

ポリアクリルアミドゲルによるパパインの固定化

河 邊 誠一郎*・河 邊 要太郎**

岡山理科大学, 基礎理学科* 応用化学科**

(昭和56年9月25日 受理)

緒 言

蛋白分解酵素パパインは、現在利用されている酵素の中でとくに需要の多い酵素の1つである。この酵素は、他の一般的な酵素と較べ、その性質をかなり異にしており、たとえば、その物理的安定性、多種にわたる基質との反応性、唯1つのSH活性基を有しているなどの特徴が知られている。本報では、このパパイン酵素の特徴を利用して、固定化を試みたもので、担体には、電気泳動などのカラム担体として広く用いられている高分子ポリアクリルアミドゲルを用いた。この場合アクリルアミドの重合条件を変えることによって様々な性質の担体を調製することが可能ばかりではなく、酵素はその担体内に物理的に包括されるため、適当な条件さえ選択すれば他の多くの酵素にも応用できる可能性を持っている。筆者らは既にパパインの γ 線によるアクリルアミドゲルへの包括について報告¹⁾したが、この場合包括酵素の活性は、もとの8~13%に減少した。本報告では γ 線の代わりに、架橋剤や、重合促進剤を用いて、アクリルアミドゲル包括パパインを調製し、調製に関する諸条件を検討すると同時に、固定化物の諸性質および高活性のゲル包括パパインを得るための保護物質の影響などについて検討した。

実 験 方 法

ゲル包括パパインの調製 ポリアクリルアミドゲルの調製法は、Brownら²⁾や、宇佐美ら³⁾の方法を参考にし、かつゲル状態および活性発現率との関係を検討した結果つぎの方法をゲル包括パパインの標準調製法とした。すなわちアクリルアミドモノマー(A.A.: $\text{CH}_2=\text{CHCO}\cdot\text{NH}_2$) 1.5 gに重合促進剤として5%ジメチルアミノプロピオニトリル(DMAPN; $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$) 1 mlおよび重合触媒として1%過硫酸カリウム(KPS: $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 1 mlを加えた後、共重合モノマーとして、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(MBA: $(\text{CH}_2=\text{CHCONH})_2\text{CH}_2$) 100 mgを加え、混合し担体素材とした。これに0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.8)に溶解した酵素液 8 ml (50mg/ml)を添加し窒素ガスを通じながら十分攪拌溶解し、室温で1時間静置してゲル包括パパインをえた。実験には、えられたゲルを、調製時と同様の緩衝液中でホモジナイズし、40~100 meshのふるいにかけて、えられたゲル細粒を純水で3回洗浄し、減圧乾燥したものをを用いた。保存にあたっては、密封して、冷蔵庫(4°C)内においた。

活性測定法 使用した酵素パパインは、市販（東京化成工業㈱）のものを溶解し、遠心分離し、その上澄液を用いた。パパインの活性測定にあたっては、前報^{4・5)}で示したように、そのアミダーゼ活性を測定した。すなわち、まずパパインを 0.05 M L-シスチンと、0.002 M EDTA を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 中で 35°C, 30 min 活性化した。これに基質として、 α -N-ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩 (BAPNA) (シグマ社製) の 1.2 mM リン酸緩衝溶液 (5%ジメチルスルフォオキシド (DMSO) を含む) を 5 ml 加え 35°C, 30 min 間反応させた。反応停止には、30%酢酸溶液を用いた。反応の結果生じた p-ニトロアニリン (p-NA) を分光分析 (410 nm) で定量し、酵素活性の基準とした。なお、ゲル包括パパインの調製時の包括酵素量は、洗浄液の酵素活性を総使用量の活性を比較し算出した。

マーキュリーパパインの調製 前報⁶⁾に示した Kimmel ら⁷⁾の方法を一部改変して行なった。すなわち、パパイン 5 g を 0.02 M L-シスチン塩酸塩、0.008 M EDTA-2Na を 1:1 の割合で含む活性化剤 30 ml 中に溶解し、15 min 間、35°C で活性化する。この溶液を 0.1 N 塩酸で pH 5.5 に調製した後、0.12 M 塩化第 2 水銀水溶液を酵素がわずかに白濁するまで、1 滴ずつ加える。これを数分間室温で攪拌した後、透析膜中に入れ、20 l の純水で 1 昼夜透析することによって、過剰の添加物を除去する。得られたマーキュリーパパイン溶液を 3,000 r pm. 15 min 間遠心分離しその上澄液を緩衝液で 100 ml に定容し、4°C 冷蔵庫内で密封保存した。

実験結果と考察

重合素材の影響 活性化した Native パパイんに、ゲル重合素材である A. A. モノマーを 5~20 mg 加え 35°C, 30 min 間常法に従って反応を行なった。その結果を図 1. に示す。A. A. モノマーの添加量が増加するに伴い Native パパインの活性は低下した。この結果は、宮本ら⁸⁾の実験結果と良く一致するもので、A. A. モノマーによって、パパインの活性中心である SH 基が変化したものと考えられる⁹⁾。この結果から、A. A. ゲル包括パパインを得る場合、各々の重合素材を調製後、酵素液を添加し、A. A. モノマーとの接触時間を、できるだけ短くすることが望ましいと考えられる。この他、重合素材として用いた MBA. は 10mg/ml 添加しても、残存活性は 99.2% であり、同様の値を、DMAPN, $K_2S_2O_8$ も示し、これらは Native パパイんにほとんど影響を与えないことがわかった。

アクリルアミドモノマーに対する保護物質の影響 前述の通り、A. A. モノマーは、Native パパインの活性中心である SH 基に対し著しく悪影響をおよぼすことがわかった。そこで、SH 酵素の阻害剤である Hg^{2+} を用いて、パパインの活性中心 SH 基を保護した状態で A. A. モノマーの影響をしらべた。酵素溶液 1 ml に A. A. モノマー溶液 (50mg/ml) 1 ml を加え、これを 35°C にて所定時間放置後、常法により活性測定を行なった。放置時間 0 min の場合の活性を 100 とした時の比活性を図 2 に示す。これよりマーキュリー

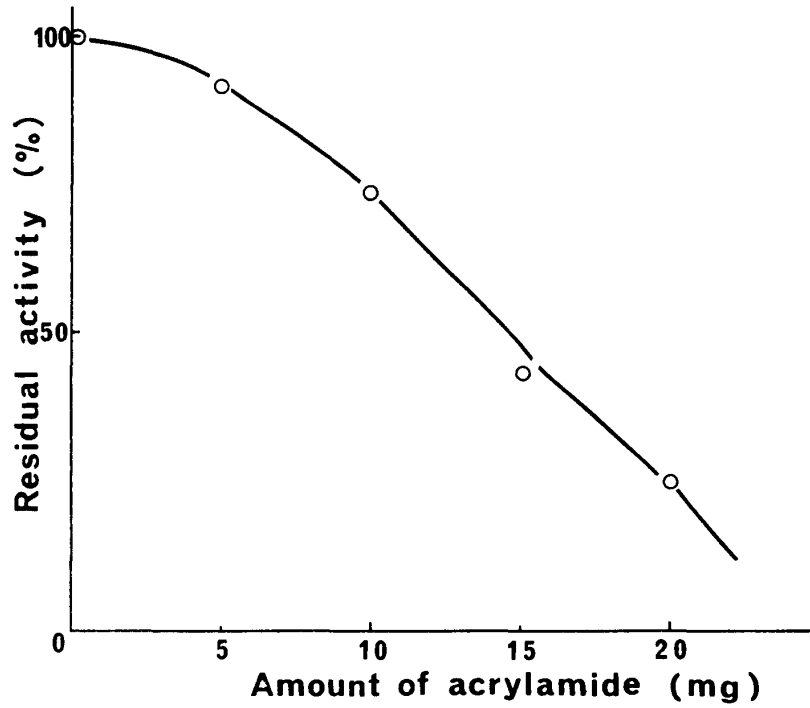


Fig. 1. Effect of concentration of acrylamide monomer on residual enzyme activity.

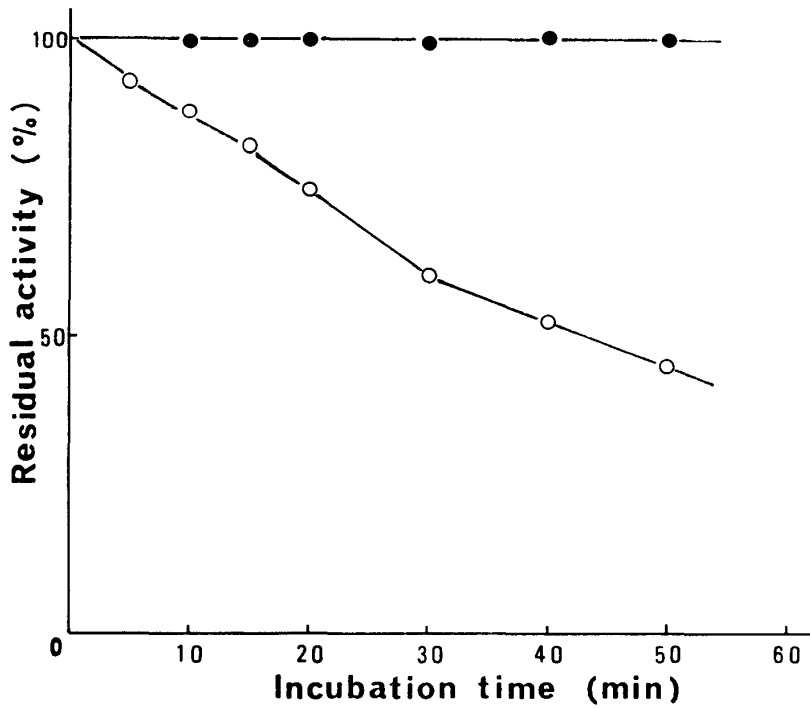


Fig. 2. Effect of contact time with acrylamide monomer on relative enzyme activity. The activity of contact time 0 minute of assay is taken as 100%.
 —○— : native papain, —●— : mercury papain.
 amount of acrylamide monomer; 50mg.

化したパパインは、ほぼ完全に A. A. モノマーから保護されていることがわかるが、Native パパインは時間の経過に伴って変性失活を受けており、A. A. モノマーの影響が大

きいとともにマーキュリー化の効果の著しいことがわかった。この他、水銀以外の保護物質について、 γ -線照射によるパパインの A. A. 固定¹⁾の際、ある程度の効果を示した各種アミノ酸は、A. A. モノマーに対しては、それ程大きな効果は認められなかった。

パパインのゲル包括 モノマー (A. A.) の濃度およびモノマー (A. A.) と MBA との混合割合、そして重合方法などによって共重合ポリマーの形態と、これに基く性質が変化し包括されるパパインの量も決まる。これは、ラジカル重合により A. A. の鎖状の高分子が形成され、MBA が存在すれば分子間架橋剤として作用し、さらに両モノマーが重付加反応¹⁰⁾ を起こすことも考えられるなど、複雑な重合反応が進む結果、わずかな反応条件の相違が、ゲルの強度およびゲル格子の大きさに影響を与え、パパインの包括量に差異を生じるものと考えられる。今回、モノマー濃度 5~30%、Bis 比 (AA/MBA) 5~30 の条件でゲル包括した場合のゲルの性状および、比活性をしらべた結果、取扱い容易さ、活性の高さからモノマー濃度 15%、Bis 比 (AA/MBA) 15 のものが良いものと考えられ、この比率でゲル担体を調製した。しかし本報告の最終結果考察でも示すように、脱離の点でなお問題があり、更に詳細にわたり検討する必要がある。

この重合の結果得られたゲル包括パパイン約 10 g に対し蒸溜水 50 ml を加え 30 min、35°C でインキュベートしたのち、汙過を行ない汙液中に脱離する酵素および未反応モノマーを測定したところ、いずれの場合も洗浄 3 回で完全にそれらが除去されることがわかった。以後包括ゲルは、まず 50 ml の蒸溜水で 3 回洗浄した後、減圧乾燥してゲル包括パパイン標品とした。なお、Native パパイン、マーキュリーパパインの活性による見掛け上の酵素脱離率は、各々 48%、55% を示した。この場合、とくにホモジナイズによる酵素脱離が大部分を占めている。

A. A. ゲルによる p-NA への影響 既報⁵⁾ で示したように光架橋性樹脂 (ポリエチレングリコールジメタアクリレート) の活性発現におよぼす影響は著しいものであった。そこで A. A. ゲルが、酵素活性生成物である p-NA の生成に影響を与えるものか、どうかについて検討した。すなわち、固定化乾燥ゲルを所定量とり、緩衝液 13 ml、1 mM 又は 10 mM の p-NA 3 ml を加え 35°C、40 min 間インキュベートした後 30% 酢酸溶液を 1 ml 加え、その汙液を 410 nm で、O. D を測定した。その結果を図 3 に示す通り、汙液中と樹脂中の p-NA 濃度は同じではなく、ゲル量の増加につれ汙液中の p-NA 量が減少している。しかし光架橋性樹脂の場合の様な二次曲線的減少ではなく、直線的に徐々に減少している。この傾向は、p-NA の濃度およびゲルの乾湿状態には無関係に、ゲル量により一定となっており、乾燥ゲル 50 mg で 5%、100 mg で 10% の減少を示した。この現象は吸着によるものと考えられるが、この結果からは、単にそれだけが原因ではなく、他にも拡散、粒子面積なども影響しているものと思われる。生成 p-NA 量の算出には、この減少率を考慮し測定値に加算した。

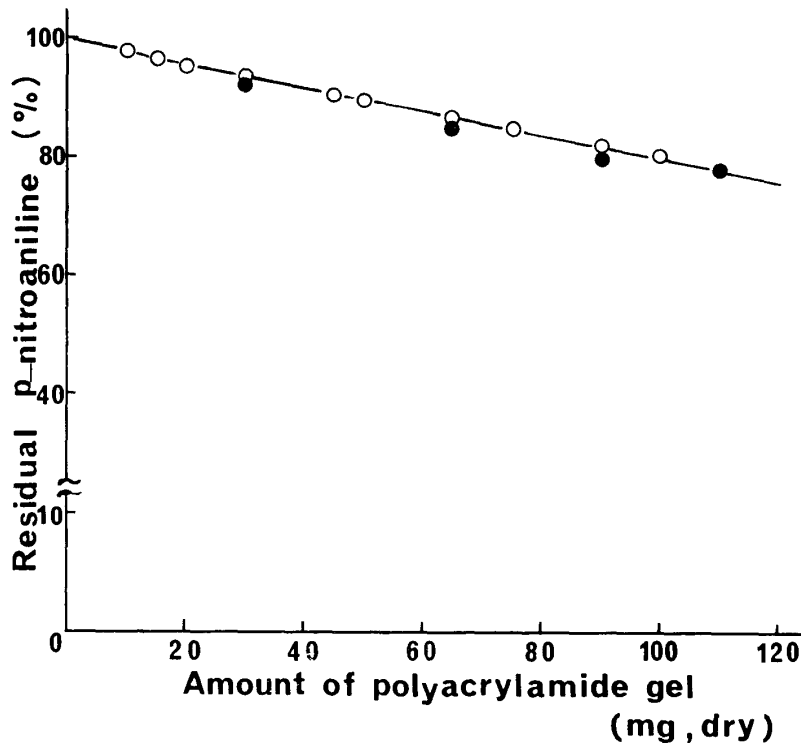


Fig. 3. Effect of amount of polyacrylamide gel on concentration of p-nitroaniline, in filtrate.

—●—: 1 mM p-nitroaniline, —○—: 10 mM p-nitroaniline.

ゲル包括パパインの性質 まずゲル包括パパインの反応条件を決めるために、ゲル包括パパインの量と酵素活性の関係、および反応時間について検討したところ、図4、図5に示したような結果が得られた。これより、ゲル包括パパイン量は60 mg（乾燥物、含有粗酵素6.6 mg）までは直線関係が成り立ち、また50 mgを用いて反応させた時は、80 min位までは生成物量は、時間に比例していることがわかった。そこでゲル量50 mg（乾重）、反応初速度は30 minの反応で決定した。なおこの反応での同酵素量でのNativeパパインに対するゲル包括マーキュリーパパイン（以後EMPと略す）、ゲル包括Nativeパパイン（以後ENPと略す）の比活性は各々24~25%、7.3~8.0%の活性を示した。この場合も、マーキュリー化の効果は著しく、未処理のままでゲル包括したものより約3倍活性が高い固定化物が得られた。図6は、固定化物およびNativeパパインの活性とpHの関係を示したものである。これより、最適pHはNativeパパイン、ゲル包括パパインともに、6.5付近にあり、その移動はみられず他の酵素の包括例^{3) 11)}とよく一致する。酵素活性におよぼす反応温度および熱安定性について検討した結果を図7および図8に示した。反応温度依存性はNativeパパイン、ゲル包括パパインともほとんど同じ傾向を示し、最適温度はともに70°Cであった。また高温側での固定化酵素活性の低下はNativeパパインと比較してゆるやかなものとなっており90°Cにおいてもなお24%の比活性を保持していた。

つぎに熱安定性を検討するにあたり、酵素をあらかじめ0.1 Mリン酸緩衝液（pH 6.8）中で30 min間、所定の温度に保ったのち、冷却して各々の酵素活性を測定した。その結

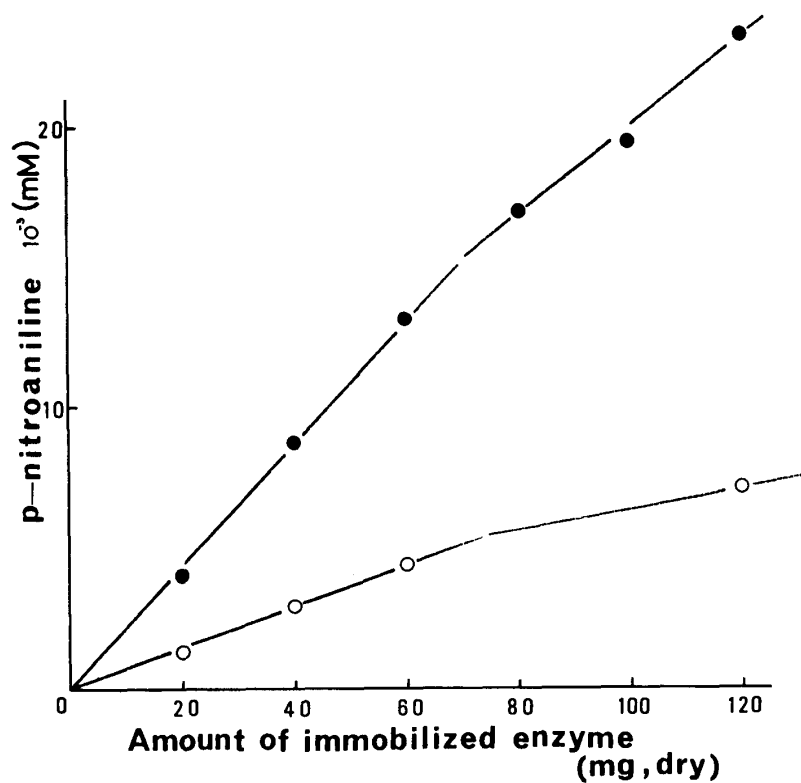


Fig. 4. Effect of gel entrapped enzyme on reaction rate.

—○—: gel entrapped native papain,
 —●—: gel entrapped mercury papain.

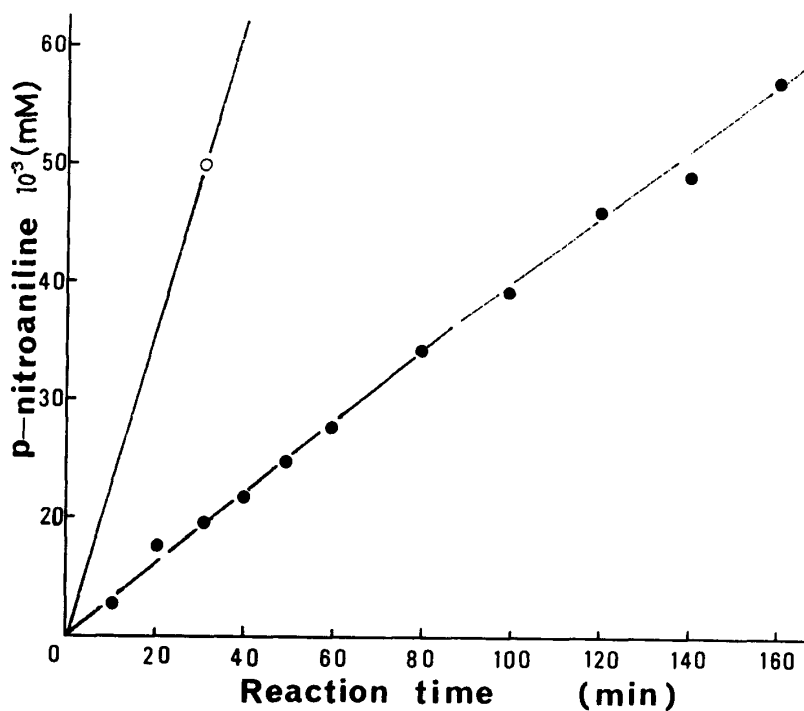


Fig. 5. Effect of incubation time on reaction rate.

—○—: native papain,
 —●—: gel entrapped mercury papain,

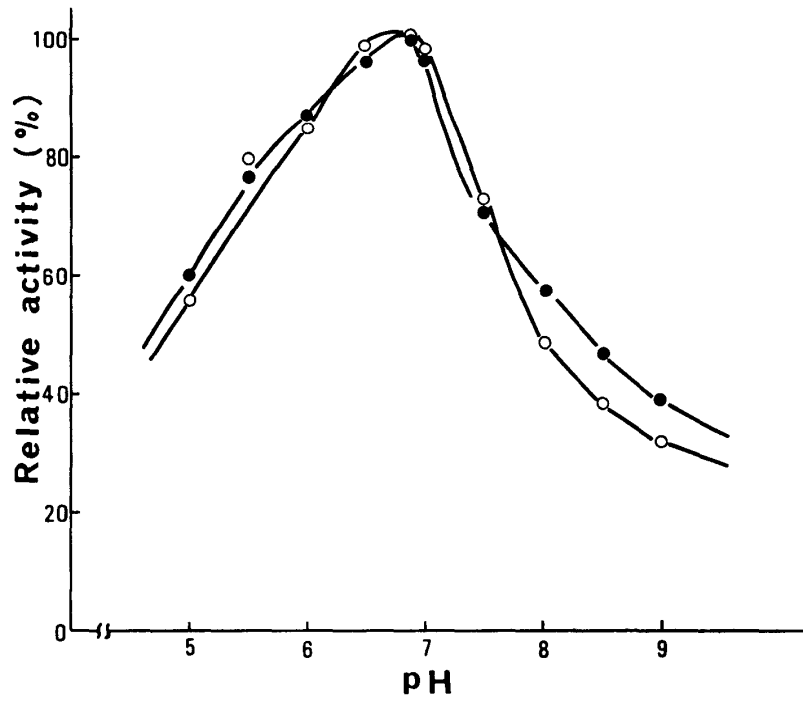


Fig. 6. pH-activity curve.
 —○— : native papain,
 —●— : gel entrapped mercury papain.

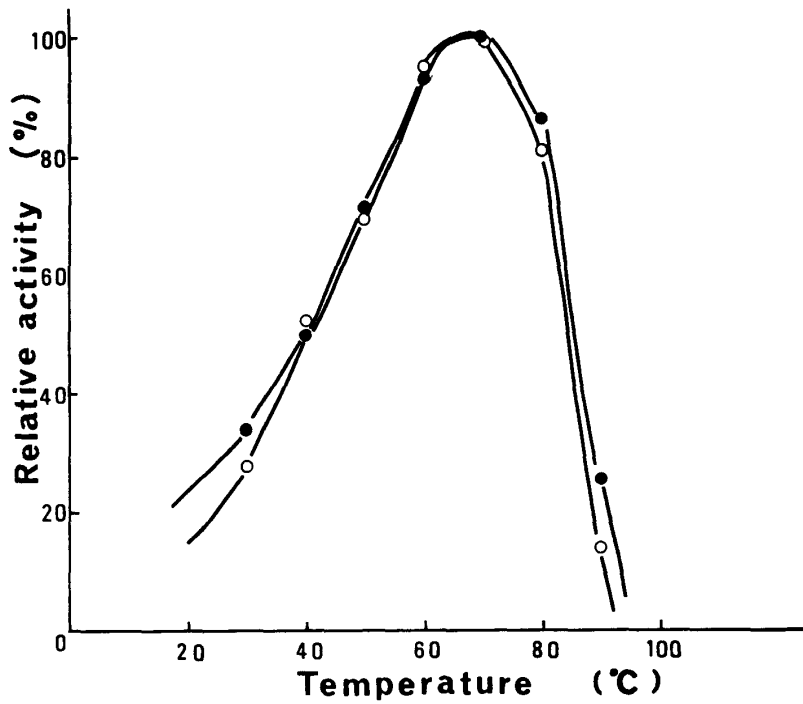


Fig. 7. Temperature-activity curve.
 —○— : native papain,
 —●— : gel entrapped mercury papain.

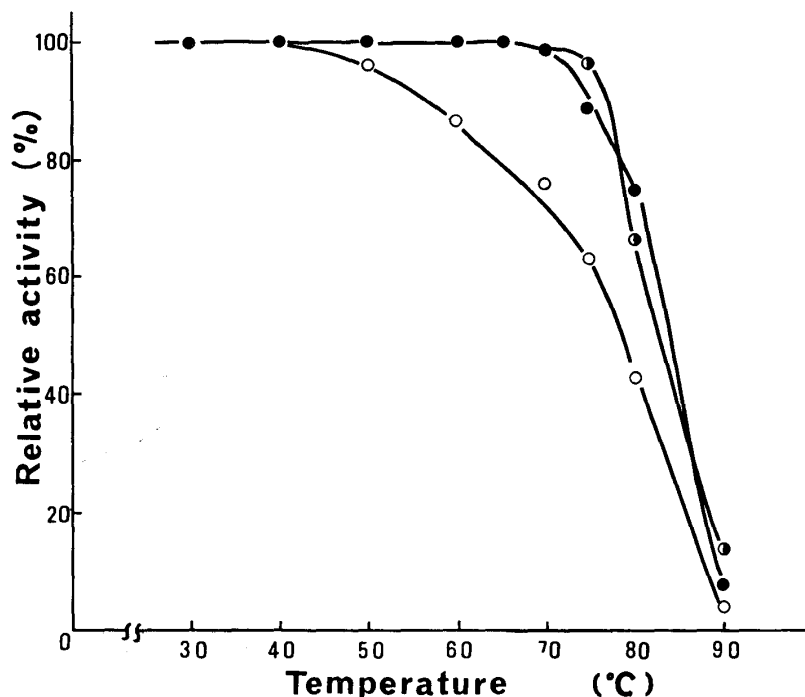


Fig. 8. Thermal stability of papain activity.
 —○—: native papain, —●—: mercury papain,
 —●—: gel entrapped mercury papain.

果、ゲル包括マーキュリーパパインは、Native パパインに比らば高温側での安定性が増している。しかし図より、ゲル包括による安定化とともにマーキュリー化による活性基の保護が安定性の増大に寄与していることが推察される。

固定化酵素の最も大きな利用法の1つに、酵素の繰り返し反復使用への応用が挙げられる。本実験では、つぎのようにして、連続反応を行なった。すなわち、ゲル包括マーキュリーパパインおよびNative パパインを直接ゲル包括して調製したものの乾燥物を各300mg用い、ガラス濾過器(15 AG 3)中で反応を行なった。反応に際し、あらかじめ緩衝液で温潤状態にした固定化物に、2mlの活性化剤を加え20min酵素反応を行ない、30%酢酸1mlを入れた試験管中に手早く吸引濾過し、その反応液を410nmで測定した。その後包括ゲルは5mlのpH 6.8リン酸緩衝液で3回洗浄し、再び同様な条件で30回反応を繰り返した。結果は、図9に示した通りであるが、IMPの活性は、5回目までに第1回目の活性の60%程度まで低下し、その後は徐々に低下して、30回目では約45%の活性を示した。

ENPは、比較のためにEMP第1回目の活性を100としてその活性を示したが、ENPの場合ENP程の初発活性低下は見られず比較的安定していて、活性の低下もゆるやかである。しかし共に或程度安定した活性を示す(10回目近辺)辺りでのEMPとENPの比活性はEMPが約1.7倍の活性高であった。この1~3回の反応での急激な酵素の活性低下の主原因として、使用した活性化剤の影響による酵素の脱離が考えられた。そこでEMP、

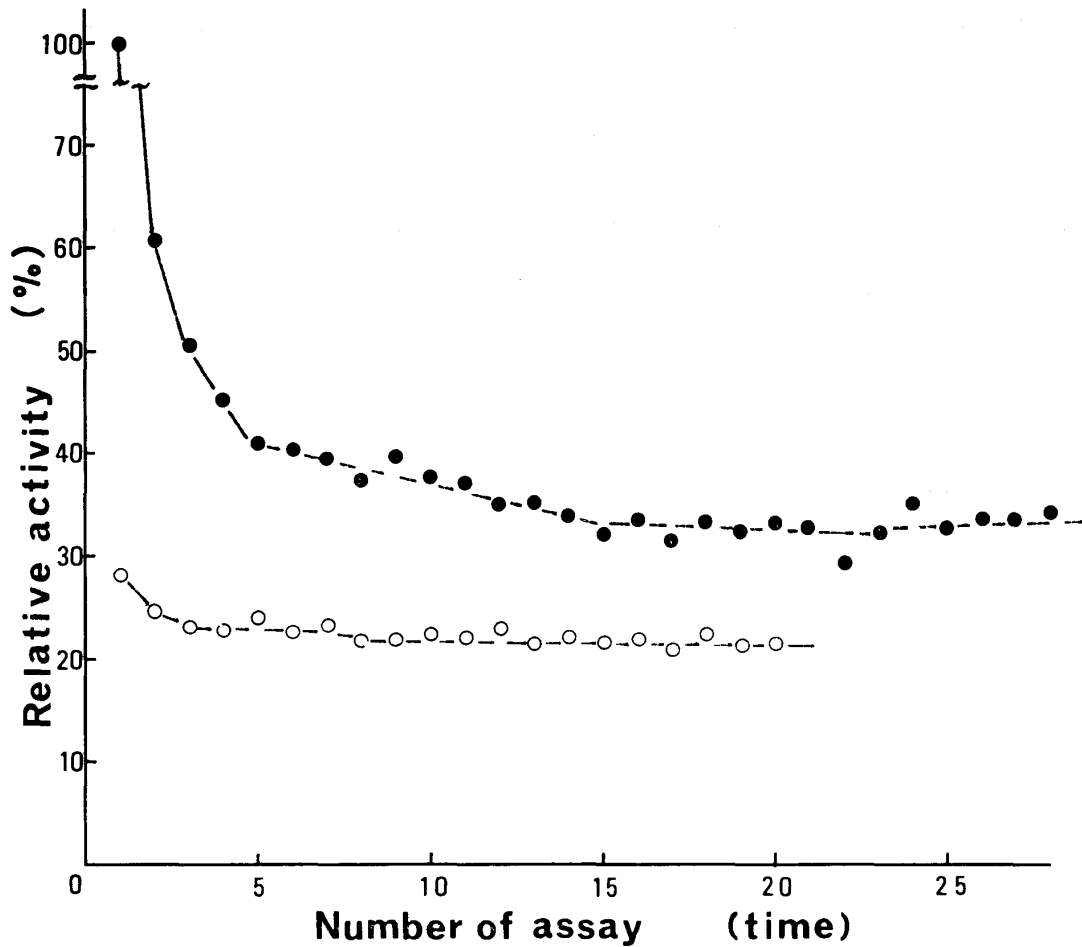


Fig. 9. Repeated use of gel entrapped papain. The activity of first assay of gel entrapped mercury papain is taken as 100%.
 —○—: gel entrapped native papain, —●—: gel entrapped mercury papain.

ENP の活性化溶液の酵素活性を測定することにより酵素脱離について検討した。

その結果を表 1 に示す。EMP は 1 回目、2 回目の活性化剤添加によりその溶液の中に 33.5% と著しい酵素の脱離が認められるが、4 回目では、ほとんど認められなくなる。これに対し、ENP は、1 回目から、わずかな量であった。実際には、酵素反応液中にも活

Table 1. Effect of activating agents on release of papain from entrapped gel.

Activation No.	Relative activity (%)	
	EMP	ENP
1	20.5	2.0
2	13.0	1.5
3	2.0	0.5
4	0.5	0.1

The first activity of repeated use of gel entrapped papain is taken as 100%.

性化剤が混在するため、酵素反応時にも、或程度酵素が脱離することも考えられる。以上の結果より、EMP からの酵素の脱離が、初期の活性化処理により著しいことが認められたが、この理由としては、つぎのことが推察される。EMP と ENP でのアクリルアミドの網目構造が違うこと。EMP の場合パパインの包括が十分に行なわれていないことが挙げられる。すなわち、パパインは、塩化第 2 水銀によるマーキュリー化により P-S-Hg-S-P (P; パパイン, S; 活性基イオウ, Hg; 2 価水銀) の構造をとると考えられている⁶⁾。このような形でゲル中に包括されていたマーキュリーパパインを活性化させるとき、それまで、パパイン 2 分子の大きさの網目としてかろうじてアクリルアミドゲル格子中に包括されていたものが、活性化処理により 2 分子パパインの間にあった Hg^{2+} が除去されることによって 1 分子ずつ (半分の大きさ) の構造になる。そのため網目から抜け出してしまうものがある、と考えられる。

またもう 1 つの原因として、酵素が 2 分子とも完全に包括されず、一方のみが格子内へ、もう一方が格子外へはみ出している場合、活性化剤により 2 分子をつなぎ止めている Hg^{2+} がはずされる。外部にあるパパインは当然ゲル格子から離れ固定化担体から脱離してしまうものと考えられる。このような脱離を除くためには、Sanner ら¹²⁾ によって報告されているパパインの活性阻害剤であり、パパインと 2 量体を形成することなく -SH 活性基を保護しうる p-クロルマーキュリー安息香酸 (PCMB) によるマーキュリー化や、1 価金属による修飾を検討するとともに樹脂の網目構造の改善の必要がある。また川嶋ら¹³⁾ のインベルターゼその他の酵素の場合と比較して、筆者らのパパインにおける固定化時の活性値が低くなったのは、パパインの分子量が小さく、洗浄時にゲル格子中から脱離したこと、重合中に、活性中心以外でパパイン蛋白質が変性したこと、ゲルを構成する半透膜による酵素活性部位への基質の拡散、ならびに生成物の拡散の抑制などが考えられる。また包括酵素量は、固定化ゲルの洗浄液の残存活性より算出しており、そのため重合反応中に変性失活した液中の酵素も包括酵素量として計上されている。その結果、真の活性発現率は、測定された値よりも高いものと考えられる。いずれにせよ、パパインのような SH 基を活性中心とする酵素をアクリルアミドのような重合試薬で固定化する場合、あらかじめ水銀剤などの保護試薬による修飾が不可欠であると考えられた。

要 約

ポリアクリルアミド及びアクリルアミド共重合物によるパパインのゲル包括とその性質を検討した。Native パパインは重合素材、とくにアクリルアミドモノマーにより著しい失活を示したがこの点はパパインの活性基 (-SH) を水銀剤を用いて保護することにより、ほぼ完全にその活性を保つことができた。水銀で保護した固定化酵素の見掛上の活性は、Native パパイン活性の約 24% (3 回連続反応後 15.6%) となり、未処理のまま固定化した場合の活性、7.3% (同 3 回反応後 7.0%) よりも高活性値を示した。固定化による最

適 pH, 最適温度には変化はないが, いずれもその安定性は幾分向上した. ゲル包括マーキュリーパパインは 35°C, 20 min 間の反応を30回繰返すと, 最初の活性の30%の活性を示した. その際, 3 回目の反応までの活性低下が著しく, 50~55%の低下があった. これに対し, ゲル包括 Native パパインの場合, その初活性はゲル包括マーキュリーパパインの活性の28%程度しかないものの, その後の低下は小さく, マーキュリー化により脱離が増大する結果となった, しかし最終的には, ゲル包括マーキュリーパパインの活性は, ゲル包括 Native パパインの活性の1.7倍を保持していた.

本研究を行なうにあたり, 御指導, 御鞭撻を賜りました早稲田大学理工学部, 宇佐美昭次教授に厚くお礼申し上げます.

文 献

- 1) 河邊誠一郎: 食品照射, 15, 24 (1980).
- 2) Brown, H. D., Patel, A. B., Chattopadhyay, S. K.: *J. Chromato.*: **35**, 103 (1968).
- 3) 宇佐美昭次, 倉都祥行: 醸工, **51**, 789 (1973).
- 4) 河邊誠一郎: 岡山理科大学紀要, **15**, 51 (1979).
- 5) 河邊誠一郎: 岡山理科大学紀要, **16**, 117 (1980).
- 6) 河邊誠一郎: 岡山理科大学紀要, **14**, 97 (1978).
- 7) Kimmel, J. R., Smith, E. L.: *J. Biol. Chem.*, **207**, 515 (1954).
- 8) Miyamoto, K., Ohyabu, M., Oka, M., Miura, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 63 (1977).
- 9) Cavins, J. F., Fri, M.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 3357 (1968).
- 10) 村橋, 他: 合成高分子 IV, 78, 朝倉
- 11) Bernfeld, P., Bieber, R. E.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**, 587 (1969).
- 12) Sanner, T., Pihl, A.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 165 (1963).
- 13) Kawashima, K., Umeda, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 1151 (1976).

Immobilization of Papain by the Use of Polyacrylamide

Seiichiro KAWABE* and Yotaro KAWABE**

**Department of Fundamental Natural Science, Okayama
University of Science. Ridai-cho 1-1, Okayama 700, Japan*

***Department of Applied Chemistry, Okayama University of
Science. Ridai-cho 1-1, Okayama 700, Japan*

(Received September 25, 1981)

Papain was immobilized in crosslinked polyacrylamide gel by entrapment.

The method is based on the polymerization of acrylamide in the presence of varying amount of N, N'-methylene bisacrylamide, 3-dimethyl aminopropionitrile and potassium persulfate as crosslinking monomer, polymerization accelerator and initiator, in an aqueous medium containing the dissolved papain.

It appeared that the only acrylamide as polymerization monomer decreased the activity of papain. Then, to protect papain against the denaturing agent, mercury chloride was used for protective agent. The papain activity was completely protected by this modified its active site (sulfhydryl radical: $-SH$) with mercury.

The apparent enzyme activity of acrylamide-gel entrapped mercury papain was about 24% (15.6% after three batch reactions) as compared with native papain activity. On the other hand, the activity of gel entrapped untreated papain was only 7.3% (7.0% after three batch reactions). The enzyme characteristics of gel entrapped papain was compared with that of native papain.

Temperature and pH optima were not affected by the immobilization.

The remaining activity of gel entrapped mercury papain showed about 32% of the original activity after 30 batch reactions at 35 °C for 20 min. In these reactions, it was found that only 45~50% of the original activity was retained until three batch reactions. Whereas the original activity of the gel entrapped untreated papain was retained only 28% of the gel entrapped mercury papain activity. However, about 70% of the original activity was still left, after 20 batch reactions at 35 °C for 20 min.

However immobilization of mercury papain resulted in a greater amount of elimination, at the end of the batch reaction, the activity of the gel entrapped mercury papain showed 1.7 times that of the gel entrapped untreated papain.