

50

助成番号 0150

ヒトと微生物の金属プロテイナーゼの活性発現機構に対する塩効果の比較および食品科学への応用

井上國世、榊 利之、滝田禎亮、小根田洋史 (京都大学大学院農学研究科)

[目的] *Bacillus thermoproteolyticus* 由来の好熱性金属プロテイナーゼ、サーモライシン (TLN) は高濃度 (1.5 M) の塩の存在下に顕著に活性化し、安定性も増大する。我々はこの結果に基づき、TLN の未利用蛋白質資源の分解やアスパルテームの合成を検討してきた。本研究では TLN と近縁の金属プロテイナーゼであり、コラーゲン分解活性をもつヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ-7 (matrilysin, MLN) を対象として、その活性に対する塩効果を TLN と比較検討した。

[方法] ヒト MLN は大腸菌発現系により形成されたインクルージョンボディから調製した*。MLN のペプチダーゼ活性およびコラゲナーゼ活性はそれぞれ蛍光性ペプチド基質、MOCAc-PLGL(Dpa)AR および合成コラーゲン基質、アゾコールを用いて、pH 7.5 において測定した。

[結果] TLN の合成ペプチド基質 Furylacryloyl-Gly-Leu-amide 分解活性は塩の添加により指数関数的に増大し、 x M NaCl 存在下では NaCl 非存在下の 1.9 \times 倍である。4 M NaCl 存在下での TLN 活性は NaCl 非存在下の 15 倍であり、この活性化は分子活性 (k_{cat}) の増大にのみ起因する。一方、MLN の MOCAc-PLGL(Dpa)AR 分解活性は塩濃度に対して 2 相性を示しながら、指数関数的に増大した。4 M NaCl 存在下での MLN 活性は NaCl 非存在下の 5.3 倍であり、この活性化はミカエリス定数 (K_m) の減少にのみ起因した。活性化度は $[NaCl] < 0.5$ M では 2.1 \times 、 $[NaCl] > 0.5$ M では 1.4 \times で表され、 $[NaCl] < 0.5$ M では塩濃度増大に伴う MLN と基質間の反発の静電的相互作用の減少に起因し、 $[NaCl] > 0.5$ M では MLN と基質間の疎水的相互作用の増強に起因することが示唆された。また、塩の添加により TLN では遷移状態が安定化されるのに対して、MLN では酵素基質複合体が安定化されることが示唆された。コラゲナーゼ活性は 0.2~0.5 M NaCl の添加で 40~50% に減少し、NaCl 濃度を 0.5 から 3 M まで増大すると 200% にまで増大した。さらに NaCl 濃度を 4 M まで増大すると活性は再び 100% に減少した。0~3 M NaCl では濃度の増大に伴い、 k_{cat} 、 K_m ともに増大するが、 k_{cat} の増大の方が大きい。MLN のペプチダーゼ活性の活性化は高濃度の NaCl ほど効果的であり、一方、コラゲナーゼ活性では 3 M NaCl が最も効果的であった。MLN は塩により活性化されるのみならず、TLN と比較して広範な至適 pH、さらにコラゲナーゼ活性をも有することから幅広い用途が期待される。

文献

* H. Oneda and K. Inouye, *J. Biochem.* 126, 905-911 (1999)

14

助成番号 0150

ヒトと微生物の金属プロテイナーゼの活性発現機構に対する塩効果の比較および食品科学への応用

助成研究者 井上國世 (京都大学大学院農学研究科)
 共同研究者 榊 利之 (京都大学大学院農学研究科)
 滝田禎亮 (京都大学大学院農学研究科)
 小根田洋史 (京都大学大学院農学研究科)

1. 研究目的

サーモライシン[EC 3.4.24.27] (以下、TLN と略称する) は中等度好熱菌 *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko が菌体外に産生する中性金属プロテイナーゼである¹⁾。TLN は 316 個のアミノ酸残基により構成される分子量 34,600 のタンパク質であり、活性に必須の亜鉛 1 原子と構造の安定化に必要なカルシウムを 4 原子含む。本酵素の構造はほぼ同程度のサイズからなる 2 つのドメインからなり、N 末端ドメインと C 末端ドメインとの間に形成されるクレフトが基質結合部位を形成している。酵素活性の発現に必要と考えられるアミノ酸残基の大半は C 末端ドメインに存在している²⁾。TLN はその広い基質特異性と高い比活性のため、工業的にはアスパルテーム等のペプチド合成や未利用蛋白質資源の分解等に利用されている。

我々は過去数年間にわたりソルトサイエンス研究財団の研究助成 (#9330、#9652、#9856、#0049) を受けて、TLN の活性発現の分子機構および塩の添加による活性化に関する研究に従事してきた。我々は高濃度 (1~5 M) の塩類の添加により TLN のペプチド加水分解活性が顕著に増大することを見出した³⁾。この活性化は塩のイオン種に依存し、ペプチド基質 Furylacryloyl-Gly-Leu-amide (FAGLA) を用いた場合、陰イオンでは Cl⁻>Br⁻>I⁻、陽イオンでは Na⁺>K⁺>Li⁺の順に高い効果が認められた。TLN 活性は添加する塩の濃度に対して指数関数的に増大し、pH 7.5、25℃において x M NaCl 存在下での活性は NaCl を含まないときの 1.9x 倍となった。4 M NaCl 存在下では TLN 活性は 15 倍となる。また複数の FA-dipeptide-amide を基質に用いた場合、この塩の添加による反応加速は基質の種類によらず一定であった⁴⁾。これら塩による活性化を検討した全ての基質において、分子活性 (k_{cat}) のみが増大し、ミカエリス定数 (K_m) は変化しなかった^{5),6)}。すなわち、塩の添加は ES 複合体の形成に

影響はないが、遷移状態を安定化することが示唆された。TLNの活性はpH 6.6に至適pHをもつベル型のpH依存性を示し、 pK_a は5.4と6.8である。X線結晶構造解析の結果から、前者はGlu 143に、後者はHis 231に起因すると考えられている。4 M NaClの添加によりTLNのpH依存性は酸性側 pK_a が5.4から6.7へシフトすることが見いだされた。この pK_a 値はGluとしては異常に高い値であり、酸性側 pK_a を与える残基は亜鉛に配位した水である可能性を示唆するものである。また、塩による活性化はpH 7.0で最大であり、酸性側やアルカリ性側では低下した⁶⁾。

実際に塩の存在下にアスパルテーム前駆ペプチド (Z-Asp-Phe-OMe; ZAPM) の加水分解活性と同程度の活性化が合成活性にも観測された。塩は触媒反応の正逆反応を同程度活性化することが示され、アスパルテームをはじめとするペプチド合成に有効であることが示された³⁾。本研究ではTLNと近縁の金属プロテイナーゼであり、コラーゲン分解活性をもつ、ヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ-7 (MMP-7、マトリライシン、以下、MLNと略称) を対象として活性に対する塩の添加効果とその応用性を検討する。

MLNはMMPスーパーファミリーの一員であり、動物細胞の細胞外マトリックスの分解に関与する亜鉛金属プロテイナーゼである。MMPは細胞の発生・分化、組織再生などに関わると考えられてきた⁷⁾。近年、多くの癌細胞において高度な発現が確認され、特に基底膜の構成成分であるIV型コラーゲンを分解する一群のMMPはその発現と癌細胞の転移能の相関性から特に注目されてきた⁸⁾。MLNは分子サイズが最小のMMPであり、その構造はTLNのC末端ドメインにほぼ相当する⁹⁾。我々は哺乳動物のMMPの活性部位構造や反応機構がTLNに類似していることから、TLNに関して蓄積された知見をもとにMLNの食品科学への応用を積極的に試みる。MLNの広範な基質特異性を利用して、ペプチドのみならず、脱脂大豆蛋白質、オカラ、醤油粕、絹フィブロインなどの蛋白質資源の分解、また、廃皮革や水産廃棄物等の動物性蛋白質からのコラーゲン抽出などでの利用が期待できる。TLNとMLNの相乗的利用と塩の添加により、効率的な有用物質調製法の基盤を提供できると考えられる。

2. 研究方法

2-1. 大腸菌発現系により形成されたインクルージョンボディからのマトリライシン (MLN) の調製

我々が構築したヒト大腸癌由来 pro-MLN の大腸菌発現系により、pro-MLN を

発現した大腸菌菌体をダイノミルで破碎し、1 M sucrose に懸濁したのち、遠心分離により沈殿を回収した。沈殿を 10 mM EDTA・2Na を含む 2% Triton X-100 (pH 8.0) で 3 回洗浄し、6 M Gdn-HCl と 0.1 M DTT を含む 0.1 M Tris-HCl buffer を用いて可溶化した。続いて、1% 界面活性剤、Brij-35、0.1 mM ZnOAc、0.2 M NaCl、10 mM CaCl₂ および 0.02% NaN₃ を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5, 4°C) に対して 100 倍希釈し、12 時間処理により pro-MLN の再生を行った。再生溶液を陽イオン交換 HPLC (TSKgel SP-5PW, pH 7.5, 25°C) に供し、0.28 M NaCl で溶出される画分 (pro-MLN) を分取した。Pro-MLN を 1 mM aminophenylmercuric acetate (APMA) 処理により活性化後、透析により APMA とプロペプチドを除去し、活性型 MLN を得た¹⁰⁾。

2-2. ペプチダーゼ活性の測定

ペプチダーゼ活性の測定は蛍光性ペプチド基質 (7-Methoxycoumarin-4-yl) acetyl-L-Pro-L-Leu-Gly-L-Leu-[N³-(2,4-dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl]-L-Ala-L-Arg-NH₂ (MOCAC-PLGL(Dpa)AR) を用いて行った。酵素活性は 10 mM CaCl₂ および 0.6% DMSO 含む 50 mM HEPES buffer (pH 7.5, 25°C) 中において、MLN による本基質の Gly-Leu 間のペプチド結合の切断に伴う蛍光強度の増大 (励起波長 328 nm、発光波長 393 nm) を連続的に測定して求めた。また蛍光の特性上、基質高濃度の条件では正確な蛍光強度の測定は困難である。高濃度の基質存在下での酵素反応は 10 mM CaCl₂ および 3% DMSO 含む 50 mM HEPES buffer (pH 7.5, 25°C) 中で行った。一定時間毎に 0.8% trifluoroacetic acid (TFA) により反応を停止し、逆相 HPLC (TSKgel ODS-80TS) を用いて生成物 (MOCAC-PLG) を定量してペプチダーゼ活性を求めた¹¹⁾。

2-3. コラゲナーゼ活性の測定

コラゲナーゼ活性の測定はアゾコール (<50 mesh) を基質として行った。3.0 mg のアゾコールを 2.0 ml の 10 mM CaCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5, 37°C) 中で 15 分処理後、MLN 溶液を添加して反応を行った。酵素活性は反応溶液を一定時間後に濾紙を用いて濾過し、濾液の 520 nm における吸光度の増加量から求めた¹²⁾。

2-4. MLN 活性の pH 依存性

MLN の MOCAC-PLGL(Dpa)AR 加水分解活性の pH 依存性を 25°C において検討した。pH 3.6~5.8 では 50 mM 酢酸、pH 6.0~6.8 では 50 mM MES、pH 6.8~8.5 では 50 mM HEPES、pH 8.5~10.0 では 50 mM AMPSO をそれぞれ用い

た。それぞれの緩衝液には 10 mM CaCl₂ および 0.6% DMSO を含む。

2-5. MLN 活性の温度依存性

pH 7.5 における MLN の MOCAC-PLGL(Dpa)AR 加水分解活性をペルチェ式恒温セルホルダーを用いて 5~78°C において測定し、反応温度の効果を検討した。また、MLN を pH 7.5、40~78°C において一定時間処理後、37°C で 3 分間処理したのち MLN 活性を測定し、熱安定性を検討した。

4. 研究結果

3-1. MLN 活性の pH および温度依存性

MLN 活性の pH 依存性を 25°C において測定した結果、広範な至適 pH をもつベル型の pH 依存性を示した。pK_a 値は 4.3 および 9.6 と求められた¹³⁾。また、pH 7.5 における MLN の MOCAC-PLGL(Dpa)AR 加水分解活性の温度依存性を検討した結果、MLN 活性の至適温度は 50°C と求められた。熱安定性を検討した結果、pH 7.5、10 分処理によって活性の 50% を失う温度は 70°C、同様に 30 分処理によって活性の 50% を失う温度は 65.5°C と求められた。熱失活の活性化エネルギー E_a は 237 ± 9 kJ/mol と求められた¹²⁾。

3-2. MLN のペプチダーゼ活性に対する塩の添加効果

MOCAC-PLGL(Dpa)AR を基質とした蛍光測定による活性測定では、内部遮蔽効果に加えて、高濃度の塩の添加 (1-4 M) による基質の溶解度の減少により、基質濃度が制限される。よって、MLN 活性は擬一次反応条件下 ($[S] \ll K_m$) で測定し、特異性定数 (k_{cat}/K_m) を活性の指標とした。本条件下において、反応速度 v は $k_{cat}[E]_0[S]/K_m$ で表される。MLN 活性は NaCl 濃度の増大に伴い、指数関数的に増大し、かつ、2 相性を示した (Fig. 1)。4 M NaCl 存在下では NaCl 非存在下に比べて、MLN 活性は 5.3 倍に増大した。ここで、NaCl 非存在下での活性を v_0 とすると、 x M NaCl 存在下での活性 v は、 $\ln v = \ln v_0 + a \cdot x$ で表される。また、活性化度 (v/v_0) は、 $2.1 \times$ ($[NaCl] < 0.5$ M) および $1.4 \times$ ($[NaCl] > 0.5$ M) とそれぞれ求められた。

HPLC を用いて生成物を定量し、個々の速度パラメータ、分子活性 k_{cat} およびミカエリス定数 K_m に対する塩の効果を検討した。塩の添加により、基質の溶解度が減少するため、ここでは 2 M 以下の塩濃度で検討した。NaCl の添加により、 k_{cat} は変化しないが、 K_m は指数関数的に減少した。この K_m の減

少は NaCl 濃度に対して 0.5 M を境に 2 相性を示した (Fig. 2)。このことから、MLN 活性の塩による活性化は K_m の指数関数的な減少によってのみ引き起こされることが示された。この K_m の挙動は MLN の NaCl による活性化の 2 相性に一致する。ここで、 $K_m(xM NaCl) / K_m(0M NaCl)$ は、 0.43^x ($[NaCl] < 0.5 M$) および 0.75^x ($[NaCl] > 0.5 M$) とそれぞれ求められた。擬一次反応条件下において反応速度 v は $k_{cat}[E]_0[S] / K_m$ で表されるので、この K_m の指数関数的減少から $x M NaCl$ 存在下での活性化度 (v/v_0) は 2.3^x ($[NaCl] < 0.5 M$) および 1.3^x ($[NaCl] > 0.5 M$) とそれぞれ求められた。DMSO は拮抗阻害剤として作用するが、これらの 3% DMSO 存在下、HPLC を用いて求めた値は、0.6% DMSO 存在下、蛍光測定により算出した値と良い一致を示した。

3-3. MLN のコラゲナーゼ活性に対する塩の添加効果

NaCl 非存在下での MLN のアゾコル加水分解活性は pH 7.5、37°C において $11 \mu\text{g-azocoll ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ と求められた。0.2 から 0.5 M NaCl の添加により、相対活性は 40-50% に減少し、NaCl が 0.5 から 3 M に増大すると 200% にまで増大した。さらに NaCl を 3 M から 4 M に増大すると、再び 100% にまで減少した (Fig. 3)。アゾコル加水分解活性に関する速度パラメータ、 k_{cat} および K_m に対する NaCl の添加効果を表に示した (Table I)。NaCl 濃度を 0.5 から 3 M へ増大すると k_{cat} 、 K_m ともに増大したが、 k_{cat} の増大は K_m の増大よりも大きい。4 M NaCl 存在下では k_{cat}/K_m は $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ と求められたが、検討した基質濃度 (0~6 mg/ml) では K_m が算出できず、6 mg/ml 以上と推定した。従って、 k_{cat} は $3.6 \times 10^5 \text{ mg/ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ と求められた。

4. 考察

4-1. MLN 活性の pH および温度依存性

TLN 活性の pH 依存性は pH 6.6 に至適 pH をもつシャープなベル型の pH 依存性を示すのに対して、MLN 活性の pH 依存性は pH 5~9 に広範な至適 pH をもつ幅広いベル型の pH 依存性を示した。TLN は活性が反応溶液の微小な pH 変化に影響をうけるが、MLN は広範囲の pH において有効に利用できることが示された。MLN の pH 7.5 における至適温度は 50°C、30 分処理によって 50% 活性を失う温度 T_{50} は 66°C、熱失活の活性化エネルギー E_a は 237 kJ/mol とそれぞれ求められた。それぞれ TLN の結果と比較すると、 T_{50} は 89°C と TLN の方が 23°C 高いが、 E_a は 134 kJ/mol と MLN よりも約 100 kJ/mol 低い。これら

の結果から、MLN は温度制御による酵素活性の制御が比較的容易であると考えられる。

4-2. MLN のペプチダーゼ活性に対する塩の添加効果

TLN は高濃度 (1~4 M) の中性塩により、顕著に活性化され安定化される。TLN の FA-dipeptide amide 加水分解活性は塩濃度の増大に伴い指数関数的に増大し、 x M NaCl 存在下での活性化度は $1.9x$ で表わされる⁴⁾。MLN の MOCAC-PLGL(Dpa)AR 加水分解活性を TLN の好塩性と比較して検討したところ、MLN 活性もまた NaCl 濃度の増大に伴って指数関数的に増大した。4 M NaCl 存在下における MLN 活性の活性化度は 5.3 と求められ、TLN のそれよりもかなり小さい。MLN 活性の活性化は NaCl 濃度に対して 2 相性を示し、2 つの指数関数曲線に近似された。MLN 活性の活性化度は $[\text{NaCl}] < 0.5$ M では $2.1x$ 、 $[\text{NaCl}] > 0.5$ M では $1.4x$ とそれぞれ求められた。この活性化は K_m の指数関数的な減少に起因しており、 K_m の NaCl 濃度依存性も 0.5 M 付近で変化する。この $[\text{NaCl}] < 0.5$ M での急激な K_m の減少は、MOCAC-PLGL(Dpa)AR と MLN の反発の静電的相互作用の緩和によるものと考えられる。一方、 $[\text{NaCl}] > 0.5$ M での K_m の減少は NaCl 濃度の増大に伴う、酵素基質間の疎水的相互作用の増強に起因すると考えられる。MLN と MOCAC-PLGL(Dpa)AR の結合はエントロピー駆動で進行するという結果¹¹⁾と合わせて、塩による疎水的相互作用の増強は ES 複合体の形成に有利に働くことが示唆された。

TLN の活性および塩による活性化は有機溶媒の添加により顕著に阻害される。一方、MLN の活性は DMSO によって阻害されるが、塩による活性化は DMSO の添加によっても変化が見られない。この違いは TLN は k_{cat} の増大によって、MLN は K_m の減少によって活性化されるという違い、すなわち、塩の添加によって TLN では遷移状態が、MLN では ES 複合体が安定化されるという活性化機構の違いに起因する可能性が高い。

4-3. MLN のコラゲナーゼ活性に対する塩の添加効果

実際にアゾ色素を結合したコラーゲン基質、アゾコールを用いて MLN 活性に対する塩の効果を検討した。蛍光ペプチド基質を用いて検討した MLN 活性の塩による活性化はアゾコールを用いた結果とは異なった。アゾコールを用いた場合、NaCl を 0.5 M 添加することにより MLN 活性は 40~50% にまで低下した。NaCl 濃度を 3 M にまで増大すると MLN 活性は 200% にまで増大し、さらに 4 M まで増大すると活性は 100% にまで減少した。塩に対する応答性はペプチド基質を用いた場合とは異なり、アゾコールを用いた場合は K_m の減少は見られな

い。K_mの増大は1 M NaClで飽和に到達したことから、これはアゾコールとMLN間の静電的相互作用の減少によるものと考えられる。一方、0~3 M NaCl添加によるk_{cat}の増大と3~4 Mでの減少は、おそらくMLNのコンフォメーション変化、およびアゾコール基質の変性または凝集によるものと考えられる。MLNによるアゾコールの分解には3 M NaClの添加が有効であり、活性が2倍に増強されることが示された。

5. 今後の課題

今回、MLNのペプチダーゼ活性およびコラゲナーゼ活性ともに塩の添加により増大し、前者は4 M NaCl存在下で5.3倍に、後者は3 M NaCl存在下のとき最大2倍になることが示された。我々はTLNのアミノ基(Lys残基のε-アミノ基11個とN-末端のα-アミノ基1個の計12個)のうち5.2残基を2,4-bis(O-methoxy-polyethylene glycol)-6-chloro-ε-triazine (mPEG2)を用いて化学修飾したTLNはFAGLA加水分解活性において、k_{cat}が1.9倍、K_mが1/3となることを見出した(井上國世、松村憲吾：未発表)。また、TLNの活性部位の亜鉛をコバルトに置換することにより、FAGLA加水分解活性が3倍に増大した。このコバルト置換と塩効果とは互いに独立であり、コバルト置換TLNに4 M NaClを添加することにより、30~45倍の活性化が認められた¹⁴⁾。TLNに関して得られたこれらの知見はMLNにも適用できる可能性があり、塩の添加のみならず、コバルト置換、PEG修飾によるMLN活性のさらなる増大が期待できる。我々は既にMLNの大腸菌発現系を構築し、その大量調製法も確立している¹⁰⁾。MLNはTLNと異なり、広範な至適pHをもち、ペプチドのみならずコラーゲン等の動物性蛋白質の分解活性を有しているため、幅広い用途が期待される。但し、今回検討したアゾコールは嵩高い疎水性のスルファニル酸およびスルファニルアミドがコラーゲンのLys、His、Tyr残基にアゾ結合を介して結合しているものであり、静電的および疎水的性質が元のコラーゲンとは異なっている可能性がある。今回は合成コラーゲン基質を用いてMLNのコラゲナーゼ活性に対する塩の効果を予備的に検討したが、今後は実際にコラーゲンを含む未利用タンパク質を基質として検討する必要がある。

6. 文献

- 1) S. Endo, *J. Ferment. Technol.* **40**, 364-353 (1962)
- 2) M. A. Holmes and B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.* **160**, 623-639 (1982)
- 3) K. Inouye, *J. Biochem.* **112**, 335-340 (1992)
- 4) K. Inouye, S.-B. Lee, and B. Tonomura, *Biochem. J.* **315**, 133-138 (1996)
- 5) K. Inouye, K. Kuzuya, and B. Tonomura, *Biochim.Biophys.Acta* **1388**, 209-214 (1998)
- 6) K. Inouye, S.-B. Lee, K. Nambu, and B. Tonomura, *J. Biochem.* **122**, 358-364 (1997)
- 7) J. F. Woessner, Jr. *FASEB J.* **5**, 2145-2155 (1991)
- 8) J. F. Woessner, Jr. and C. J. Taplin, *J. Biol.Chem.* **263**, 16918-16925 (1988)
- 9) B. Quantin, G. Murphy, and R. Breathnach, *Biochemistry* **28**, 5327-5334 (1989)
- 10) H. Oneda and K. Inouye, *J. Biochem.* **126**, 905-911 (1999)
- 11) H. Oneda and K. Inouye, *J. Biochem.* **128**, 785-791 (2000)
- 12) K. Inouye, H. Tanaka, and H. Oneda, *J. Biochem.* **128**, 363-369 (1999)
- 13) H. Oneda and K. Inouye, *J. Biochem.* **129**, 429-435 (2001)
- 14) K. Kuzuya and K. Inouye, *J. Biochem.* **130**, 783-788 (2001)

Table I. Effect of NaCl on the matrilysin-catalyzed hydrolysis of azocoll.

NaCl (M)	K_m (mg/ml)	$k_{cat} \times 10^{-5}$ (mg/ml/M/min)	$(k_{cat}/K_m) \times 10^{-4}$ (/M/min)
0	3.7 ± 0.3	1.7 ± 0.2	4.7 ± 0.5
0.5	5.5 ± 0.5	1.7 ± 0.3	3.0 ± 0.4
1.0	4.7 ± 0.3	1.8 ± 0.3	3.8 ± 0.5
2.0	5.0 ± 0.5	2.8 ± 0.4	5.7 ± 0.5
3.0	5.9 ± 0.5	5.1 ± 0.4	8.6 ± 0.7
4.0	>6	>3.6	6.0 ± 0.6

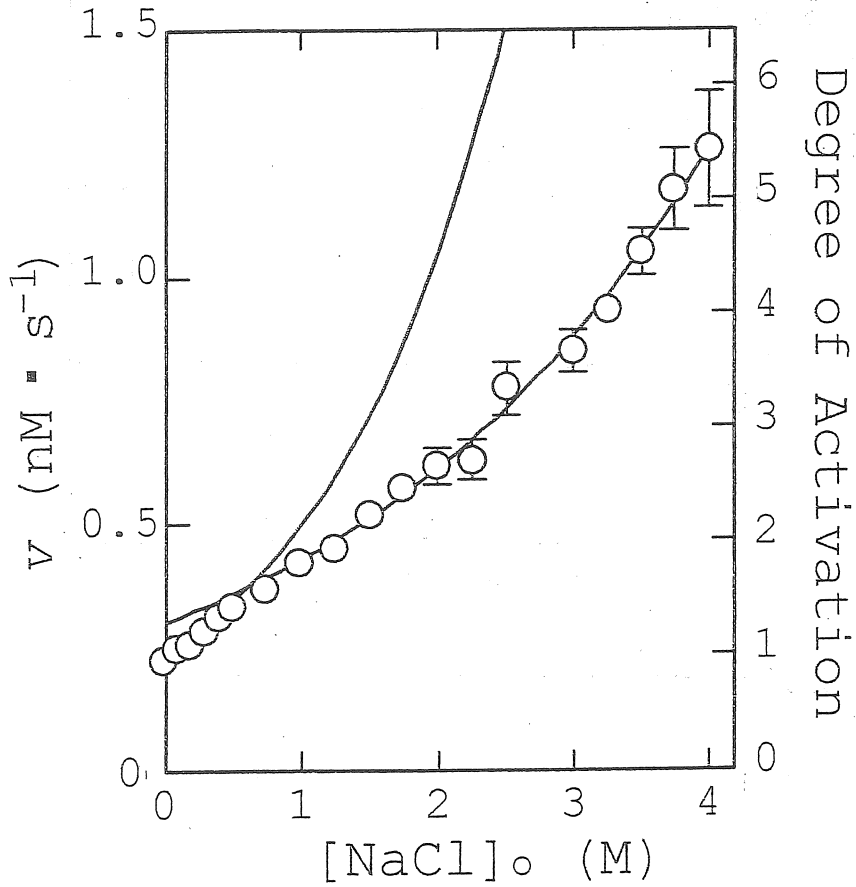


Fig. 1. Effect of NaCl on the matrilysin-catalyzed hydrolysis of MOCAC-PLGL(Dpa)AR

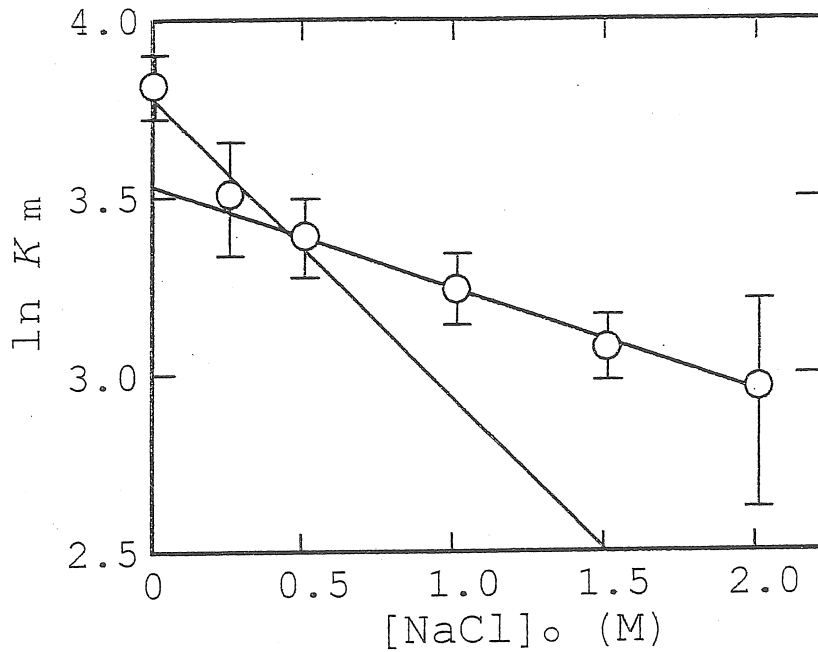


Fig. 2. Logarithmic relationship of NaCl the K_m value with the NaCl concentration

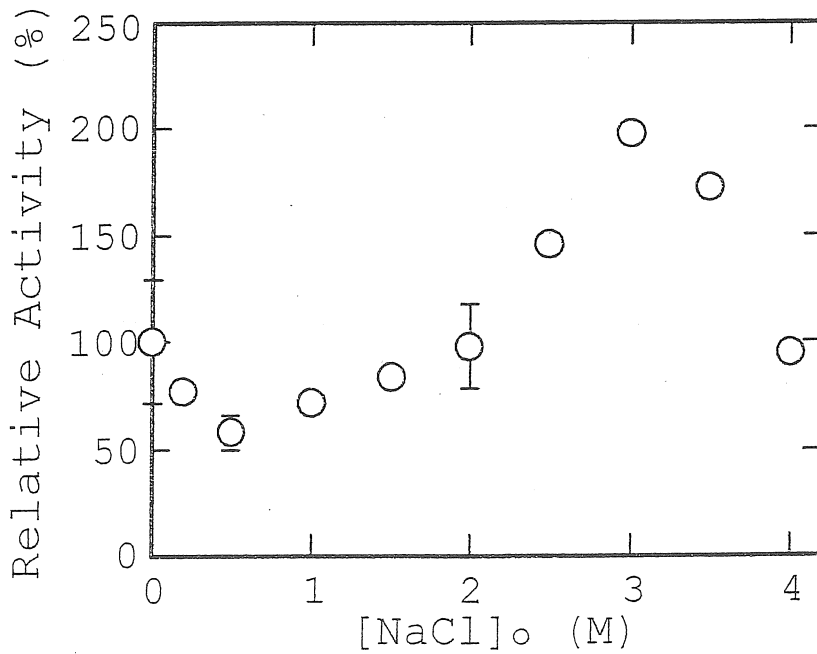


Fig. 3. Effect of NaCl on the matrilysin-catalyzed hydrolysis of azocoll

Comparison of the Salt Effect on the Activity of Metalloproteinases from Human and *Bacillus thermoproteolyticus* and its Application to Food Science

Kuniyo Inouye, Toshiyuki Sakaki, Teisuke Takita, and Hiroshi Oneda
(Div. of Food Sci. and Biotech., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

[Introduction] The activity of a thermostable metalloproteinase from *Bacillus thermoproteolyticus*, thermolysin (TLN) is remarkably enhanced by high concentration of salts (1-5 M), as well as the stability. On the basis of the result, the degradation of untapped proteinaceous resources and the synthesis of the sweetener aspartame, by TLN, have been examined in the presence of salts. In this study, we adopt a collagenase closely related to TLN, human matrix metalloproteinase-7 (matrilysin, MLN) and describe the salt effect on the activity of MLN in comparison with that of TLN. [Experimental procedures] Recombinant human MLN was prepared from the inclusion bodies expressed by *E. coli*. The peptidase and collagenase activity of MLN was measured at pH 7.5 with MOCAC-PLGL(Dpa)AR and azocoll, respectively. [Results] The temperature giving 50% inactivation in a 30-min incubation (T_{50}) and the activation energy for the thermal inactivation (E_a) of TLN were determined to be 89°C and 134 kJ/mol, whereas those of MLN were 66°C and 237 kJ/mol, respectively. The peptidase activity of TLN measured with Furylacryloyl-Gly-Leu-amide increased in an exponential fashion with an increase in [NaCl], and the degree of activation at x M NaCl was expressed as 1.9^x . The activation was brought about solely through an increase in the catalytic constant (k_{cat}). On the other hand, the peptidase activity of MLN was increased in a biphasic exponential fashion, and the activation was brought about solely through a decrease in the Michaelis constant (K_m). The degree of activation at x M NaCl was expressed as 2.1^x when [NaCl]<0.5 M and 1.4^x when [NaCl]>0.5 M, suggesting that the decrease in K_m observed at [NaCl]<0.5 M was derived from the weakened repulsive electrostatic interaction between MLN and MOCAC-PLGL(Dpa)AR and that at [NaCl]>0.5 M was from the strengthened hydrophobic interaction between them with increase in [NaCl]. The collagenase activity was decreased to 40-50% by the addition of 0.2-0.5 M NaCl, increased to 200% with increasing [NaCl] from 0.5 to 3 M, and decreased to 100% with increasing [NaCl] from 3 to 4 M. With an increase in [NaCl] from 0.5 to 3 M, the k_{cat} and K_m values increased, and the increment of the former was larger than that of the latter. It was suggested that 3 M NaCl was the most effective concentration in hydrolyzing collagens, whereas the higher the [NaCl], the more effective in hydrolyzing peptides.