

## 9356 カツオ塩辛に見出された耐塩性酵素を利用した機能性食品素材(血栓症予防剤)の開発

助成研究者:須見 洋行(岡山県立短期大学 食物科)

共同研究者:中島 伸佳(岡山県立短期大学)

美原 恒(宮崎医科大学)

1980年以降の「経口血栓溶解療法」の研究過程で、我々は日本の伝統的醗酵食品の一つでもあるカツオの塩辛(酒盗)中に極めて耐塩性で強力な線溶酵素を発見した。その分離精製方法、及び純化された酵素の性質について報告する。

各種のカツオ塩辛(酒盗)が持つ線溶活性を直接シャーレ中の人工血栓(フィブリン平板)の上のせて測定してみた結果、いずれも37℃、2時間のインキュベーションで精製プラスミンを標準として45CU/gという強力な溶解活性を示した。Katsuwokinase(KK)と命名されたこの酵素の分子量は約3.5万、等電点は約5.0であり、そのN末端アミノ酸付近の一次構造(16残基)はI-V-G-G-Y-E...に始まる牛やラット由来のトリプシン(セリンプロテアーゼ)と約78%の相同性を示すことが判った。KKは種々の合成アミド基質、特にpyro-Glu-Gly-Arg-pNAに対して働いたが、最大の特徴はその強力な血栓溶解能と耐塩性であり、純化された酵素(NPGBで52% active)の活性分子当りのフィブリン分解能はプラスミンの約2.6倍もあり、またその活性は10% NaClの共存下でも影響を受けることはなかった。また、KKのフィブリン分解能は一般のセリンプロテアーゼインヒビターであるDFP、SBTI、BPTIあるいはアプロチニンによって阻害されるものの、プラスミンインヒビターであるε-ACAとかt-AMCHAでは影響を受けないことが判った。

カツオの塩辛は1000年以上も我が国で日常の食卓にのぼり、食されてきただけにその経口化での安全性は保障されている。その高い耐塩性を利用した新しい加工食品の開発も今後の課題であろうが、今回我々の分離した新しい酵素を老人性痴呆症などの各種血栓性疾患の予防に働く新しい経口血栓溶解剤あるいは種々の成人病予防目的の機能性食品(特定保健用食品)素材として開発応用することが今後の夢である。



## 9356 カツオ塩辛に見出された耐塩性酵素を利用した機能性食品素材(血栓症予防剤)の開発

助成研究者:須見 洋行(岡山県立短期大学 食物科)

共同研究者:中島 伸佳(岡山県立短期大学)

美原 恒(宮崎医科大学)

## 1. 研究目的

1980年以降、我々は「経口血栓溶解療法」と名付けた線溶酵素を口から飲ませることにより、血中の線溶亢進を引き起こし、ひいては血栓溶解に働く血栓症の治療、あるいは予防薬の研究を行ってきた<sup>1-7)</sup>。また、その血中線溶発現の機序としてウロキナーゼ、ナットウキナーゼなどの線溶酵素の腸管での吸収による血中線溶亢進に加えて、吸収された酵素が血管内皮細胞からのt-PA放出など二次的なプラスミノゲンアクチベーター産生の関与を明らかにした<sup>8-13)</sup>。

ナマコ、貝類及び藻類など、海洋生物中の線溶関連物質についてはこれまで報告してきたが<sup>14)</sup>、今回、我々は日本の伝統的醗酵食品の一つでもあるカツオの塩辛(酒盗)中に極めて耐塩性で強力な線溶酵素を発見したので、その分離精製方法、及び純化された酵素の物理化学的性質について報告する。

## 2. 研究方法

pyro-Glu-Gly-Arg-pNA (S-2444)、H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238)などの各種クロモザイム基質(合成アミド基質)は、Kabi社製のものを用いた。フィブリノーゲンはSigma製、牛トロンピンは持田製薬製を用いた。

酵素活性は、0.25mMクロモザイム基質、10mM potassium phosphate buffer (pH 7.2 あるいは 7.4)、及び適量の酵素液を含む反応液1ml中で、37℃において、生成するp-ニトロアニリンの405nmにおける吸収の増大に基づき、分光光学的に算出した<sup>15)</sup>。

酵素活性1unitは、pH 7.2で1分間あたりに1μmolの基質を生成物に変換しうる酵素量とした。比活性は、1mgの酵素蛋白質あたりのunit数で示した。蛋白量、フィブリン及びカゼインに対する分解活性測定など、特に明記していない場合の各種の実験条件は、全て前報<sup>1-14)</sup>のそれに従った。精製酵素のp-nitrophenylguanidinobenzoate (NPGb)による活性タイトレーションはChase & Elliottの方法<sup>16)</sup>で行なった。

酵素蛋白質の純度は、Davis電気泳動法<sup>17)</sup>により検定し、分子量は、標準蛋白質を用いてSDS電気泳動<sup>18)</sup>及びHPLCによるゲル濾過法<sup>19)</sup>により測定した。等電点の測定は既報<sup>20)</sup>に従った。

実験材料は、(株)福辰、(株)かつお船、(株)斎藤角一、(株)老岐島より供与されたカツオの塩辛 (Fig-1) (約3ヶ月熟成、塩分15~22%含む) を使用。また、タコ、イカ、アミの塩辛は市販品(岡山市内デパート)を購入。KKの抽出には塩辛3kgを4倍量の水で抽出し、脱塩した(最終塩濃度は、0.73% NaCl)。酵素の精製は0~4℃の条件下において、10mM potassium phosphate buffer (pH 7.2)中で、S-2238クロモザイム基質を用いて、その分解活性を指標に各種のクロマトグラフィーにより実施した。

精製酵素蛋白のN末端アミノ酸配列は、自動エドマン分解法によりプロテインシーケンサー (ABS) を用いて実施した<sup>21)</sup>。

### 3. 研究結果

各種のカツオ塩辛(酒盗)が持つ線溶活性を直接フィブリン平板の上のせて測定してみた。Fig-2がその結果であるが、いずれも37℃、2時間のインキュベーションで精製プラスミンを標準として45CU/gという強力な溶解活性を示した。我々はこの強力な線溶酵素をカツオキナーゼ (Katsuwokinase;KK) と呼ぶことにした。

このような強い活性はイカ、タコあるいはアミの塩辛では認められなかった。Fig-3はその比較実験であるが、アミの塩辛で37℃、18時間インキュベーションして初めて弱い溶解が見られただけである。

前述したカツオ塩辛(福辰商店、3kg)由来の粗酵素液(12 l)を遠心分離し不溶物をのぞいた後、10mM potassium phosphate buffer (pH 7.2)で平衡化したDEAE-Cellulose (10×30cm) アニオン交換クロマトグラフィーよりbuffer中のKCl濃度を変化させ、0.3M KClを含む同 bufferで酵素活性画分をアミコンPM-10限外濾過膜で濃縮後、DEAE-Toyopeal 650M (3×20cm)により再クロマトを行い、buffer中のKCl濃度を0~0.5Mに変化させ酵素蛋白を溶出させた。次に得られた酵素画分をButyl-Toyopearl疎水クロマトグラフィー (3×20cm)により、buffer中の硫酸濃度を2M~0Mに変化させ酵素活性を溶出させた。さらに、単一画分として得られた酵素蛋白をCellulofine GCL-2000 (2×100cm)によるゲル濾過により精製した後、得られた酵素画分をMono Q (0.5×5cm)カラムを用い、高速液体クロマトグラフィーにより、Davis電気泳動法的に均一な状態に精製した (Table-1)。カツオ抽出液を Zymographyにかけた場合の結果がFig-4である。分子量約3.6万の所に主活性のあることが判る。同様の結果は精製酵素をSDS-電気泳動法にかけて、標準蛋白質との移動度の比較より分子量約 35,000であった。なお、SDS処理液中の2-メルカプトエタノールの有無においては、電気泳動パターンに変化はみられなかった。また、本酵素蛋白の分子量は、ゲル濾過法によっても、約35,000~38,000と測定された。従って、本酵素は、単一ポリペプチド鎖からなるモノマー蛋白であると考えられた。

等電点電気泳動法でKKはpI 5.0と算出され (Fig-5)、本酵素は比較的酸性の蛋白であると考えられた。

精製酵素の自動エドマン法によるN末端アミノ酸付近の一次構造を解析した結果をFig-6に示すが、本酵素の16残基はI-V-G-G…に始まる牛やラット由来のトリプシン（セリンプロテアーゼ）<sup>22)</sup>と約78%の相同性を示すことが判った。

精製酵素のNPGBタイトレーションの結果は52.0% activeであった。このKKのフィブリン溶解活性をプラスミン（56.2% active）のそれと比較してみたところ、KKの方が活性分子当たりでプラスミンより2.6倍強いことが判った。

また、溶液状態でKKはかなり安定な酵素であり、特に粗抽出の状態ではpH 1~10処理（37℃、30分）でも失活することはなかった。さらに、そのフィブリン溶解活性は、0~10% NaClの共存下でほとんど差はみられなかった。

Table-2は各種合成アミドに対するKKの基質特異性を示したものである。特にKKがウロキナーゼ基質であるS-2444、あるいはトロンビン基質であるS-2238に対して強く作用することが判る。また、KKのフィブリン溶解に対する各種阻害剤の影響を調べ、1 mM DFP、1 mg/ml SBTI、BPTIあるいはアプロチニンで阻害されるが、一般のプラスミン阻害剤であるイプシロンアミノカプロン酸あるいはトラネキサム酸（1 mg/ml）では影響を受けないことが判った。

#### 4. 考 察

これまで、我が国のユニークな醗酵食品の一つである塩辛中のプロテアーゼに関する研究は極めて少なかった<sup>23, 24)</sup>。特に、線溶酵素に関するものは皆無と思われるが、我々はカツオの塩辛（酒盗）中に極めて耐塩性で、且つ強力な線溶酵素を見出した。

カツオキナーゼと名付けられたこの酵素のNPGBによるタイトレーションでの分子当たりの活性は、ヒトが持つ現在最も強い線溶酵素とされるプラスミン分子の約3倍も強いことが判った。

カツオの塩辛は1000年以上も我が国で日常の食卓にのぼり、食されてきただけにその経口化での安全性は保障されている。その高い耐塩性を利用した新しい加工食品の開発も今後の課題であろうが、老人性痴呆症などの血栓性の疾患が社会問題ともなっている今日、分離精製した酵素をそうした疾患の予防に働く新しい経口血栓溶解剤あるいは種々の成人病予防目的の機能性食品（特定保健用食品）素材として開発応用することが我々の最も大きな夢である。

#### 5. 今後の課題

KKの全一次構造の決定と、血栓溶解剤への応用、及び極めて高い酵素活性を利用した新しい加工食品の開発。

文献

- 1) H. Sumi, N. Toki, K. Sasaki, and K. C. Robbins, *Thrombos. Res.* 20: 711-714 (1980)
- 2) H. Sumi, M. Maruyama, T. Yoneta, N. Toki, and H. Mihara, *Acta Haematol.* 70: 289-295 (1983)
- 3) H. Sumi, M. Seiki, N. Morimoto, H. Tsushima, M. Maruyama, and H. Mihara, *Enzyme* 33 : 121-127 (1985)
- 4) K. C. Robbins, and L. Summaria, In "Methods in Enzymology", eds. by G. E. Perlman and L. Lorand, Vol. 19, pp. 184-199. Academic Press, New York (1981)
- 5) K. Sasaki, Moriyama, H. Sumi, N. Toki, and K. C. Robbins, In "Progress in Fibrinolysis", eds. by J. F. Davidson, F. Bachmann, C. A. Bouvier, and E. K. O. Kruithof, Vol. 1, pp. 245-248, Churchill Livingstone, London (1983)
- 6) K. Sasaki, M. Moriyama, Y. Tanaka, H. Sumi, N. Toki, and K. C. Robbins, *Blood*, 66: 69-75 (1985)
- 7) N. Toki, H. Sumi, K. Sasaki, T. Boreisha, and K. C. Robbins, *J. Clin. Invest.* 75: 1212-1220 (1985)
- 8) H. Sumi, In "Functional Food Materials", pp. 88-96, Industry and Technology Society, Tokyo (1989)
- 9) H. Sumi, In "Manual of Functional Food Materials", section 6, pp. 287-289, CMC Tokyo (1990)
- 10) H. Sumi, H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, and H. Muraki, *Experientia*, 43: 1110-1111 (1987)
- 11) H. Sumi, H. Hamada, H. Mihara, K. Nakanishi, and H. Muraki, *Thrombosis & Haemostasis* 62: 549 (1989)
- 12) H. Sumi, H. Hamada, K. Nakanishi, and H. Hiratani, *Acta Haematol.* 84: 139-143 (1990)
- 13) H. Sumi, N. Nakajima, and H. Mihara, *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 163-167 (1992)
- 14) H. Sumi, N. Taya, N. Nakajima, and H. Hiratani, *Fibrinolysis* 6: 86 (1992)
- 15) G. Claeson, P. Friberger, M. Kmos, and E. Eriksson, *Haemostasis*, 7: 109 (1941)
- 16) T. Chase, and S. Elliott, *Biochemistry* 8: 2212-2224 (1969)
- 17) B. J. Davis, In "Ana. N. Y. Acid. Sci.", 121, p. 404 (1964)
- 18) U. K. Laemmli, In "Nature", 227, p. 680 (1970)
- 19) H. Wada, K. Makino, and T. Takeuchi, In "J. Chromatogr.", 320, p. 369 (1985)
- 20) C. W. Wrigley, In "Methods in Enzymology", Vol. 22, p. 559, ed. by W. B. Jakoby, Academic Press, New York (1971)
- 21) P. Edman, and G. Begg, *Eur. J. Biochem.* 1: 80 (1967)

- 22) W.B.Goad, and M.Kanchisa, *Nucleic Acid Res.* 10: 247 (1982)
- 23) K.Mori, Maturation of food (in Japanese)., Shiokararais VII, p.631-653,  
Kourin, Tokyo, (1984)
- 24) Jpn. Indust. Exam. Commit., *In "Food Biotechnology"*, p.275-276, Gishudo, Tokyo  
(1988)



Fig-1 "Shiokaras" samples indicating fibrinolytic activity.

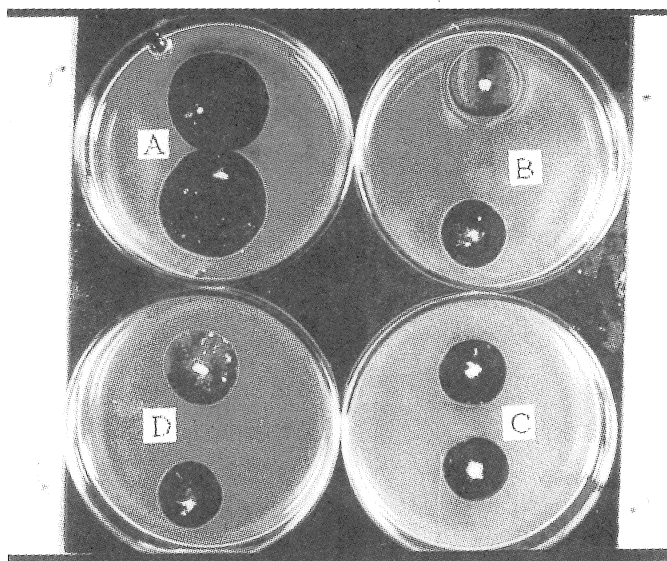


Fig-2 Fibrinolytic activity of katsuokinase.

Katsuokinase extracts (A, Katsuwobune; B, Saitokakuich; C, Fukushin; and D, Ikinoshima, respectively) were applied directly to fibrin plates. Katsuokinase was extracted from 100 g of each skipjack Shiokara with 150 ml of distilled water for 15 min with stirring at 4°C. The material was filtered through gauze and then centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. Sample volume was 30  $\mu$ l, and the incubation time was 2 hr at 37°C.



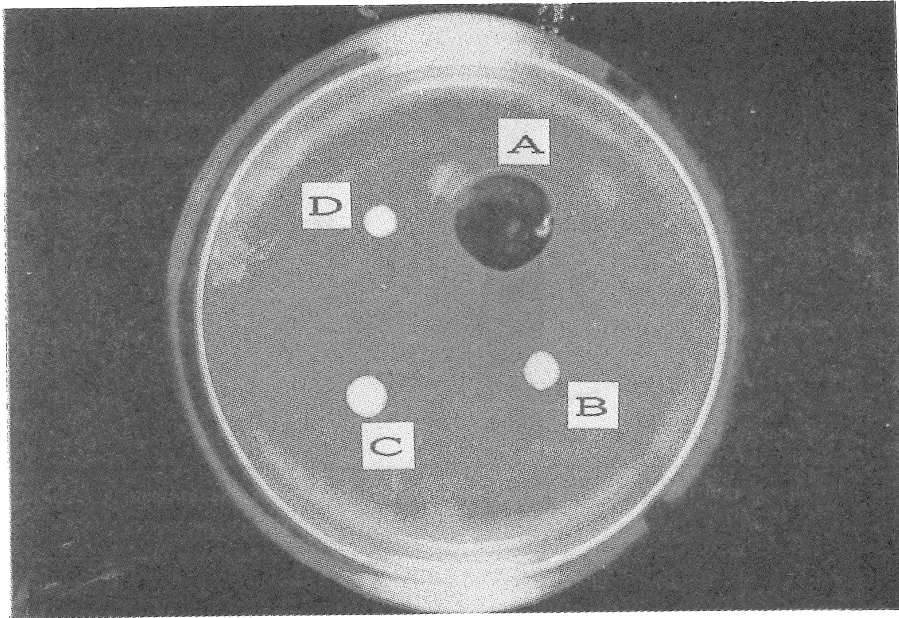


Fig-3 Comparative fibrinolytic activity of other "Shiokara" samples.

Extractions from opossum shrimp (A), octopus (B), squid (C) and shrimp (D) were carried out as described in Fig. 2. Sample volume was 30  $\mu$ l, and the incubation time was 18 hr at 37°C.

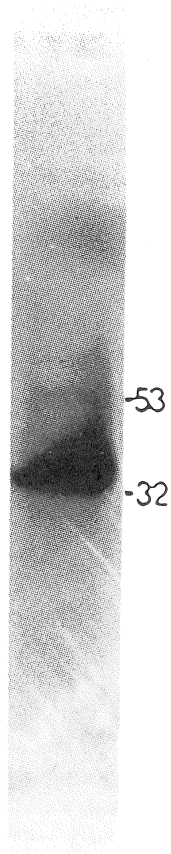


Fig-4 Zymographic pattern of katsuwoxinase.

The katsuwoxinase extract (ca. 20  $\mu$ l) was applied. Numbers on the right side indicate mol. wt. in thousands using u-PA as the standard.

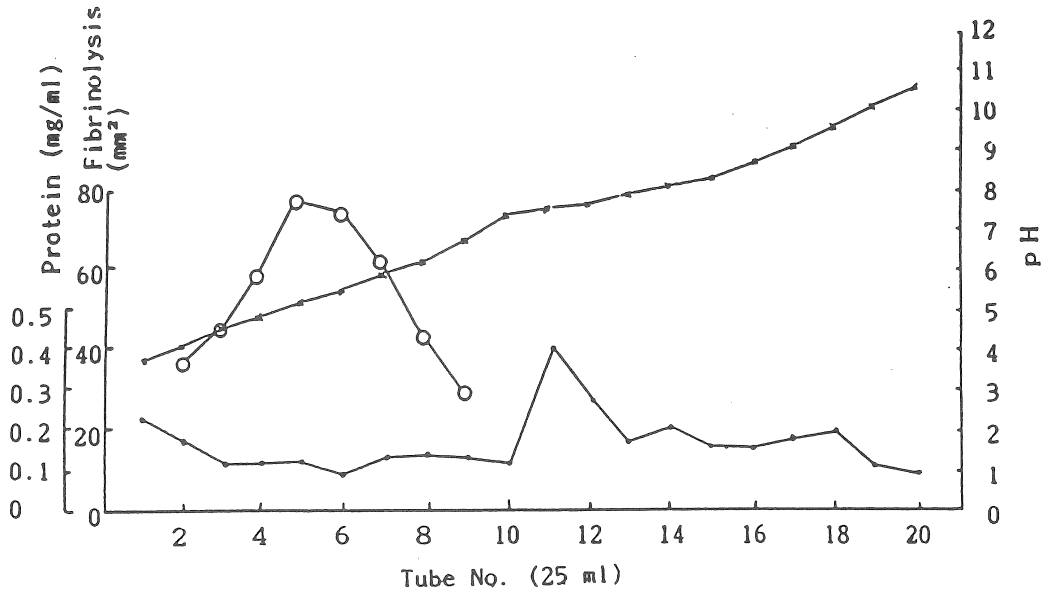


Fig-5 Isoelectric focussing of katsuwo kinase.

One ml of katsuwo kinase extract dialyzed against distilled water was applied. After electrophoresis was run for 22 hr at 900 V, fractions of 2.5 ml each were collected. The major activity peak corresponded to an isoelectric point of about 4.7.

•—• Absorbance, X—X pH, O—O Activity, respectively.

Table-1 Purification of katsuwoxinase

Steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
1. Crude extract	42516	34650	0.8	100
2. DEAE-Cellulose	1908	16275	8.5	47.0
3. DEAE-Toyopearl	428	4215	9.8	12.2
4. Butyl-Toyopearl	20	1179	60.5	3.4
5. Cellulofine GCL-2000	6	576	93.5	1.7
6. Mono Q	0.5	57	113.4	0.2

Table-2 Comparative amidolytic activity of Katsuwoxinase with several synthetic substrates

Substrate	Substrate hydrolyzed (nmoles/min/ml)
pyro-Glu-Gly-Arg-pNA (S-2444)	117.5
H-D-Ala-Pip-Arg-pNA (S-2238)	80.7
H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S-2288)	69.5
H-D-Val-Leu-Arg-pNA (S-2266)	5.6
H-D-Pro-Phe-Arg-pNA (S-2302)	4.0
H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251)	3.5
Bz-L-Arg-pNA	0.4
Bz-L-Tyr-pNA	0
pyro-Glu-Pro-Val-pNA (S-2484)	0

The reaction mixture (1 ml) contained 20  $\mu$ l katsuwoxinase extract (213  $\mu$ g protein),  $2.5 \times 10^{-4}$  M substrate and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. After incubation for 10 min at 37°C, the p-nitroaniline was determined from the absorption at 405 nm. The results are expressed as nmoles of substrate hydrolyzed per min per ml of katsuwoxinase extract. Each value is the mean of 3 determinations.

A salt-resistant thrombolytic enzyme found in salted fish guts "Shiokara"

HIROYUKI Sumi, NOBUYOSHI Nakajima and HISASHI Mihara\*

Department of Food Science, Okayama Prefectural Junior College,

\*Department of Physiology, Miyazaki Medical College

#### Summary

Katsuwokinase (KK) is a unique fibrinolytic enzyme recently been discovered in skipjack "Shiokara", a Japanese traditional salted fermented food. A crude enzyme extracted from skipjack Shiokara exhibited very high fibrinolytic activity of over 45 CU/g (fibrin plate method), based on plasmin.

KK not only hydrolyzed fibrin but also several synthetic amido substrates, particularly for pyro-Glu-Gly-Arg-pNA. The fibrinolytic activity of KK was not affected by the presence of over 10 % NaCl, remaining stable over the pH range of from 1 to 10 at 37°C for 30 min. It was inhibited by DFP, SBTI, BPTI or aprotinin, but not by  $\epsilon$ -ACA and  $\epsilon$ -AMCHA.

The crude enzyme contains at least 4 kinds of KK and the major form purified had pI of about 5.0 and mol. wt. of 35,000. The N-terminal amino acid sequence of 16 residues, I-V-G-G-Y-E-Q-Z-A-H-S-Q-P-H-Q-V-, had over 78 % homology with that of trypsin. The fibrinolytic activity of the purified enzyme was about 2.6 times greater than that of plasmin by molar ratio, demonstrating its identity as a new very potent fibrinolytic enzyme.