

豚小腸粘膜のペプチダーゼに関する研究

第3報 可溶性アミノペプチダーゼの精製と性質

長谷川喜斐*・児玉 治・赤塚尹巳

Studies on Hog Small Intestinal Mucosa Peptidases III. Purification and some properties of soluble aminopeptidase

YOSHII HASEGAWA, OSAMU KODAMA and
TADAMI AKATSUKA

緒 言

小腸粘膜のペプチダーゼは、膜結合酵素として存在する場合と細胞質の可溶性区分に存在するサイトゾル酵素として存在する場合の2種類の存在様式をとり、それぞれ異なる機能を有すると考えられており、それぞれのペプチダーゼの諸性質を明らかにすることは、小腸粘膜におけるペプチド類の消化・吸収を明らかにする上で重要な課題である。

前報²⁾において豚小腸粘膜の可溶性アリアルミダーゼの精製および性質について報告した。最近著者らは同じ豚小腸粘膜の可溶性区分にアリアルミダーゼ活性を全く示さず、アミノペプチダーゼ活性のみ示す酵素を見出した。本報では、このアミノペプチダーゼの単離精製ならびに若干の性質について検討した結果について報告する。

実 験 方 法

1. 試料

屠殺直後の豚小腸粘膜を用いた。

2. 試薬

ロイシル-p-ニトロアニリドおよびリジル-p-ニトロアニリドは Merck, アラニル-p-ニトロアニリド, グルタミル-p-ニトロアニリド, ロイシル-グリシンおよびロイシル-グリシル-グリシンは蛋白質研究奨励会, N- α -ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリドは BDH, グリシル-グリシンは東京化成ならびにアラニル-グリシンは Sigma Chemical Company より購入した。上記以外のすべてのロイシルペプチドは混合酸無水物法により合成した。³⁾

3. 粗酵素液の調製

胃の末端部より約50cmの部分を取り切り開いて内容物を除去した後、内壁を氷冷水を用いて軽く洗いガラス板を用いて小腸粘膜をはぎとりピーカーに集めて、これに約3倍量の冷 $\frac{1}{15}$ Mリン酸緩衝液(pH7.0)を加えガラス棒を用いて攪拌しながら1時間抽出を行い抽出後三枚重ねのガーゼで濾過する。次にこの濾液を3,000×g, 10分間遠心分離し、上澄液を10,000×g, 10分間遠心分離し得られた沈殿物を $\frac{1}{15}$ Mリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁後、再び10,000×g, 10分間遠心分離を行い2回の10,000×gの遠心分離で生じた上澄液を合わせさらに105,000×g, 60分間遠心分離し上澄液を粗酵素液として使用した。

* 福島県立会津短期大学

4. 酵素活性の測定

(i) ペプチドを基質にした場合

試験管に $\frac{1}{15}$ M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1ml および酵素液 $10\mu\text{l}$ を加え 40°C 、5分間放置後、10mM のロイシル-グリシン溶液 $20\mu\text{l}$ を加え酵素反応を開始し一定時間反応させた後、2ml のニンヒドリン溶液を加え 100°C 、10分間加熱後水冷し 5ml の50%アセトンを加え、575nm の吸光度を測定した。1分間に $1\mu\text{mole}$ のアミノ酸 (グリシン) を遊離する酵素量を1単位とした。

なお、ニンヒドリン溶液の調整法は次のごとくである。すなわち 0.3M クエン酸緩衝液 (pH 5.2) とメチルセロソルブを等容量含む液にニンヒドリンを1%になるように加え、使用直前に必要量のニンヒドリン混合液に塩化スズ粉末を約0.1%になるように加えた。

(ii) アミノ酸-p-ニトロアニリドを基質にした場合

試験管に $\frac{1}{15}$ M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1.6ml および酵素液 0.4ml を加え 40°C 、5分間放置後、0.6mM のロイシル-p-ニトロアニリド溶液 0.4ml を加え酵素反応を開始し一定時間反応させた後、反応混液の405nmの吸光度を測定した。405nmにおけるp-ニトロアニリンのモル吸光係数を $8,800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ として、⁴⁾ 1分間に $1\mu\text{mole}$ のp-ニトロアニリンを遊離する酵素量を1単位とした。

5. 蛋白濃度の測定

牛血清アルブミンを標準物質として、Lowry法⁵⁾により測定した。

6. ゲル濾過法による分子量の推定

Andrewsの方法⁶⁾に従って行った。すなわち各種標準蛋白質5mgを0.15M NaClを含む $\frac{1}{15}$ M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2mlに溶解し、同緩衝液で平衡化したSephadex G-200のカラム (2×50cm) にかき、12ml/hrの流速で溶出し、3.6mlずつ採取した。標準蛋白質としては、ウレアーゼ (分子量480,000, ナタマメ, 長瀬産業), カタラーゼ (分子量240,000, 牛肝臓, Sigma Chemical Company), アルコールデヒドロギナーゼ (分子量150,000,

酵母, Boehringer Mannheim) およびアルカリホスファターゼ (分子量115,000, 牛小腸, Miles Laboratories Ltd.) を用いた。ウレアーゼ活性は Vanslyke らの方法⁷⁾ カタラーゼ活性は Beers らの方法⁸⁾、アルコールデヒドロギナーゼは Vallee らの方法⁹⁾ およびアルカリホスファターゼ活性は Garen らの方法¹⁰⁾ により測定しそれぞれの¹⁾ 出量を求めた。

実験結果

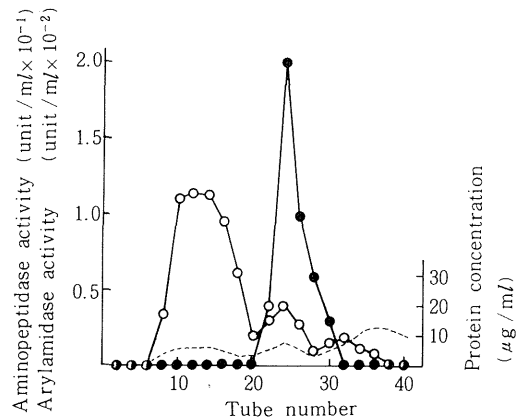


Fig. 1. DEAE-Cellulose Column Chromatography of Aminopeptidase.

The fraction from the Sephadex G-200 column was applied to a DEAE-cellulose column (1.8×20cm) equilibrated with $1/15$ M phosphate buffer (pH 7.0). The column was washed with the same buffer and developed in a linear gradient from 400 ml of the same buffer in the mixture, and 400 ml of the same buffer containing 0.5 M NaCl in the reservoir. The flow rate was 32 ml per hour and fraction of 9.8 ml were collected. Aminopeptidase activity for Leu-Gly was assayed by ninhydrin method and arylamidase activity for Leu-p-nitroanilide was assayed by spectrophotometric method in the presence of 1mM 2-mercaptoethanol. ○—○, aminopeptidase activity; ●—●, arylamidase activity; -----, protein concentration.

Table 1. Purification of Aminopeptidase from the Soluble Fraction of Hog Small Intestinal Mucosa

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)
105,000 x g, supernatant fraction	1822.5	750.0	0.41	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ fraction (60~80%)	292.5	351.0	1.20	47
Sephadex G-200 chromatography	102.3	171.6	1.68	23
DEAE-cellulose chromatography	2.0	34.6	17.30	5

1. 可溶性アミノペプチダーゼの精製

粗酵素液の硫酸分画を行い、60~80% 飽和区分を $\frac{1}{15}$ M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、これを硫酸分画酵素液とした。この酵素液をあらかじめ $\frac{1}{15}$ M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Sephadex G-200 カラム (2.2×60cm) を用いてゲル濾過を行いアミノペプチダーゼ活性区分を集めた。次にこの区分をあらかじめ $\frac{1}{15}$ M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE-セルロースカラム (1.8×20cm) に吸着させた。吸着したアミノペプチダーゼは同緩衝液中の食塩濃度を 0~0.5M の範囲で直線的に上昇させて溶出させた。DEAE-セルロースの溶出パターンを Fig. 1 に示したように最初にアミノペプチダーゼの溶出が認められ次いでアシルアミダーゼが溶出した。この DEAE-セルロースのアミノペプチダーゼ溶出区分を用いて以下の実験に使用した。各精製過程における比活性、活性収率等を Table 1 にまとめた。本酵素の収率は 5% で約 42 倍に精製された。

2. 分子量の測定

分子量既知の標準蛋白質とともに、最終酵素標品をゲル濾過した結果を Fig. 2 に示した。これより本酵素の分子量は約 170,000 と推定された。

3. 至適 pH

酵素活性におよぼす pH の影響を見た結果を Fig. 3 にまとめた。活性発現の至適 pH は、8.0 付近であった。

4. 至適温度

酵素反応におよぼす温度の影響を pH 7.0, 30 分の反応で見た結果を Fig. 4 に示す。活性発現の至適温度は 40℃ 付近に認められた。

5. 各種金属イオンの影響

次に酵素活性におよぼす金属イオンの影響を pH 7.0 で各金属塩化物とともに、10 分間室温で pre-incubation を行ったのちに 40℃, 30 分間の酵素反応で調べた。その結果を Table 2 に示すように、本酵素活性は、0.1mM の金属イオン濃度において、Zn²⁺, Mg²⁺ および Mn²⁺ によってほとんど影響を受けず、Hg²⁺, Ca²⁺ および K⁺ により著しい活性の阻害が認められた。Co²⁺ により 25% の活性化を示した。一方 1mM の濃度では、Zn²⁺ により 44% の活性が阻害され、Mn²⁺ により 38% の活性増加が認められた。

6. 各種試薬の影響

各種試薬の酵素活性におよぼす影響について、金属イオンの場合と同様な方法で測定しその結果を Table 3 に示した。金属キレート試薬である EDTA および オーフエナントロリンにより強く阻害を受け、SH 試薬である

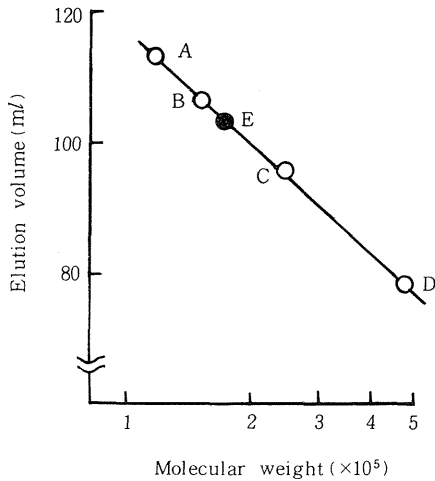


Fig. 2. Estimation of Molecular Weight by Gel Filtration on Sephadex G-200.

A: alkaline phosphatase, B: alcohol dehydrogenase, C: catalase, D: urease, E: soluble aminopeptidase from hog small intestinal mucosa. See "Materials and Methods" for the experimental details.

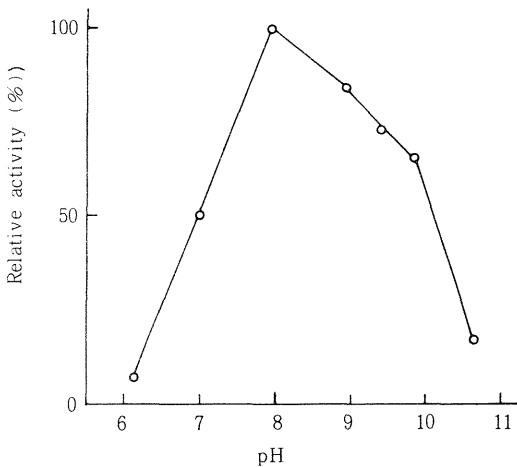


Fig. 3. Effect of pH on the Activity of Aminopeptidase.

The activity was assayed with Leu-Gly as a substrate at various pH values at 40°C for 30 min. The activity assayed at pH 8.0 was expressed at 100%. Buffers used were 1/15 M KH_2PO_4 - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ buffer (pH 6.3 ~ 8.9) and 1/15 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -NaOH buffer (pH 9.4 ~ 10.7).

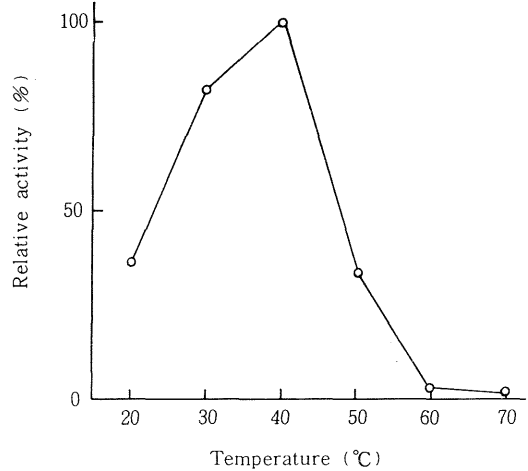


Fig. 4. Effect of Temperature on the Activity of Aminopeptidase.

The activity was assayed with Leu-Gly as a substrate at various temperature for 30 min in 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0). The activity assayed under the standard condition (at 40°C) was expressed as 100%.

PCMB および NEM によっても著しい阻害を受けた。有機リン剤である DFP によっては阻害を受けなかったが、ハロゲン化スルホニルである PMSF により著しい阻害が認められた。

次に本酵素は EDTA により著しく活性の阻害を受けるため、金属イオンの添加による EDTA 処理酵素の活性の回復について検討した (Table 4)。その結果、1 mM の Co^{2+} または Zn^{2+} の添加により活性は完全に回復した。本酵素はまた透析により約 60% の活性が失活するが、Table 5 に示すように 1 mM の Co^{2+} の添加により活性の回復が認められた。

7. 基質特異性

各種ペプチドに対する基質特異性について検討した (Table 6)。その結果ロイシル-チロシン、ロイシル-ロイシンおよびロイシル-システインを良く水解したが、ロイシル-アスパルギン酸、プロリル-グリシンおよびグリシル-グリシンの水解は認められなかった。ジペプ

Table 2. Effect of Various Metal Ions on the Activity of Aminopeptidase

Metal Ions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None		100
CoCl ₂	0.1	125
	1	125
ZnCl ₂	0.1	98
	1	56
MgCl ₂	0.1	104
	1	91
MnCl ₂	0.1	96
	1	138
HgCl ₂	0.1	5
	1	0
KCl	0.1	9
	1	4
CaCl ₂	0.1	2
	1	13

Mixtures of the aminopeptidase and indicated metal ions were preincubated for 10 min at room temperature. After incubation, each activity for Leu-Gly (0.2 mM) was assayed by ninhydrin method and compared with a control.

Table 4. Reactivation of EDTA-Inactivated Aminopeptidase by Several Metal Ions

Metal added	Extent of reactivation (%)
CoCl ₂	103
MgCl ₂	6
MnCl ₂	37
ZnCl ₂	99
CaCl ₂	0

The native enzyme was incubated with 0.1 mM EDTA at room temperature. After 10 minutes, several metal salt (1mM) were added to the incubation mixture. Ten minutes later, the enzyme activity for Leu-Gly was assayed by ninhydrin method.

Table 3. Effect of Various Reagents on the Activity of Aminopeptidase

Reagents	Remaining activity (%)
None (control)	100
Ethylene diamine tetraacetate (EDTA)	0
<i>o</i> -Phenanthroline	0
<i>p</i> -Chloromercuribenzoic acid (PCMB)	0
<i>N</i> -Ethylmaleimide (NEM)	20
2-Mercaptoethanol	110
Diisopropylphospho fluoridate (DFP)	101
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	0
<i>N</i> -Tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone (TPCK)	98
<i>N</i> -Tosyl-L-lysine chloromethylketone (TLCK)	66
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	91

Mixtures of the aminopeptidase and indicated reagents at concentration of 1mM were preincubated for 10 min at room temperature. After incubation, each activity for Leu-Gly (0.2 mM) was assayed by ninhydrin method and compared with control.

イシルーグリシルーグリシンの水解を比較すると、ジペプチドであるロイシルーグリシンを良く水解した。

p-ニトロアニリドの誘導体に対するアミノペプチダーゼの水解の有無を検討しその結果を Table 7 に示した。本酵素は全くアリルアミダーゼ活性を示さず、またプロティナーゼの合成基質であるベンゾイルアルギニン-*p*-ニトロアニリドも水解しなかった。

考 察

アミノペプチダーゼには、ペプチドを水解するペプチダーゼ活性およびアミノ酸の *p*-ニトロアニリドを水解

Table 5. Reactivation of Dialysis-Amino-peptidase by Several Metal Ions

Metal added	Extent of reactivation (%)
CoCl ₂	98
MgCl ₂	9
MnCl ₂	8

The native aminopeptidase solution was dialysis at 4°C for 14 hr. After then, several metal salt solutions (1 mM) were added to the incubation mixture. Ten minutes later, the enzyme activity for Leu-Gly was assayed by ninhydrin method.

Table 6. Action of the Aminopeptidase on Various Peptides

Substrate	Relative activity (%)
Leu-Gly	100
Leu-Tyr	253
Leu-Phe	161
Leu-Cys	194
Leu-Ala	92
Leu-Asp	0
Leu-Ser	105
Leu-Leu	247
Leu-Val	133
Leu-His	86
Leu-Glu	77
Gly-Leu	88
Gly-Gly	0
Pro-Gly	0
Met-Gly	137
Ala-Gly	63
Leu-Gly-Gly	21

The final substrate concentration was 0.2 mM. Enzyme activity was assayed by ninhydrin method. Relative activity was calculated with activity against Leu-Gly taken as 100.

するアリルアミダーゼ活性のいずれの活性も示す場合と、

Table 7. Action of the Aminopeptidase on Several Amino Acid-*p*-nitroanilides

Substrate	Activity
Leu- <i>p</i> -nitroanilide	0
Ala- <i>p</i> -nitroanilide	0
Lys- <i>p</i> -nitroanilide	0
Glu- <i>p</i> -nitroanilide	0
Benzoyl-arg- <i>p</i> -nitroanilide	0

The final substrate concentration was 0.1 mM. Enzyme activity was assayed by spectrophotometric method.

ペプチダーゼ活性のみ示しアリルアミダーゼ活性を示さない場合の2種類存在する。本酵素はペプチダーゼ活性のみ示し、アリルアミダーゼ活性を示さず前報²⁾において報告した豚小腸粘膜の可溶性アリルアミダーゼとは明らかに異なる酵素である。

¹¹⁾ Nóren らは豚小腸粘膜の可溶性区分よりロイシル-*p*-ニトロアニリドを水解せずアリルアミダーゼ活性を示さないペプチダーゼの精製を報告している。このアミノペプチダーゼはロイシル-チロシンよりもグリシル-ロイシンを良く水解する点で、著者らの見出したアミノペプチダーゼとは異なる基質特異性を示したが、基質特異性以外の諸性質は報告されていないので、本酵素が著者らの見出した酵素と同一であるか否かは明らかでない。

¹²⁾ Manjusri らは猿小腸粘膜の可溶性区分よりペプチダーゼの精製を行なった。本酵素の分子量はゲル濾過法の結果 103,000 と推定され、グリシル-ロイシンを良く水解し、EDTA および PCMB により阻害を受け、0.1mM の Zn²⁺ により 35% の活性化が認められた。著者らの見出したアミノペプチダーゼは Co²⁺ および Mn²⁺ により活性化を受けるが、Zn²⁺ による活性化は認められない。¹³⁾ Smith らは豚小腸粘膜のロイシニアミノペプチダーゼが Mn²⁺ および Co²⁺ により活性化することを報告している。

Donlon¹⁴⁾ はモルモット小腸粘膜可溶性アミノペプチダーゼの性質について報告している。本酵素の分子量は300,000, PCMBおよびDFPにより阻害を受けず, Mn^{2+} により活性化を受ける。またロイシル-*p*-ニトロアニリドを水解しない。

本報で報告したアミノペプチダーゼはEDTAおよびオフェナントロリンにより著しく阻害を受け、阻害後 Co^{2+} または Zn^{2+} の添加により活性が回復し、また透析により活性が60%失活するが Co^{2+} の添加により活性が回復することから、本酵素は金属酵素の一種と考えられる。

PMSFはセリン酵素の活性部位であるセリン残基に対して反応性が高く、しばしばDFPのかわりにプロテアーゼ阻害剤として使用されているが、本酵素はDFPによる阻害を受けず、PMSFにより著しい阻害を受ける事は興味深い。PMSFはプロテイナーゼの一種であるパバインのSH基と反応し不活性化させるが、DFPはパバインと反応するけれども、その活性は失われなことが見出された^{15), 16)}。小腸粘膜のアミノペプチダーゼはSH試薬により強い阻害を受けることから、PMSFはパバインの例に見られたようにSH基と反応して不活性化したと推測される。

膜結合性のペプチダーゼは、3個以上6個までのアミノ酸残基を持つペプチドを容易に加水分解すると言われており、ロイシル-グリシンよりロイシル-グリル-グリシンを良く水解するが、本酵素は上記2つのペプチドを基質にした場合、ジペプチドであるロイシル-グリシンを良く水解し膜結合酵素と異なる基質特異性を示した。

最近の研究¹⁷⁾により小腸内の蛋白質消化物の大半は依然としてペプチド態で、そのうちの低分子ペプチドは遊離アミノ酸とともに効率よく吸収される事が明らかにされてきており、本酵素は小腸粘膜におけるペプチド類の最終的な分解に関与し、ペプチドの消化・吸収に重要な役割を果たしていると思われる。

要 約

可溶性アミノペプチダーゼを豚小腸粘膜より抽出し、硫酸分画、Sephadex G-200ゲルクロマトグラフィーおよびDEAE-セルロースクロマトグラフィーにより精製した。本酵素の分子量はゲル濾過法により約17万と推定され、至適温度は40°C、至適pHは8.0であった。

本酵素は1mMの Co^{2+} および Mn^{2+} により活性化が認められ、金属キレート試薬およびSH試薬により強い阻害を受けた。EDTAにより阻害を受けた本酵素は、 Co^{2+} または Zn^{2+} の添加により活性は完全に回復した。

本酵素はロイシル-チロシン、ロイシル-ロイシンおよびロイシル-システインを良く水解したが、アミノ酸の *p*-ニトロアニリドを全く水解せず、アリアルアミダーゼ活性は認められなかった。

文 献

- 1) Kim, Y. S., W. Bitwhistle and Y. W. Kim: J. Clin. Invest. **51**, 1419 (1972)
- 2) 長谷川喜斐・児玉治・赤塚尹巳: 茨大農学術報告, **25**, 61 (1977)
- 3) 赤塚尹巳: 茨大農学術報告, **20**, 25 (1972)
- 4) Erlanger, B. F., N. Kakowsky and W. Cohen: Arch. Biochem. Biophys. **95**, 271 (1961)
- 5) Lowry, O. H., N. J. Rosedrough, A. L. Farr and R. J. Randall: J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951)
- 6) Andrews, P: Biochem. J. **91**, 222 (1964)
- 7) Vanslyke, D. D and R. M. Archibald: J. Biol. Chem. **154**, 623 (1944)
- 8) Beers, R. F. Jr and I. W. Sizer: *ibid.* **195**, 133 (1952)
- 9) Vallee, B. L and F. L. Hoch: Proc. Natl. Acad. Sci. **41**, 327 (1955)
- 10) Garen, A and C. Levinthal: Biochim. Biophys.

- Acta, **38**, 470 (1960)
- 11) Nören, O., H. Sjöström and L. Josefsson :
 ibid, **327**, 446 (1973)
- 12) Manjusri, D and A. N. Radhakrishnan :
 Biochem. J. **128**, 463 (1972)
- 13) Smith, E. L : J. Biol. Chem. **176**, 9 (1948)
- 14) Donlon, J and P. F. Fottrell : Biochim.
 Biophys. Acta, **327**, 425 (1973)
- 15) Whitaker, J. R and J. Perez-Villasenor :
 Arch. Biochem. Biophys. **124**, 70 (1968)
- 16) Murachi, T : Biochim. Biophys. Acta, **71**, 239
 (1963)
- 17) Matthews, D. M : Gastroenterology, **73**, 1267
 (1977)

Summary

From the buffer-extract of hog small intestinal mucosa, a soluble aminopeptidase was partially purified by ammonium sulfate precipitation, gel filtration on Sephadex G-200 and column chromatography on DEAE-cellulose.

The molecular weight of the enzyme was estimated to be about 170,000 by gel filtration method. The maximum activity of the enzyme was obtained at pH8.0 and 40°C. The enzyme was activated about 1.3-fold by 1mM Co²⁺ or Mn²⁺ and the activity was strongly inhibited by the addition of the metal-chelating reagents and SH reagents. The activity of enzyme which had been inactivated with EDTA could be restored almost completely by the addition of Co²⁺ or Zn²⁺. Among the dipeptides tested, Leu-Tyr, Leu-Leu and Leu-Cys were hydrolyzed most rapidly. No activity of the enzyme was found against various amino acid-*p*-nitroanilides.