消費して酸素効果を除く。

しかし, この γ 線に対する感受性の高さが逆に重合素材と反応してしまい期待された結果は得られなかった。また含イオウ化合物が重合反応の阻害剤となる事を確認するため, グルタチオンを多量に添加したものを γ 線照射したところ軟弱なゲルしか得られず, やはりラジカル重合の停止剤の役割をしているものと考えられる。

一方、PCMBで保護した場合、その酵素活性は native パパイン全活性の 13.0% となり、未処理のまま固定化した場合の 7.8% よりも約 1.7 倍の活性が得られた。この理由として γ 線に対する保護効果と、アクリルアミドモノマーの変性作用に対してもある程度保護されたための両者の相乗効果によるものと考えられる。また川嶋ら¹²⁾のインペルターゼその他の酵素の場合と比較して筆者のパパインにおける固定化時の活性が低くなったのは、パパインの分子量が小さく、洗浄時にゲル格子中から脱離したこと、活性中心以外でのパパインタンパクの γ 線による変化が考えられる。

native パパインの酵素的性質と比較して、pH、温度、熱安定性、基質濃度などの影響は小さい。よってパパインはゲル内に物理的に包括されているものと思われる。

本研究にあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました早稲田大学理学部宇佐美昭次教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Dovbo, J. : Acta.Chem. Acad. Sci. Hung., 63 , 453 (1970)
- 2) 前田, 鈴木 : 発酵と工業, 35 (2) , 92 (1977)
- 3) 川嶋 : 発酵と工業, 35 (3) , 182 (1977)
- 4) Pihl, A., Sanner, T. : Rad. Res., 19 , 27 (1963)
- 5) Brighenti, L., Falaschi, A. : Biochem.Biophys.Acta., 59 , 376 (1962)
- 6) Miyamoto, K., Ohyabu, M., Oka, M., Miura, Y. : J. Ferment. Technol., 55 , 63 (1977)
- 7) Sanner, T., Pihl, A. : J. Biol. Chem., 238 , 165 (1963)
- 8) Cavins, J. F., Fri, M. : J. Biol. Chem., 243, 3357 (1968)
- 9) Pihl, A., Sanner, T. : Biochem. Biophys. Acta., 78, 573 (1963)
- 10) 宇佐美, 倉都 : 醸工, 51, 789 (1973)
- 11) 岡村, 志田, 波田野 : 化学増刊 24 放射線化学 P219 , 化学同人
- 12) Kawashima, K., Umeda, K. : Agr. Biol. Chem., 40 , 1151 (1976)