

9856 濃厚塩類溶液中での未利用タンパク質資源の酵素分解とペプチド合成

助成研究者：井上 國世 (京都大学大学院 農学研究科)

我々は、微生物由来の好熱性プロテアーゼであるサーモライシンが、飽和濃度に達する高濃度 (1-5 M) の塩類の存在下に数十倍も活性化すること、また、安定性も増大することを報告してきた。サーモライシンは好塩性酵素と考えられ、現在、タンパク質工学的手法を用いて、この好塩性を分子レベルで解明している。ダイズからダイズ油を搾取したあとのダイズ油粕や醤油の醸造で副生する醤油粕に含まれるタンパク質はペプチドやアミノ酸の原料としてもっと利用されるべきものであろう。本研究ではこれらのタンパク質を対象として、サーモライシンによる可溶化に対する塩の添加効果を検討した。また、サーモライシンはペプチドの加水分解の逆反応を利用してペプチド合成、とくにペプチド性の人工甘味料であるアスパルテームの合成に利用されている。高濃度の塩の存在がペプチド合成に有用であることを検討した。

低分子の合成基質に対するサーモライシンの活性は、塩の存在下に大きく上昇するが、本研究で検討したタンパク質基質に対しては、塩の添加はほとんど活性増大をもたらさなかった。これは塩の存在下には基質の高次構造がサーモライシンによる作用を受けにくい状態になるためと考えられた。サーモライシンを用いるペプチド合成反応は塩類の添加により加速された。加速の程度は加水分解反応における程度と同程度であったが、合成されたペプチドの収率は低下した。塩非存在下ではアミノ酸系基質の全量の3%が脱水縮合しペプチドを生成するが、3Mの塩類の存在下では1-2%に低下した。このことは、塩の添加により酵素反応速度は増大するが、反応の平衡はペプチド結合の合成側よりも分解側にシフトすることを意味する。サーモライシンの溶解度は1 mg/mlと、可溶性タンパク質の中では極めて低いが、1-2 Mの塩の添加により10-20倍以上に増大することが認められた。このとき本酵素の分子量に変化はなく、溶解度の変化が酵素の会合や解離によるものではないと判断した。塩の添加により、高濃度の酵素を用いることが可能となり、かつ、高活性が得られることから、サーモライシンの工業的応用において反応時間の短縮、運転コストの低減が達成されることが示唆された。

9856 濃厚塩類溶液中での未利用タンパク質資源の酵素分解とペプチド合成

助成研究者：井上 國世 (京都大学大学院 農学研究科)

1. 研究目的

我々は、過去数年間にわたり、本財団の支援 (No. 9330, No. 9652) を得て、微生物由来の好熱性プロテアーゼであるサーモライシンが、飽和濃度に達する高濃度 (1-5 M) の塩類の存在下に数十倍も活性化すること、また、安定性も増大することを報告した [1-3]。このような高濃度の塩類による酵素の活性化の例はこれまでに報告がなく、我々は、サーモライシンを「高度好塩性酵素」と位置づけ、現在、タンパク質工学的手法を用いて、この好塩性を分子レベルで解明しようとしている。このことは、酵素の活性発現の分子機構を理解するうえで有用な知見を提供することと考えられる。一方、サーモライシンの好塩性は、本酵素を利用する上で利点と考えられる。本研究の目的は、サーモライシンの好塩性を利用して、未利用タンパク質資源の有効利用とペプチド合成への道を探索することであり、また、食品工業の廃棄物の有効利用により環境問題に一石を投じようとするものである。

ダイズからダイズ油を搾取したあとのダイズ油粕は良好なタンパク質資源であるにもかかわらず、家畜飼料として利用されるにとどまっている。また、醤油の醸造で副生する醤油粕は高濃度の塩を含有するため、廃棄や燃焼が極めて困難であり、環境への負荷の大きい産業廃棄物のひとつである。本来、ダイズ油粕や醤油粕に含まれる未利用タンパク質はペプチドやアミノ酸の原料としてもっと利用されるべきものであろう。本研究ではこれらのタンパク質を対象として、サーモライシンによる可溶化に対する塩の添加効果を検討した。また、サーモライシンはペプチドの加水分解の逆反応を利用してペプチド合成、とくにペプチド性の人工甘味料であるアスパルテムの合成に利用されている。高濃度の塩の存在がペプチド合成に有用であることを検討した。

2. 研究方法

2.1. 研究材料

3回結晶サーモライシン凍結乾燥標品は大和化成 (株) より購入した。1mg 酵素タンパク質のカゼイン分解活性は 8360 単位である。ダイズタンパク質

としてはダイズ油を搾取、ヘキサン抽出ののち、酸沈殿と中和を繰り返して得られるダイズタンパク質分離物 (soybean protein isolates; SPI)を用いた。SPI (フジプロR) は不二製油 (株) より恵与された。醤油粕 (モロミ) は、近隣の醤油製造所より入手した。

2.2. ダイズ粕のサーモライシン分解

SPI の高濃度塩類存在下における加水分解は次の3つの系で実施した。酵素反応溶液中における SPI 濃度は 5mg/ml であり、pH 7 となるように調整した。すべての加水分解反応は 37°Cで行った。(1) 4 M NaCl を添加した SPI にサーモライシンを加えて加水分解する。(2) 4 M HCl で SPI を処理した後、4 M NaOH で中和し、サーモライシンを加えて加水分解する。(3) 4 M NaOH で SPI を処理した後、4 M HCl で中和し、サーモライシンを加えて加水分解する。(2) と (3) では、SPI を酸あるいはアルカリで処理し、構造を破壊した後、中和し、酵素を作用させた。最終サーモライシン濃度は、8.5 µg/ml とした。加水分解は、タンパク質溶液を反応停止液で処理後、可溶性画分に移行したアミノ酸および低分子ペプチドをロウリー・フォーリン法で定量し追跡した。ウシ血清アルブミン (BSA) を標準タンパク質とした。反応停止液は 0.11 M トリクロロ酢酸、0.22 M 酢酸ナトリウム、0.33 M 酢酸の混合液である。

2.3. 醤油粕のサーモライシン分解

醤油粕を乳鉢にて十分に破碎し、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7) に懸濁し、ろ過により不溶物を除去した。ろ液を 80%飽和硫酸で塩析し、遠心分離で沈殿を集め、上の緩衝液に溶解、透析後、酵素分解用基質溶液とした。反応液中の基質溶液濃度を 5 mg/ml (BSA に換算) に調整し、4 M NaCl を加え、サーモライシンによる加水分解を 37°Cで実施した。加水分解は、タンパク質溶液を TCA で処理後、可溶性画分に移行したアミノ酸および低分子ペプチドをロウリー・フォーリン法で定量し追跡した。

2.4. ペプチド合成に対する塩の効果

カルボベンジルオキシ基 (Z-) あるいはフリルアクリルオイル基 (FA-) でアミノ基を保護した各種アミノ酸 (X=アスパラギン酸、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、フェニルアラニン) とカルボキシル末端をメチルエステルで保護したアミノ酸 (Y=フェニルアラニン) あるいは酸アミド化したアミノ酸 (Y=フェニルアラニン、アラニン、ロイシン) をサーモライシンを触媒として脱水縮合させた。このとき、塩類 (NaCl, KCl, NaBr, KBr, LiCl, LiBr など) の添加効果を検討した。また、ペプチド合成活性の塩濃度依存性を調べた。合

成されたペプチドはTSKgel LS-170カラムを用いるHPLCで分離した [1, 4]。なお、Z- (または FA-) アスパルチル-フェニルアラニンメチルエステルは合成甘味剤アスパルテムの前駆体である。

2.5. サーマライシンの溶解度に対する塩類の効果

酵素化学の原理であるミカエリス・メンテン式に従うと、酵素反応は酵素濃度に比例して増大する。酵素を工業的に利用する場合、酵素濃度を高めることにより、反応を短時間に終了させることができる。このことにより、反応装置の運転時間の短縮、人件費の低減、生成物や原料の分解の抑制などを達成できる。サーモライシンの工業用酵素としての欠点のひとつは、その低い溶解度にある。本酵素の溶解度は通常の緩衝液 (たとえば 40 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 7.5) 中で 1 mg/ml であり、可溶性タンパク質としては異様に低い。サーモライシンを、0-37°Cにおいて、各種の塩類を含有する 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に大過剰溶解し、溶解しなかった酵素を、ミリポアフィルター HA タイプ (ポア径: 0.45 μm) でろ過し、ろ液中のサーモライシン濃度を定量した [5]。サーモライシンの濃度は 277 nm での吸光係数 A (1.0 mg/ml)=1.83 を用いて算出した [1]。

3. 研究結果

3.1. サーマライシンによるダイズタンパク質の加水分解における塩の効果

最初にダイズタンパク質を HCl で処理し、ついで NaOH で中和したサンプルでは、濃褐色に変化した。この色調が分析に及ぼす効果が無視できず、褐色色素形成の機構について検討する必要に迫られた。一方、最初に NaOH で処理したのち、HCl で処理した場合は、褐色色素の形成は認められなかった。このサンプル (結果的には 4 M NaCl 含有) に、サーモライシンを添加して加水分解を行ったが、加水分解はほとんど進行しなかった。アルカリ処理について酸処理を実施せず、直接ダイズタンパク質に 4 M NaCl を添加して、サーモライシンによる加水分解を行った場合も、同様に加水分解の進行はほとんど認められなかった。塩非存在下の加水分解に比べて、4 M NaCl 存在下の加水分解は、10%程度であった。このことは、高濃度の塩類の存在下にダイズタンパク質の存在状態が変化したことを意味している。低分子基質では基質にかかわらず塩の添加が酵素活性を上昇させたことに比べて、際だった差異を示した。

3.2. サーマライシンによる醤油粕タンパク質の加水分解における塩の効果

本研究で検討した範囲では、サーモライシンを用いて醤油粕タンパク質を加

水分解するのに、塩の添加は明瞭な効果をもたらさなかった。むしろ塩が存在しない方が有効であり、上記のダイズタンパク質の分解と同様に、塩の存在下においてタンパク質の存在状態の変化が起こり、サーモライシンによる分解を受けにくくなると考えられた。今後の対応としては、ひとまず、タンパク質基質を低分子化するような酵素処理が必要であり、ある程度、低分子化した段階で、塩の存在下にサーモライシンで加水分解を進ませるのがよいと考えられた。

3.3. サーモライシンによる Z-Asp-Phe-OMe (ZAPM) 合成反応に対する NaCl の添加効果

Z-Asp (ZA) と Phe-OMe (PM) をそれぞれ 36.4 mM ずつ混合し、0.8 μ M サーモライシンを加え、pH 6.5, 40°C で反応させた時の、ZAPM 生成の経時変化は図 1 に示すとおりである。3 M NaCl 存在下においては、塩非存在下に比べて、反応は迅速に進行した。反応開始、18 時間後に観測された ZAPM 生成量は、塩非存在下では 0.47 mg/ml (1.1 mM) であるのに対し、3 M NaCl 存在下では 0.31 mg/ml (0.71 mM) であった。すなわち、基質の ZAPM への変換率は、NaCl 非存在下では 3.0% であるのに対し、3 M NaCl 存在下では 2.0% であった。このことは、次式で表される ZAPM 合成反応の平衡が、NaCl の添加により左側 (原系) にシフトすることを意味している。



この反応の平衡定数 $K = [\text{ZAPM}] / ([\text{ZA}][\text{PM}])$ は、塩非存在下では 0.88 M^{-1} のに対し、3 M NaCl 存在下では 0.57 M^{-1} と求められた。式 1 で表される二分子反応において ZA と PM の初濃度が等しく、これを a とおくと、反応の終点の 50% に到達するのに要する時間 ($t_{1/2}$) の逆数は ZAPM 合成の反応速度の指標として利用することができる。すなわち、二分子反応の速度定数を k とすると、 $t_{1/2}$ の逆数は基質初濃度 a と速度定数 k の積で表される。 $t_{1/2}$ は 0 M NaCl の時、3.8 時間、一方、3 M NaCl 存在下では 0.9 時間であり、二分子反応の速度定数はそれぞれ、 $7.2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$, $31 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ と求められた。3 M NaCl は ZA と PM からの ZAPM 合成反応を 4.3 倍加速することが明らかになった。

3.4. サーモライシンによる ZAPM 合成反応に対する各種塩類の添加効果 (反応収率に対する効果)

前節で述べたのと同様の方法で、ZAPM 合成に対する 3 M の各種塩類を添加したときの効果を検討した。3 M NaBr, KCl, KBr, LiCl, および LiBr の添加により、18 時間の酵素反応により達成された基質の ZAPM への変換率 (反応収率) は順にそれぞれ、1.9, 1.9, 2.2, 1.2, および 1.3% であった。ZAPM 合成反応の平衡定数 K は順にそれぞれ、0.54, 0.54, 0.63, 0.33, および 0.37

M^{-1} と求められた。KBrの変換率がNaClの変換率(2.0%)よりも大きいことが注目されるが、ナトリウム塩とカリウム塩では変換率は1.9-2.2%であった。一方、リチウム塩では変換率が有為で低く、1.2-1.3%であった。ここから明らかになったことは以下の通りである。ClイオンとBrイオンでは変換率に差がない。NaイオンとKイオンとは変換率がほぼ同程度であるが、Liイオンでは変換率が低い。すなわち、塩の添加により式1の平衡は原系の側にシフトするが、その程度は、NaイオンとKイオンの存在下では同程度であるが、Liイオンの存在下ではさらに大きい。以上の結果を表1にまとめた。

3.5. サーマライシンによる ZAPM 合成反応に対する各種塩類の添加効果 (反応速度に対する効果)

前節で述べたのと同様に、ZAPM合成において3 M NaBr, KCl, KBr, LiCl, およびLiBrを添加したときの、ZAPMの生成速度はそれぞれ21, 18, 18, 14, および14 $M^{-1}h^{-1}$ であった。すなわち、これらの塩が存在する場合、反応速度は、塩が存在しない場合(7.2 $M^{-1}h^{-1}$)に比べて、それぞれ、2.9, 2.5, 2.5, 1.9, および1.9倍加速されることが示された。3 M NaClの添加によりZAPM合成速度は4.3倍加速したが、ここで評価した塩類の効果はNaClには及ばなかった。

反応加速効果は、カチオンについてはNaイオン>Kイオン>Liイオンの順で、また、アニオンについてはClイオン>Brイオンの順であり、結果的にNaClが最大の加速効果をもたらした。ここで観測されたサーモライシンによるZAPM合成活性に対する各種塩類の効果は、すでに我々が報告したサーモライシンによるZAPMやFA-Gly-Leu-amide (FAGLA)の加水分解活性に対する効果にほぼ対応している。ペプチド基質に対する加水分解反応の加速効果は、NaCl>NaBr>KCl>KBr>LiCl>LiBrであり、NaClによる活性化は完全に指数関数的である。x M NaCl存在下の反応速度はNaCl非存在下の反応速度に比べて、 1.9^x 倍となる[2]。すなわち、3 M NaCl存在下では6.8倍の活性上昇が認められる。しかし、ZAPM合成反応では、3 M NaCl存在下において、活性が4.3倍上昇した。合成反応における塩の加速効果は、加水分解反応の場合に比べると若干小さいことになる。

式1の反応は圧倒的に原系(左側)に偏っているとはいえ、本質的に平衡反応である。塩の添加により平衡が移動しないと仮定すると、分解反応(右から左向きの反応)がある程度加速されるとき、合成反応(左から右向きの反応)も、同じ程度加速されなければならない。いま、3 M NaCl存在下に合成反応が分解反応ほど加速されなかったことは、NaCl添加により平衡が分解系にシフトすることを示唆している。このことは、3.4節で記述した塩の添加が反応

の平衡に及ぼす効果によく対応した。

3.6. サーマライシンにより触媒されるペプチド合成反応に対する塩の効果

前節で述べた ZAPM 合成に加えて、FA-Gly-Leu-amide (FAGLA), FA-Ala-Leu-amide (FAALA), FA-Ala-Phe-amide (FAAFA) の合成を検討した。いずれの場合も、各種の塩類による反応速度の加速効果は ZAPM の場合とほぼ同様であり、カチオンの効果は Na イオン > K イオン > Li イオンの順であり、アニオンの効果は Cl イオン > Br イオンの順であった。塩非存在下において、FAALA および FAAFA の合成速度は FAGLA の合成速度に比べて、約 1,000 倍も大きく、前者は良好な基質であり、後者は良好とは言えない基質である。しかし、塩の添加は、いずれの基質の反応速度も同程度上昇させ、たとえば、3 M NaCl の添加により、4-5 倍の活性増大が認められた。このことは、ペプチド加水分解に対する塩の添加効果と同様に、良好な基質でもそうでない基質でも、塩による活性化の程度が等しいことを意味しており、塩による活性化は基質の種類によらないと考えられる。

3.7. サーマライシンの溶解度に対する塩の効果

通常の緩衝液 (たとえば 40 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 7.5, 37°C) 中でのサーモライシンの溶解度は 1 mg/ml であるが塩の添加により上昇し、NaCl と KCl では 2.0-2.5 M のとき最大となり、8-10 mg/ml になった。それ以上の塩濃度では逆に低下し、5 M では 1 mg/ml となった。LiCl では極大値を示さず、単調に増加し、2 M では 5 mg/ml、5 M では 25 mg/ml となった。一方、NaBr や NaI では 2.0-2.5 M のとき 35-40 mg/ml となった。溶解度は塩の種類に大きく依存することが明らかになった。溶解度に対する温度依存性を検討した。NaCl 非存在下では、0-60°C において溶解度はほとんど変化せず 1 mg/ml であった。3 M NaCl 存在下では、0°C で 9.5 mg/ml であるが、温度の上昇につれて減少し、60°C では 6 mg/ml となった。4 M NaCl 存在下では、0°C で 6.5 mg/ml であるが、この場合も温度の上昇につれ減少し、60°C では 2 mg/ml になった。他の塩でも、低温ほど溶解度が大きいことが示された。サーモライシンの溶解度は塩が存在しないときには温度に依存しないが、塩存在下では大きく依存し、cold soluble タンパク質としての特徴を示した。0°C において、1 M の各種ナトリウム塩の存在下における溶解度を比較したところ、アニオンのカオトロピック的な性質に従い、溶解度が上昇し、NaSCN では 70 mg/ml、NaI では 30 mg/ml、NaBr では 20 mg/ml、NaCl では 10 mg/ml と求められた。サーモライシンの溶解度は水の構造を破壊した方が増大することから、本酵素の表面はかなり疎水的であると推定された。

溶解度と塩による活性化の関連性を検討した。活性に対するカチオンの効果は Na イオン > K イオン > Li イオンの順である [1]。イオン半径は K イオン > Na イオン > Li イオンの順であり、これは離液系列に対応する。活性化の順序が離液系列に従わないことは、特にナトリウムイオンと酵素との間に特別な相互作用があることを示唆する。一方、溶解度は離液系列に従うと考えられることから、溶解度の増大に影響を与える要因と活性増大に影響を与える要因とは対応しないと考えられる。

3.8. サーマライシンの分子量に対する NaCl の効果

サーモライシンの分子量を NaCl 0, 1, 2, 3, 4 M の存在下において、低角度レーザー散乱解析装置で測定した。すべての NaCl 濃度において、平均分子量は 33,000-35,000 と求められ、単量体で存在することが示された。サーモライシンは塩の存在の有無にかかわらず会合・解離を起こさないと考えられる。通常の緩衝液中におけるサーモライシンの低溶解度は重合体を形成しているためではないこと、さらに高濃度の塩類の存在下に溶解度が上昇することは酵素分子重合体の解離によるものではないことが示された。

3.9. 塩の添加による ZAPM 合成の効率化

NaCl と NaBr はサーモライシンによるペプチド（たとえば ZAPM）加水分解反応をもともとも高度に増大させ、4 M のとき 25°C で、それぞれ 13 および 10 倍の活性上昇が達成される [1]。一方、この条件下での溶解度はそれぞれ 4.2 mg/ml と 34.2 mg/ml である。塩非存在下の溶解度は 1 mg/ml であるから、サーモライシンを溶解度いっぱいまで溶解させて反応に利用しようとすると、4 M NaCl および NaBr 存在下において酵素活性は、塩非存在下の場合に比べてそれぞれ 55 倍および 360 倍になる。酵素を工業的に用いようとするとき、可能な限り高濃度の酵素を用いることにより反応時間を短縮することが有効である。塩を添加することにより、サーモライシンの活性を十数倍も上昇できることは、酵素のコストを十数分の 1 に低減できることを意味しており、製造コストの低下を可能とする。さらに、酵素の溶解度を上げて高濃度の酵素を用いて反応を行いうることは、酵素濃度に反比例して反応時間を短縮でき、装置の運転経費や人件費を削減できる点で製造コストのさらなる低下を可能とする。

4. 考察

サーモライシンは高濃度の塩類の添加により十数倍も活性化を受ける。これまでの研究から、この活性化は分子活性の増大によるものであり、ミカエリス

定数は変化しないことが示されている [2]。塩による活性化の分子機構については、遺伝子工学やタンパク質工学 [6]、化学修飾 [7, 8]、反応速度論と分光学的研究 [9]を用いて研究を進めている。本研究では、塩による活性化を利用して未利用タンパク質資源の分解とペプチド合成を効率的に行えるか否か検討した。未利用タンパク質資源の分解に関しては検討すべきことが多く、期待した成果が得られなかった。高濃度の塩類存在下における基質の状態が、むしろプロテアーゼの作用を受けにくくする結果ではないかと考えられる。今回、対象としたタンパク質は懸濁状であり、塩の存在が凝集体の形成を促進しているように見えた。前処理として、対象タンパク質を可溶化する工夫が望まれる。ペプチド合成について、塩の添加が反応速度の増大をもたらすことを確認した。このことは各種ペプチドとくにアスパルテーム前駆体である ZAPM の酵素合成に有用な知見であると考えられる。速度の増大とは別に、塩の添加は ZAPM と (ZA+PM) の間の平衡を (ZA+PM) の方へシフトさせることが明らかになった。シフトの程度は Li イオン > Na イオン = K イオンであり、離液系列に従う可能性が高い。溶媒の性質を変化させることで平衡を ZAPM 側にシフトさせることができる可能性が示唆された。塩の添加は溶解度の増大にも有効であり、低溶解度ゆえに制約されていたサーモライシンの工業的利用により可能性が開かれた。酵素を溶解度いっぱいまで仕込み、反応を実行すると、塩を加えない場合に比べて、数十倍から数百倍も活性を増大させることが可能である。反応装置の運転時間や人件費の低減と副反応の抑制が期待される。

5. 今後の課題 塩による酵素活性の顕著な増大は、酵素活性を制御する因子を解明し、酵素活性の起因する根元を理解することに重要なヒントを与えるように見える。ここには、塩が酵素の構造に及ぼす構造的な要因と媒質の性質に及ぼす要因の両者があるように思える。我々は、塩が及ぼすのと同様の効果を内在したサーモライシンをタンパク質工学的手法を用いて創出しようと考えている。このようにしてデザインされた改質型サーモライシンは、天然型酵素に比べて数十倍の活性とより高い安定性と溶解度を有するはずである。好塩性は、とりわけ工業用酵素において重要であると考えられる。工業的に酵素反応を行う場合、装置の運転効率や製造コストの面から高濃度の基質を用いることが多い。試験内の反応系とは異なり、イオン強度、粘度、塩濃度が高いのがふつうであり、好塩性酵素はこのような条件での反応に好適であると考えられる。今後は、好塩性と好熱性、さらに対有機溶媒性との関係を解明し、優れた工業用酵素を模索する予定である。また、サーモライシンはそれ自体、もっとも高い活性をもつプロテアーゼである。本酵素の好熱性と好塩性は洗剤用酵素としても優れているはずであるが、アルカリ性側での活性が低いため利用されない。

アルカリ性での活性を高める工夫を試みようとしている。

6. 文献

1. Inouye, K. (1992) *J. Biochem.* 112, 335-340.
2. Inouye, K., Lee, S.-B., and Tonomura, B. (1996) *Biochem. J.* 315, 133-138.
3. Inouye, K., Kuzuya, K., and Tonomura, B. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1388, 209-214.
4. Blumberg, S., and Vallee, B. L. (1975) *Biochemistry* 14, 2410-2419.
5. Inouye, K., Kuzuya, K., and Tonomura, B. (1998) *J. Biochem.* 123, 847-852.
6. Inouye, K., Mazda, N., and Kubo, M. (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 798-800.
7. Lee, S.-B., Inouye, K., and Tonomura, B. (1998) *J. Biochem.* 124, 72-78.
8. Inouye, K., Lee, S.-B., and Tonomura, B. (1998) *J. Biochem.* 124, 72-78.
9. Inouye, K., Kuzuya, K., and Tonomura, B. (1994) *J. Biochem.* 116, 530-535.

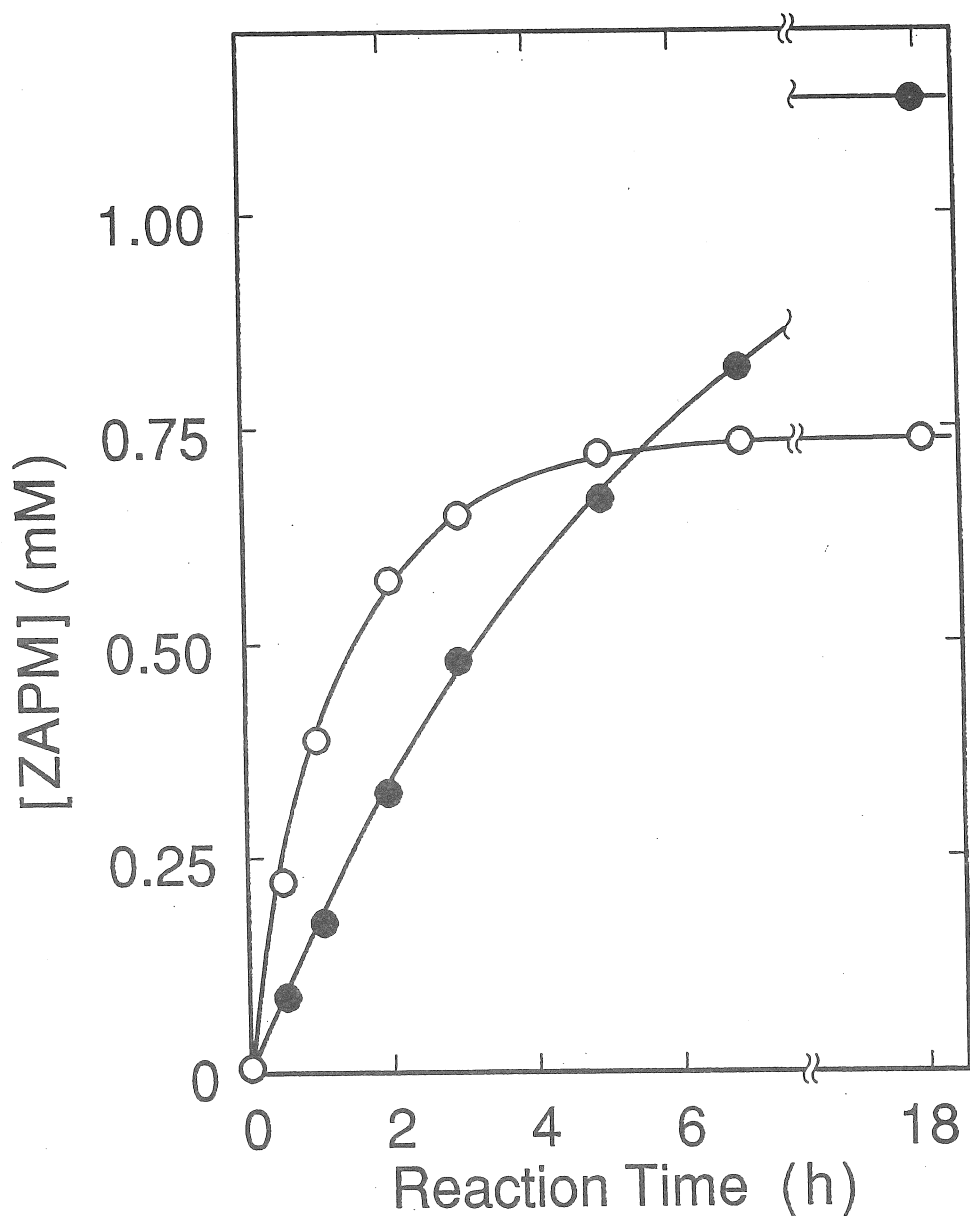


Fig. 1. Time course of the N-carbobenzoxy-aspartyl-phenylalanine methyl ester (ZAPM) synthesis catalyzed by thermolysin. The reaction was performed by mixing N-carbobenzoxy-aspartic acid (ZA) and phenylalanine methyl ester (PM), both 36.4 mM, with 0.8 μ M thermolysin, at pH 6.5, 40°C, in the absence of salt (closed circles) and presence of 3 M NaCl (open circles).

Table I. Effect of 3 M of Various Salts on the Thermolysin-catalyzed Synthesis of ZAPM from ZA and PM

salt	ZAPM yield (%)	K (M^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	k ($M^{-1} h^{-1}$)	Activation
none	3.0	0.88	3.8	7.2	1.0
NaCl	2.0	0.57	0.9	31	4.3
NaBr	1.9	0.54	1.3	21	2.9
KCl	1.9	0.54	1.5	18	2.5
KBr	2.2	0.63	1.5	18	2.5
LiCl	1.2	0.33	2.0	14	1.9
LiBr	1.2	0.37	2.0	14	1.9

The reaction was carried out by adding 830 nM thermolysin to a mixture of ZA and PM; both 36.4 mM, in the presence of 3 M salt at pH 6.5, 40°C. The ZAPM yield was determined after reaction for 18 h. Half-time ($t_{1/2}$) is the reaction time required for the ZAPM concentration to reach half that at equilibrium.

Enzymatic Degradation of Unutilized Protein Resources and Peptide Synthesis in the Presence of High Concentration of Salts

Kuniyo Inouye
Division of Applied Life Sciences,
Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Summary

We have reported that a thermophilic proteinase, thermolysin, is activated remarkably (10-30 times) and its stability increases in the presence of high concentration of salts (for example, 1-5 M NaCl). Thermolysin is considered to be a thermo- and halophilic enzyme. In the present study, application of thermolysin to the enzymatic degradation of unutilized protein resources and peptide synthesis was examined.

The thermolysin-catalyzed hydrolysis of soybean protein isolates and protein wastes produced from soy sauce fermentation was studied in the presence of salts. The addition of salts, however, showed little effect on the hydrolysis, suggesting the structural change of the substrate proteins by high concentration of salts not to be recognized by thermolysin. The peptide synthesis catalyzed by thermolysin was promoted by adding salts in the medium, and the degree of activation in the reaction rate was almost the same as that observed in the peptide hydrolysis, namely 4-5 times with 3 M NaCl. Equilibrium of the reaction, however, was shifted to the cleaved site of the peptide bonds in the presence of salts, which made the yield of the peptide synthesized decreased. In the absence of salts, the yield was 3 %, but it decreased to 1-2 % by adding 3 M salt. It was found that the solubility of thermolysin increased to >10 mg/ml without its aggregation and dispersion, although it is only 1 mg/ml in the absence of salts. It is shown that the salt effects might be totally desirable for application of thermolysin to peptide synthesis.