

研究ノート

アスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ（レグマチュレイン）
迅速活性測定法および酵素の性質荒平 正緒美^{§*}, 菅原 潔*, 深澤 親房**

*食品総合研究所, **前食品総合研究所, 現くめ・クオリティ・プロダクツ株式会社

Quantitative Assay Method for Asparagine residue-
specific endoprotease (legumaturain) activity and
characterization of legumaturainMasaomi Arahira^{§*}, Kiyoshi Sugawara* and Chikafusa Fukazawa**

*National Food Research Institute, NARO **Kume Quality Products Co.,Ltd.

Abstract

A rapid assay method for the activity of an asparagine residue-specific endoprotease (legumaturain) is disclosed. This method comprises measuring fluorescence intensity generated by hydrolysis of fluorescence quenching substrate (MOCAC-GKSRRNGIK (Dnp) -D-Arg-D-Arg-NH₂). Characterization of legumaturain was carried out with the substrate.

アスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼは、ペプチド又はタンパク質中のアスパラギン残基のC-末端を特異的に切断する酵素である。特に植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼをレグマチュレインと名付けている。レグマチュレインは、優れた蛋白源である植物種子の貯蔵タンパク質の生合成に係わる重要な酵素である。ダイズの主要な貯蔵タンパク質であるグリシニン[§]は、まず、酸性サブユニットと塩基性サブユニットが繋がった状態の一本のポリペプチド（ダイズグリシニン前駆体）として合成される。その後、レグマチュレインにより、サブユニット間が特異的に切断されてはじめて、成熟体としてのグリシニンとなる。したがって、レグマチュレインは、グリシニン等貯蔵タンパク質を食品産業的に利用する場合に重要である。そのため、レグマチュレインの酵素活性測定法が要求され、従来は以下の方法が用いられていた。①ダイズグリシニン等の前駆体（天然の11S型種

子貯蔵蛋白質前駆体）を大腸菌体内で発現させて精製した後に、これを基質としてレグマチュレインで切断し、生じた酸性サブユニット及び基性サブユニットをSDS-PAGEで分離する。次いで、PVDF膜にブロットニングした後、塩基性サブユニットに対する抗体を用いて、該サブユニットをイムノブロット法で高感度で検出する方法である。②レグマチュレインをアスパラギン残基を含む合成ペプチドに作用させた後、高速液体クロマトグラフィーを用いて、基質と生成したペプチドを分離し、その切断活性を定量する方法である。①の方法は、比較的多くのサンプルを1度に測定することができ、感度も非常に高いという長所を有しているが、活性の検出に丸1日程度の時間を要し、迅速な測定法とは言えない。また、②の方法も、1サンプルあたり30分程度の時間を必要とする。

本報告は、レグマチュレインの酵素活性を迅速、特異的、かつ簡便に測定することが可能なレグマチュレ

2006年12月27日受付, 2007年1月29日受理

[§]連絡先 (Corresponding author) arahira@affrc.go.jp

インの酵素活性測定法を開発することを目的とした。

実験方法

1. 実験材料

蛍光基質であるベンジルカルボニルアラニルアラニルアスパラギニル-7-(4-メチル)-クマリルアミド (Benzyloxycarbonyl-AAN-7-(4-methyl)-coumarylamide) は, Dr. Barrett, A.J. (Strangeways Research Laboratory, Cambridge, U.K.) から分与された。その他の消光性蛍光ペプチドを含むオリゴペプチドは, (株) 宝酒造および (財) ペプチド研究所にて依頼合成した。また, その他試薬類は, 特記している場合を除いて, 和光純薬社製のものをを用いた。

2. グリシニン前駆体を用いた活性測定法

精製グリシニン前駆体 proA1aB1b に対する切断活性の測定は, 村松・深澤の方法に従った^{1,2)}。

3. 合成ペプチドを用いた活性測定

グリシニン前駆体および他の植物由来11S型タンパク質前駆体の切断部位周辺領域の配列を基に合成したペプチドを基質に用いた。セリルアルギニルアスパラギニルグリシルイソロイシルアスパルテイルグルタミン酸 (NH₂-SRNGIDE-COOH), ジニトロフェニルプロリルグルタミルアラニルアスパラギンアミド (Dnp-PEAN-NH₂) を合成・高速液体クロマトグラフィーで精製し基質として用いた (宝酒造社製)。1 mM の2-メルカプトエタノールを含む70 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に基質として上記合成ペプチド30 μ M を含み, 酵素を加えた反応液量を最終的に50 μ l とした。37 $^{\circ}$ C で, 一定時間反応後, 反応液を高速液体クロマトグラフィー (島津社製 LC-10) に供した。カラムは, Silica-ODS 120T, ϕ 4.6 x 150 mm (東ソー社製) を用い, 流速は1 ml/min, 0.1 % トリフルオロ酢酸 (TFA) と0~30 % のアセトニトリルを含む0.1 % TFA の直線濃度勾配により, 切断されたペプチドを溶出した^{1,3)}。基質に対する標準曲線を0~30 μ M について作製し, 一定時間に対する基質の減少量を求めて酵素活性とした。

4. 蛍光基質を用いた活性測定法

最終濃度5 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 6.8), 0.003 % Brij35 およびジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した4 μ M Benzyloxycarbonyl-AAN-7-(4-methyl)-coumarylamide を含み, 酵素を加えた反応液量を最終的に1 ml とした。37 $^{\circ}$ C で, 一定時間保温後, 100 ml の5 M 酢酸を加えて反応を停止した後に, 励起波長380 nm で励起し, 蛍光波長460 nm で蛍光強度を測定した⁴⁾。生成物である7-アミノ-4-メチル-クマリン (7-amino-4-methyl-coumarin) (ペプチド研究所社製) を用いて蛍光の標準曲線を0~4 μ M の範囲で作成し, 反応時間内における蛍光強度の増加量を求めて酵素活性とした。

に1 ml とした。37 $^{\circ}$ C で, 一定時間保温後, 100 ml の5 M 酢酸を加えて反応を停止した後に, 励起波長380 nm で励起し, 蛍光波長460 nm で蛍光強度を測定した⁴⁾。生成物である7-アミノ-4-メチル-クマリン (7-amino-4-methyl-coumarin) (ペプチド研究所社製) を用いて蛍光の標準曲線を0~4 μ M の範囲で作成し, 反応時間内における蛍光強度の増加量を求めて酵素活性とした。

5. 消光性蛍光基質を用いた活性測定

N-末端側に (7-メチル-クマリン-4-イル) アセチル基 (以下MOCAc基とする) を, リジン残基にジニトロフェニル基 (以下Dnp基とする) を結合させた消光性ペプチドMOCAc-グリシル-リジル-セリル-アルギニル-アルギニル-アスパラギニル-グリシル-イソロイシル-リジル (Dnp) -D-アルギニル-D-アルギニンアミド (MOCAc-GKSRRNGIK (Dnp) -D-Arg-D-Arg-NH₂) をデザインし, ペプチド研究所社に合成を依頼した。本消光性蛍光基質は, MOCAc基とDnp基がそれぞれの蛍光を阻害しており, 切断されることにより, 蛍光を発する基質である。最終濃度5 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 6.8), 0.003 % Brij35, およびDMSO に溶解した4 μ M のMOCAc-GKSRRNGIK (Dnp) -D-Arg-D-Arg-NH₂ を含み, 酵素を加えた反応液量を最終的に1 ml とした。37 $^{\circ}$ C で, 一定時間保温後, 100 μ l の5 M 酢酸を加えて反応を停止した後に, 励起波長328 nm で励起し, 蛍光波長393 nm で蛍光強度を測定して定量化した⁵⁾。生成物であるMOCAc-GKSRRN を合成 (ペプチド研究所社へ依頼合成) して標準曲線を0~4 μ M の範囲で作成し, 一定時間に対する生成物の増加量を求めて酵素活性とした。

実験結果及び考察

1. レグマチュレイン活性を迅速に測定するための基質の検討

ダイズ由来のレグマチュレインの精製は, グリシニン前駆体を基質とした切断活性をモニターすること及び, 合成ペプチドNH₂-SRNGIDE-COOH にレグマチュレインを作用させた時の高速液体クロマトグラフィーの分離パターンから行ってきた。しかしながら, 精製したレグマチュレインは, 非常に不安定なため, 迅速な測定が必要であった。このため, 宝酒造がレグマチュレインに似た性質を持つ酵素の活性測定基質として用いているDnp-PEAN-NH₂⁶⁾, Dr. Barrett, A.J. から分与された蛍光基質であるBenzyloxycarbonyl-AAN-7-(4-

methylyl)-coumarylamide⁴⁾ および今回合成した消光性蛍光基質MOCAC-GKSRRNGIK (Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH₂それぞれについて、レグマチュレインの活性測定が可能か否かを検討した。Dnp-PEAN-NH₂ 及び Benzyloxycarbonyl-AAN-7-(4-methyl)-coumarylamideを用いる方法は、トリプシンをはじめとするプロテアーゼの活性測定法でよく使用される、いわゆるアミダーゼ活性を測定する方法である。

その結果、Dnp-PEAN-NH₂およびBenzyloxycarbonyl-AAN-7-(4-methyl)-coumarylamideは、レグマチュレインでは切断されず、この結果から、レグマチュレインは、アミダーゼ活性を持つ酵素ではないということが明らかとなった。また、レグマチュレインはMOCAC-GKSRRNGIK (Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH₂を切断し、このことから、本酵素活性の迅速な測定が可能となった(表1)。

表1 各合成ペプチドを用いたレグマチュレイン活性

合成ペプチド	活性
Dnp-PEAN-NH ₂	N.D.
Benzyloxycarbonyl-AAN-7-(4-methyl)-coumarylamide	N.D.
NH ₂ -SRNGIDE-COOH	+
MOCAC-GKSRRNGIK(Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH ₂	+

N.D.: not detected

また、消光性蛍光基質は疎水性が高く、反応液に対する溶解性に劣るため、まずDMSOに溶解した後に反応液に添加した。DMSOの使用量は、酵素活性に影響しない4% (V/V) 以下となるようにした。このことから、反応液への消光性蛍光基質の添加量は、該基質をDMSOに0.2mMとなるように溶解した場合、反応液1mlあたり5~40 μ lとした。

一般的なアスパラギン残基に特異的なエンドプロテアーゼの酵素活性定量法として、プロテアーゼ活性の代わりにアミド化したアミノ酸からのアミノ基を遊離する活性であるアミダーゼ活性を測定する方法がある^{4,6)}。レグマチュレインについて、アミダーゼ活性の測定を行ったが、レグマチュレインは、これらの基質に対して活性を示さなかった。すなわち、レグマチュレインの活性を測定するにあたり、C-末端にあるアスパラギン残基のカルボキシル基をアミド化したペプチドを用いる方法は採用できないことが判明した(表1参照)。一方、前述のように、主要なダイズグリシニン前駆体、A₂B_{1a}サブユニットの酸性サブユニットと塩基性サブユニットの切断部位⁷⁾を基にして合成した消光性蛍光基質を用いることにより、レグマチュレイン活性を迅速に、しかも高感度で定量できることを見出した。

2. レグマチュレインの酵素的性質について

消光性蛍光基質を用いて本酵素の性質について検討を加えた。図1に示したように、酵素活性の至適温度

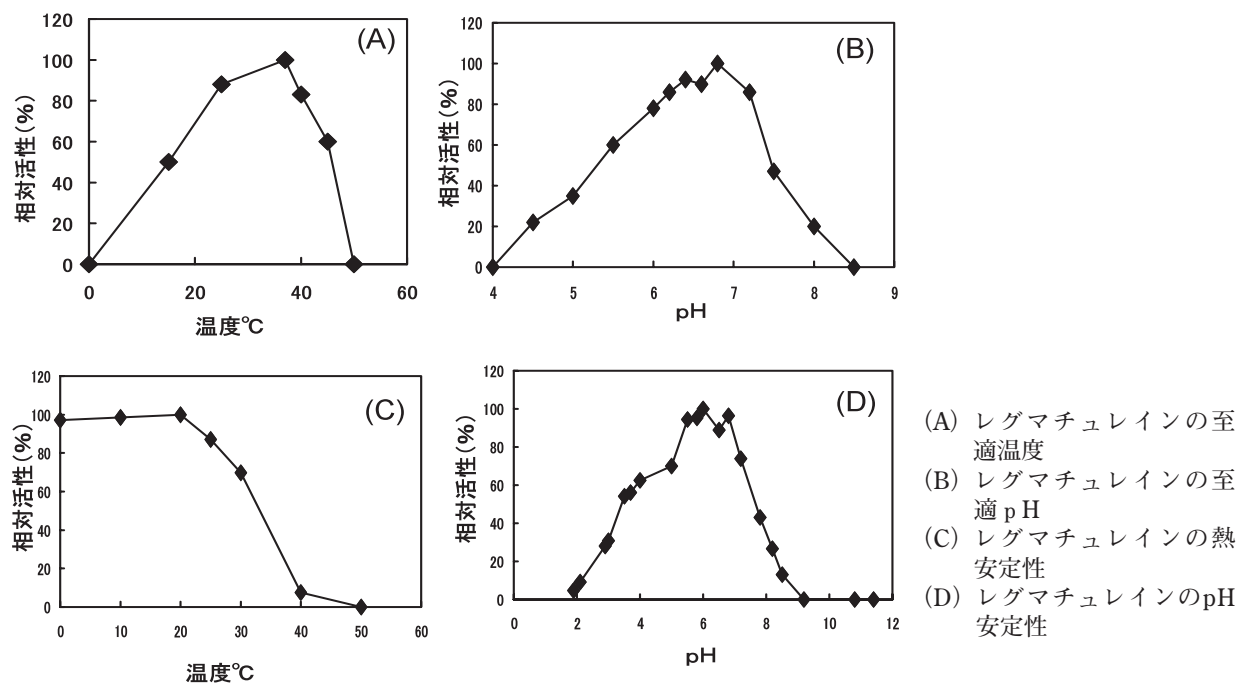


図1 レグマチュレインの活性及び安定性に対するpHと温度の影響

は35℃, また, 至適pHは6.8であった. 次に, 酵素を0~60℃の範囲で30分静置後, 熱安定性を検討した結果, 安定な温度は, 0~20℃と極めて低く, 40℃ではほぼ0となった. また, pH安定性は, 酵素をpH1.9~11.4の間に20℃で30分静置後, 残存活性を検討した. その結果, pH4~8の範囲で安定であった. レグマチュレインは, 至適温度が25~37℃であり, 一般的な植物由来の酵素と似たような傾向をしめした. また, 本酵素の活性の至適pHおよびpH安定域は, ほぼ中性域にあり, グリシニン等基質となるタンパク質も安定に存在するpH域で活性が最大限に発揮されると思われた.

精製した本酵素は, 極めて不安定であり, 4℃, 約4時間の保存で, その酵素活性は, 約50%にまで低下した(図2). この原因をSDS-PAGE的に検討したが, 泳動パターンに変化はなかったことから, 熱不安定性の

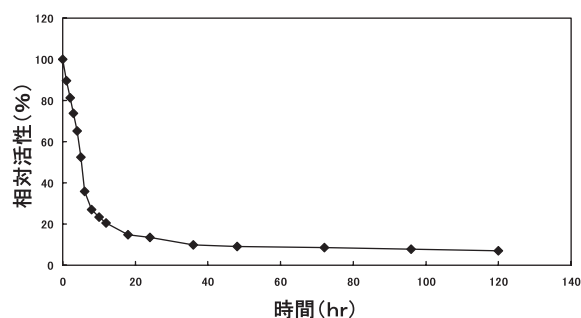


図2 レグマチュレインの4℃保存における安定性

要因は, 自己分解ではないことが示唆された.

一方, 各種タンパク質分解酵素阻害剤に対する影響を検討した結果, システイン型酵素阻害剤であるパークロロマーキュリー安息香酸(PCMB)や酢酸水銀により, 強く阻害されることから, 本酵素は, システインプロテアーゼの一種であると考えられる. しかしながら, E64 [L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino-butane)] による阻害は認められず, 同試薬によって阻害を受ける植物由来のパパインなど他のシステインプロテアーゼとは, 異なった活性部位を持つということが示唆された⁸⁾(表2).

表2 レグマチュレインに対する各種のタンパク質分解酵素阻害剤の効果

阻 害 剤	阻害率(%)
なし	7
システインプロテアーゼ阻害剤	
パークロロマーキュリー安息香酸 (0.1 mM)	99
N-エチルマレイミド (0.1 mM)	41
酢酸水銀 (0.1 mM)	100
ヨードアセトアミド (20.0 mM)	93
E 6 4 (0.5 mM)	0
セリンプロテアーゼ阻害剤	
アンチパイン (1.0 mM)	0
キモスタチン (0.1 mM)	7

要 約

MOCAC-GKSRRNGIK (Dnp) -D-Arg-D-Arg-NH₂を基質として用いるアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ(レグマチュレイン)の迅速活性測定法を開発した. また, 本法を用いて本酵素の性質を検討した.

文 献

- 1) Muramatsu, M. and Fukazawa, C. A high-order structure of plant storage proprotein allows its second conversion by an asparagine-specific cysteine protease, novel proteolytic enzyme. *European Journal of Biochemistry*, **215**, 123-132 (1993).
- 2) Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 3) Arahira, M. and Fukazawa, C. Ginkgo 11S seed storage protein family mRNA: unusual Asn-Asn linkage as post-translational cleavage site. *Plant Molecular Biology*, **25**, 597-605 (1994).
- 4) Kembhavi, A.A., Buttle, D.J., Knight, G., and Barrett, A.J. The two cysteine endopeptidases of legume seeds: Purification and characterization by use of specific fluorometric assay. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **303**, 208-213 (1993).
- 5) Knight, C.G., Willenbrock, F. and Murophy, G. A novel coumarin-labeled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinase. *FEBS Letter*, **296**, 263-266 (1992).

- 6) Abe, Y., Shirane, K., Yokozawa, H., Matsushita, H., Mita, M., Kato, I., and Ishii, S. Asparaginyl endopeptidase of jack bean seed. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 3525-3529 (1993).
- 7) Momma, T., Negoro, T., Udaka, K., and Fukazawa, C. A complete cDNA coding for the sequence of glycinin A2B1a subunit precursor. *FEBS Letter*, **188**, 117-122 (1985).
- 8) Kim MJ, Yamamoto D, Matsumoto K, Inoue M, Ishida T, Mizuno H, Sumiya S, Kitamura K. Crystal structure of papain-E64-c complex. Binding diversity of E64-c to papain S2 and S3 subsites. *Biochem J.*, **287** , 797-803 (1992).

