



タンパク質分解酵素の不活性化と再活性化

本研究は、平成24(2012)年度日本農芸化学会大会(開催地・京都)での「ジュニア農芸化学会」において、「カルナバイオサイエンス賞」に選ばれた。果汁を含んだゼリー(ゼラチン)が固まらないことは有名であるが、発表者らは、これが果樹中のタンパク質分解酵素の働きによるものと考え、ゼラチンの凝固阻害活性を指標として果汁が含むタンパク質分解酵素の性質を調べた。得られた研究成果は、関連研究者にとっても示唆に富むものであり、高く評価された。



本研究の背景、実験方法および結果

【目的】パイナップルの果汁に含まれるタンパク質分解酵素プロメラインは、活性中心を形成するチオール基の働きによりペプチド結合を分解するチオールプロテアーゼの一種である。このチオール基を酸化剤により処理し一時的に酵素を不活性化させ、また還元剤により処理することによって再活性化させることができるのではないかと考え、本研究に取り組んだ。この際、酸化剤による酵素の不活性化の効率を、固化したゼラチンの粘度を指標に定量することにも取り組んだ。

【方法】

- ① 過酸化水素によるタンパク質分解酵素の不活性化：パイナップル果汁2.5 mLに0.003～0.01%過酸化水素水10 mLを加え、30分間攪拌し、パイナップル果汁に含まれる酵素を不活性化させた。これに、5.0%ゼラチン溶液40 mLを混ぜ、プラスチック注射器に充填し、24時間静置した後、凝固の有無を調べた。不活性化の程度は、上記の処理により凝固したゼラチンを40℃のインキュベーター内で加温、融解させ、プラスチック注射器から溶け落ちる時間を測定することにより定量した。
- ② 還元剤によるタンパク質分解酵素の再活性化：①で

凝固させたゼラチンを湯浴中で融解させ、これに還元剤を加え30分間攪拌した後、冷却し、凝固の有無を観察した。還元剤としては、0.01 mol/Lシュウ酸水溶液10 mL、0.02～0.14 gのシステインまたは他のアミノ酸のいずれかを用いた。

【結果と考察】

① 過酸化水素によるタンパク質分解酵素の不活性化：通常、パイナップル果汁を混ぜ合わせたゼラチン溶液は凝固しないが、パイナップル果汁を過酸化水素水で処理した場合はゼラチン溶液が凝固したことから、過酸化水素が果汁中のタンパク質分解酵素(プロメライン)を不活性化させることがわかった(図1)。その際、添加した過酸化水素の濃度の違いにより、凝固したゼラチンの硬さ(粘度)が異なることに気づいた。そこで、過酸化水素によるタンパク質分解酵素の不活性化の効率をゼラチンの粘度を指標に定量できるかどうかを検討した。

まず、注射器に充填したゼラチンを40℃に加温し、加温開始からゼラチンがすべて溶け落ちるまでの時間を測定した。その結果、過酸化水素の濃度が高いほど、加温開始から1滴目が溶け落ちるまでの時間がかかることがわかった。また、1滴目が溶け落ちてからすべてのゼ

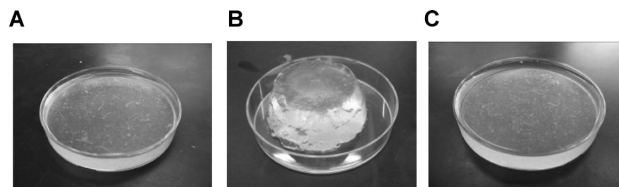


図1 ■ A, パイナップル果汁を添加したゼラチン。 B, パイナップル果汁に過酸化水素水を添加し凝固したゼラチン。 C, システインの添加により過酸化水素処理した果汁(B)を使ってもゼラチンが凝固しなくなった。

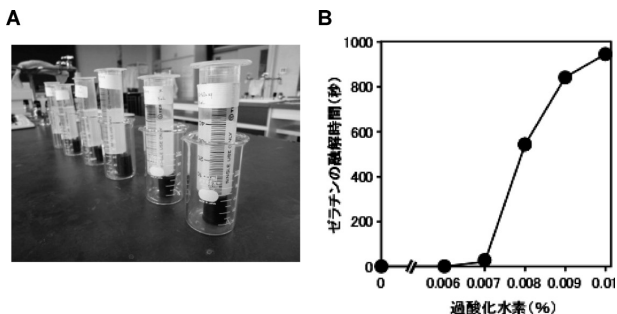


図2 ■ 過酸化水素によるタンパク質分解酵素の阻害活性の定量
A, 凝固したゼラチンをインキュベーターで加温し、融解時間を測定する様子。B, 加熱開始から1滴目のゼラチンが融け落ちるまでの時間を指標としたタンパク質分解酵素の阻害活性。

ラチンが落ちきるまでの時間は、過酸化水素の濃度に関係なくほぼ一定であった。以上のことから、加温開始から1滴目が溶け落ちるまでの時間を用いて、タンパク質分解酵素の不活性化能力を定量できることが明らかとなった(図2)。

② 還元剤によるタンパク質分解酵素の再活性化：過酸化水素水とパイナップル果汁を含む凝固したゼラチンを加温して融解させ、これに還元剤としてシュウ酸を加え再冷却したところ、ゼラチンが凝固したことから、シュウ酸は過酸化水素により失活したタンパク質分解酵素を再活性化できないことがわかった。そこで、シュウ酸の代わりにシステインを用いて同様の実験を行ったところ、システインの添加によりゼラチンは凝固しなくなった(図1)。また、システインとゼラチンのみを混合した場合には凝固が見られたことから、システイン自体はゼラチンの凝固を阻害しないことが判明した。また、パイナップル果汁に過酸化水素水を加え30分攪拌した後、さらにシステインを加えて30分間攪拌したのも、ゼラチン溶液を凝固させることはなかった。以上の結果から、システインが過酸化水素により失活されたタンパク質分解酵素を再活性化すると考えられた。

システインのチオール基は、ジスルフィドと交換反応を行うことが知られている。不活性化されたプロメラインにシステインを作用させることによって、プロメライン中のジスルフィドがチオール基へと還元され再活性化されるのではないかと予想し、さらなる研究を進めている。



本研究の意義と展望

酵素の「活性化」と「不活性化」は生化学の重要課題の一つであり、本研究は、これを解明しようという意欲的なものである。ポスター発表では、研究を進めるうえでのさまざまな工夫や部員同士での活発な議論の跡を伺うことができた。活性化・不活性化のモデルとしての身近なチオールプロテアーゼ(プロメライン)の選定、酸化剤と還元剤の選定、粘性液体の粘度測定をヒントにした注射器を用いたゼラチンの凝固度合の定量法など、自由で柔軟な発想はサイエンスにとって重要であり素晴らしいものといえる。プロメラインは、食品工業用の酵素などとして実用化もされ、近年ではさまざまな生理活性を示すことが注目されている。今後、本研究によって得られる知見がこれらの応用にも役立つことを期待する。

チオールプロテアーゼの酸化還元による不活性化と再活性化については古くから研究が進められているが、実は、現在でも不明な点が多く残されており、古くて新しい学問分野といえよう。本研究で示唆されたように、本当にチオール基とジスルフィドの交換により酵素活性が制御されるのか? そもそもプロメラインによってゼラチンが分解されているのか? などについては、現段階で結論するのはいささか早急だとしても、では、なぜこのような現象が起こるのか? に対しては最先端の科学ですら明確な答えを持ち合わせていないのではないだろうか。ユニークな発見と柔軟な発想で研究を展開するという農芸化学の大切さを高校生たちに教えられたジュニア農芸化学会であった。

(文責「化学と生物」編集委員会)