

ミミズ *Lumbricus Rubellus* 自己分解物に発見された 非常に安定した効能のあるフィブリン溶解酵素

摘要

1. ミミズの自己分解物はフィブリン (綿維素) とトロンビン基質に対し強力な加水分解活性を示す事を発見した。
2. また、綿維素原 (フィブリノゲン) 又は血漿を添加した系では血栓形成活性を示した。
3. ザイモグラフィにより自己分解物には分子量 40,000 · 21,000 · 15,000 の 3つの活性物質があることがわかった。
4. 分子量 35,500(SDS-PAGE による)の主成分をさらに精製した。この酵素の N-末端 16 個のアミノ酸配列はブタ豚のプロエラスターゼに類似するものであった。

Introduction (序説)

ミミズは中国では解熱薬と利尿薬として地龍と言う名で、日本では古くから民間の治療として使われている(Tanaka and Nakata, 1974; Jiang 1991)。しかしながら、それらの効力のある成分は解熱作用のある Lumbrifebrine (Tanaka and Nakata, 1974)と著者達が発見した血小板凝集を阻害する 2-エチル-5-ヘキシル-フラン-3-カルボン酸塩のフラン化合物 (Yoneta et al., 1988)以外は未だはっきりとしていない。

著者達はこれまでにミミズ抽出物から分離させた幾つかの線溶酵素を報告している。(Mihara et al., 1983, 1990, 1991)そのような酵素の動物や人間への投与は血漿綿維素溶解を誘発し、血栓症の治療に臨床的な効果をあげる。(Sumi et al., 1980, 1987, 1990; Toki et al., 1985) 高い線溶活性をもつミミズの粉末のカプセルは最近成人病予防の健康保険薬として韓国で認可された(Dacdo, 1990)。

本書は長期間保存したミミズの自己溶解物の溶液に着実な効能のある新しい酵素の物理化学的な性質を報告する。

Materials And Methods (原料と方法)

使用物質 ; ミミズ、*Lumbricus rubellus* (日本、宮崎医科大学 動物実験センター) ; ブタ豚トリプシン (タイプ I)、アプロチニン、ダイズ・トリプシンインヒビター (SBTI)、フルオロリン酸ジイソプロピル (DFP)、(ミズーリ州、セイント・ルイス、Sigma Chemical Co.) ; E-アミノカプロン酸、trans-4-aminomethyl-cyclohexanecarboxylic acid (t-AMCHA) (日本第一製薬より)、ヒトのウロキナーゼ (高分子量 (53,000) と低分子量 (32,000)、(日本、大阪、ミドリ十字)、Bz-DL-Arg-pNA と Bz-L-Tyr-pNA (日本、大阪、the Protein Research Foundation, Osaka University より)、pyro-Glu-Gly-Arg-pNA (S-2444), pyro-Glu-Pro-Val-pNA (S-2428),

H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251), H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S2288), H-D-Phe-Arg-pNA (S-2238), H-D-Val-Leu-Arg-pNA (S-2266) (米国、Kabi Group, Inc.より)。その他すべての化学製品は一般商業商品から最高品質のものを入手した。ミミズ酵素を精製するため、ミミズ自己分解物 50 ml (プロテイン: 125mg) を 0.15M NaCl を含む Ph7.2 0.01M リン酸塩緩衝液で平衡化した。Cellulofine GCL 2000 のゲルろ過によって処理された。線溶活性を持つ酵素分画はさらに DEAE-Toyopearl と Mono-Q (HPLC) columns (pharmacia Chemica Co., Uppsala, Sweden) により精製し最終的に 特異活性 106.3 U/mg protein の(0.16mg 精製物を得た。1 V は 1 nmole o の H-D-Phe Pip-Arg-pNA を pH 7.2, at 37°C/min)で水解するのに必要な量に相当する。

アミダーゼ活性は比色定量的にエンド・ポイント法によっていくつかの合基質を用いて測定した(Claeson et al.,1987)。: 反応系 (1 ml) は酵素試料と 2.5×10^{-4} M の基質と 0.15 M NaCl を含む, pH7.2, 0.01M リン酸塩緩衝液から成る。線溶活性は Milstone 方法 (1941) によって標準のフィブリン(平板)を用いて測定した(Astrup and Mullertz, 1952)。Harter によって発明されたトロンボエラストグラフィーはヒトもしくはネズミの血漿を用いて決まった手順に従い TEG 器によって行われた。タンパク濃度はウシの血漿アルブミン (Armour Pharmaceutical Co.)を参照用プロテインとして Lowry et al.(1951)の方法で測定した。SDS-PAGE ゲルによって分離したタンパクの線溶活性は Tissot et al.(1982)の電気泳動法によって測定した。等電点電気泳動は両性電解質 pH 3.5 - 10.5 を使い Vesterberg と Svensson (1966) の方法に従い実行された。

Result (結果)

図 1 は 5-30ul のミミズ自己分解物 (濃く黒い液はミミズに湿重量 2 倍分の水を加えて、7 年間密閉容器に入れて得られた。)を加えて人口血栓が溶解した状態を示している。この溶液の線溶活性は標準フィブリン平板法によって 3000 IU/ml 以上であることがわかった。更に、その高い線溶活性はフィブリン平板中のプラズミノゲンによって影響されなかった、すなわち直接線溶活性を示すプラスミン様の酵素であることがわかった。この酵素はまたカゼインとゼラチン(ager-plate 方法)には同じ測定条件下で同様に作用したが、コラーゲンとエラスチンには弱い作用しか示さなかった (参照無し)。ミミズ自己分解物の Amido 分解活性はいくつかの合成基質で測定した。表で示されている通り、一番感度の高い基質はトロンビン基質 N-D-Phe-Pip-Arg-pNA であった。次の順に効力が少なくなっていく。ウロキナーゼ基質 pyro-Glu-Gly-Arg-pNA、カリクレイン基質 H-D-Val-Leu-Arg-pNA 組織プラズミノゲンアクチベーター基質 H-D-Ile-Pro-Arg-pNA, プラスミン基質 H-D-Val-Leu-Lys-pNA, トリプシン基質 Bz-L-Arg-pNA。

これは 0.4%フィブリン溶液に加えると溶液が凝固したことからトロンビン様酵素であることが確認された。濃度を 2^{-13} もしくはそれ以下に薄めた場合、フィブリンゲ

ンと同等量酵素溶液を加えると凝固を引き起こした(これは 400 U/ml 又はそれ以上のトロンビンと同等の活性である)。更に、酵素をヒト又はネズミの血漿に加えても凝固が起こった；酵素溶液 10 μ l をヒト血液 0.28 ml に加えると TEG では r 値が減少し、M α 数値が増加した。

対照的に、酵素溶液を濃度 2 \cdot 9 までの希釈では、線溶が凝固活性よりも顕著となり M α 値では減少した。線溶活性は (1mM) DEP を (10 mg/ml) SBTI (10KIU/ml) アプロチニン抑制された。10 mM E-ACA 又は 10 mM t-AMCHA では抑制は見られなかった。そのままの状態での線溶酵素 (中性 pH) では比較的安定であったが 60°C 以上で徐々に不活性化した。氷結と氷解を 5 回繰り返した後、活性の 95% 以上が残ったままであった。5.0–11.0 の pH 値では室温で 20 分間安定していたが、pH4.0 以下では不安定であった。

図 2 はミミズ自己分解物のザイモグラフのパターンを示している。主成分は分子量約 40,000 と 21,000 であった。更に分子量 15,000 のマイナーな成分も検出された。高い活性を持つ主な酵素を、線溶活性を指標に更に精製した。イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過によりポリアクリルアミド電気泳動で一本のバンドとなるところまで精製された。

SDS-PAGE での分子量は 35,500 であった。DEP 処理により酵素の N-末端アミノ酸配列は Ile-Val-Gly-Gly-IleGlu-Ala-Arg-Pro-Tyr-Glu-Phe-Pro-Trp-Gln-Val であることがわかった。

Discussion (討論)

ミミズには (カゼイン)、ゼラチン、アルブミンを分解するいくつかの蛋白分解酵素 (プロテアーゼ) が含まれている事は、以前より良く知られている。(Keilin, 1920; Pak, 1979) また Lumbrokinase と呼ばれる線溶酵素がミミズに含まれている、と本書の著者達は報告している。(Mihara et al., 1983, 1990, 1991) しかしながら、本研究で示したより高い安定性のあるプロテアーゼの存在は知られていなかった。7 年間置いておいたミミズのサンプルの中の、ほとんどのタンパク質は完全に分解したため、安定性のある線溶酵素のみを残留物として分離又は精製する事は簡単であろう。本研究では、著者達は主要な酵素を精製し、N 末端 16 個のアミノ酸配列を示した。それらはブタ腓プロエラスターゼ (エラスターゼ 2 前駆物質) とヒト腓プロエラスターゼ (エラスターゼ 2A 前駆物質) にそれぞれ 66.7 と 60.0% の相同性を示した。ミミズの自己分解物は強い線溶活性と加水分解するカゼインや様々なアミノ基質、特に H-D-Phe-Pip-Arg-pNA のようなトロンビン基質に対する水解活性を持っている。しかしながら、フィブリノーゲンへの反応と TEG の r 値減少から自己分解物はトロンビンと良く似ているという事が明らかとなった。トロンビンは分子中にプラスミン又はプラスミノゲンアクチベーターに良く似た又はクリングル構造を持っている。更に、遺伝的

には線溶酵素に非常に関係がある。ミミズ酵素の分子構造は今までのところまだ報告されていないが、本研究結果からは今日のプラスミンの原始的性質に相当するのかもしれない。何と言っても、溶解して安定性のある動物由来プロテアーゼについての報告は未だない。飲薬として効果があるか確認するためには酵素自体の構造とミミズに発見された安定化因子に関する更なる研究が必要である。

図 1. —ミミズ自己分解物による人工血栓の強い溶解現象

(a) の自己分解物はミミズに温重量 2 倍分の水を加えて、常温で 7 年間保たれて生じたものである。それは濃い黒い液体であった。(b) の強いフィブリン溶解は自己分解物上清 5、10、20、30 ul を標準フィブリン平板に加えた後、18 時間 37°C で incubation によって生じた。活性化の計算には、高分子量ウロキナーゼ (S.A. 67,000 IU/mg protein) を標準として用いた。

図 2. —ミミズ自己分解物のザイモグラフィ

約 20 ul (a) と 5 ul (b) の自己分解物が使われた。右端の数字はウロキナーゼを基準とした分子量を表している。

表 1. —ミミズの自己分解物の故種の合成基質に対する amidolytic 活性の比較

反応系 (1 ml) には Cellulofine GCL 2,000 ゲルろ過によって部分精製されたミミズ自己分解物 25-100 ul, 2.3×10^{-4} M 合成基質と 0.15 M NaCl を含む pH7.2 の 0.01M リン酸塩緩衝剤が含まれている。37°C で 10 分間 incubation した後、遊離した p-nitroaniline を 405 nm の吸光度で測定した。

結果は 1ml の自己分解物により毎分加水分解される基質量 (nmoles) を表している。それぞれの値は 3 回測定した平均である。

訳：小澤 智美