

# 豚小腸粘膜のペプチダーゼに関する研究

## 第2報 可溶性アシルアミ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 II. Purification and some properties of soluble arylamidase

YOSHII HASEGAWA, OSAMU KODAMA and TADAMI AKATSUKA

#### 緒 言

著者らは前報<sup>1)</sup>において豚小腸粘膜の可溶性区分に2種のアシルアミダーゼを認め、そのうち活性の強い分子量約130,000のアシルアミダーゼは2-メルカプトエタノールにより活性化を受けEDTAにより阻害される事を報告した。

このアシルアミダーゼの性質を明らかにするため、ゲル濾過やDEAE-セルロース等の方法により精製を行なった結果、ほぼディスク電気泳動的に均一な酵素標品を得る事が出来た。本酵素は活性発現にSH還元試薬を必要とし、又 $\text{Co}^{2+}$ 添加により約50%活性が増大し、ジペプチダーゼ活性およびトリペプチダーゼ活性をも認められたので、これらの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

Sephadex G-200はPharmacia Fine Chemical Co., およびDEAE-セルロースはBrown Co., より購入した。ロイシル-p-ニトロアニリドおよびリジルー-p-ニトロアニリドはMerck, アラニル-p-

トロアニリド, アルギニル-p-ニトロアニリド, グルタミル-p-ニトロアニリド, アスパーテル-p-ニトロアニリド, グリシル-プロリル-ロイシル-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- $\alpha$ -ベンゾイル-DL-アルギニル-p-ニトロアニリドはBDH Chemicals LTD, ならびにアラニル-グリシンはSigma Chemical Companyより購入した。

##### 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ビ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(pH 7.0)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1,000×g, 10分間遠心分離し、上澄液を10,000×g, 10分間遠心分離を行い得られた沈殿物を $\frac{1}{15}$ Mリン酸緩衝液に懸濁後、再び10,000×g, 10分間遠心を行い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, 120分間遠心分離し上澄液を粗酵素液として使用した。

##### 4. 酵素活性の測定

(i) アミノ酸-p-ニトロアニリドを基質にした場合前報の報告に従った。すなわち試験管に $6 \times 10^{-4}$ Mのロイシル-p-ニトロアニリド溶液0.4 mlおよび $\frac{1}{15}$ Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 1.6 mlを加え40°C 5分間放置

\* 福島県立会津短期大学

後、基質緩衝液に酵素液 0.4 ml を加え酵素反応を開始し一定時間後、405 nm における *p*-ニトロアニリンのモル吸光係数を  $8,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ <sup>2)</sup> として反応混液の 405 nm の吸光度を比色定量した。酵素液 1 ml 当り 1 分間に 1  $\mu$  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。

(ii) ペプチドを基質にした場合

試験管に 10 mM のアラニル-グリシン溶液 20  $\mu$  l および  $\frac{1}{15}$  M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 ml を加え 40°C 5 分間放置後、基質緩衝液に酵素液 10  $\mu$  l を加え酵素反応を開始し一定時間反応させた後、2 ml のニンヒドリン溶液を加え、100°C 10 分間加熱後水冷し 5 ml の 50% アセトンを加え、575 nm の吸光度を測定した。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 0.3 M 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。

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<sup>3)</sup>により測定した。

6. ディスク電気泳動

7.5% のアクリルアミドゲルを使用し電極緩衝液は 0.1 M トリシューボ酸緩衝液 (pH 8.3) を用いた。なおゲル調整液および電極緩衝液には  $1 \times 10^{-3}$  M の 2-メルカプトエタノールを含んでいる。方法としては濃縮用ゲルおよび試料用ゲルを省き、蔗糖を加えて 40% 蔗糖溶液

(w/v) とした試料を 2 本の分離用ゲルの上に静かに乗せチューブ (6×60 mm) 1 本当り 2 mA の定電流で 1 時間 30 分泳動を行い、そのうち 1 本は泳動後ゲルを 2.5 mm の長さにカミソリを用いて切りゲル切片をそれぞれ試験管に入れ基質緩衝液を加え、40°C 12 時間反応させゲル中のアリルアミダーゼ活性を測定した。もう 1 本のゲルは amido black 10B で染色した。

実験結果

1. 可溶性アリルアミダーゼの精製

粗酵素液の硫酸分画を行い、60~80% 飽和区分を 6 ml の  $\frac{1}{15}$  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。上記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 (2×50 cm) を用いてゲル透過し、溶出量が約 113 ml のアリルアミダーゼ活性区分を集めた。次のこの溶出区分をあらかじめ  $\frac{1}{15}$  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 (1.7×30 cm) に吸着させた。吸着したアリルアミダーゼは同緩衝液中の食塩濃度を 0~0.5 M の範囲で直線的に上昇させて溶出した。Fig. 1 に示すように蛋白およびアリルアミダーゼ活性の溶出ピークは一致した。また、各精製過程における活性収率、比活性等を Table I にまとめた。収率は 10% で約 125 倍に精製された。

最終酵素標品について行なったディスク電気泳動の結果を Fig. 2 に示した。蛋白のメインバンドと活性のピークは一致しているが、1~2 本のサブバンドが認められ

Table I. Purification of Arylamidase from the Soluble Fraction of Hog Small Intestinal Mucosa

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit/mg)	Recovery
105,000 × g, supernatant fraction	967.5	11.220	0.0115	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fraction (60~80%)	185.8	6.732	0.0362	60
Sephadex G-200 chromatography	66.6	7.028	0.1055	63
DEAE-cellulose chromatography	0.8	1.163	1.436	10

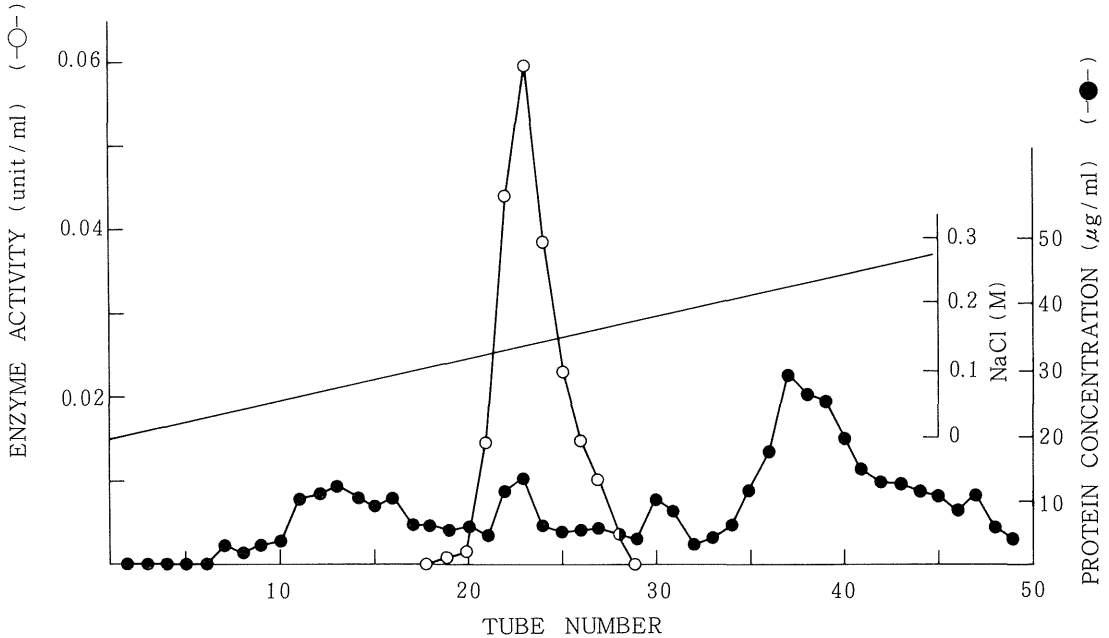


Fig. 1. DEAE-Cellulose Column Chromatography of Arylamidase.

The fraction from the Sephadex G-200 column was applied to a DEAE-cellulose column (1.7×30cm) equilibrated with 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0). The column was washed with the same buffer and developed in a linear gradient formed from 400 ml of the same buffer in the mixer, and 400 ml of the same buffer containing 0.5 M NaCl in the reservoir. The flow rate was 32 ml per hour and fractions of 9.8 ml were collected. Enzyme activity was for Leu-*p*-nitroanilide ( $1 \times 10^{-4}$  M) was assayed by spectrophotometric method. —○— enzyme activity; —●— protein concentration

若干の不純蛋白質を含むものと考えられる。

次にこの酵素標品を用いて以下の実験に使用した。

## 2. 各種金属イオンの影響

各種金属イオン ( $1 \times 10^{-4}$  M) のアリルアミダーゼ活性におよぼす影響についてロイシル-*p*-ニトロアニリドを基質とし、 $1 \times 10^{-3}$  M の 2-メルカプトエタノール存在下で pH 7.0, 40°C において測定しその結果を Table II に示した。Zn<sup>2+</sup> および Cd<sup>2+</sup> により強い阻害を受けた。Co<sup>2+</sup> では約 1.5 倍の活性化が認められたが他の金属イオンによっては活性化は認められなかった。

次に Co<sup>2+</sup> の濃度の変化による活性におよぼす影響について検討しその結果を Fig. 3 に示した。 $1 \times 10^{-4}$  M の濃度で最も良く活性化が認められ、 $1 \times 10^{-3}$  M になると約 60% の阻害が認められた。

## 3. 各種試薬の影響

各種試薬の酵素活性に対する影響をロイシル-*p*-ニトロアニリドを基質とし、 $1 \times 10^{-3}$  M の 2-メルカプトエタノール存在下で pH 7.0, 40°C において測定しその結果を Table III に示した。キレート試薬である EDTA および *o*-フェナントロリンにより強く阻害され、界面活性剤 SDS, キモトリプシンの特異的阻害剤である TPCK により強く阻害された。

精製酵素は SH 還元試薬が存在しないと急激な活性の減少が認められ、SH 還元試薬の添加より活性は回復する。そこで、数種の SH 還元試薬による活性におよぼす影響について検討しその結果を Fig. 4 に示した。システインおよびグルタチオンでは  $1 \times 10^{-3}$  M の濃度で最も強く活性化され、 $1 \times 10^{-2}$  M においては活性の減少が認め

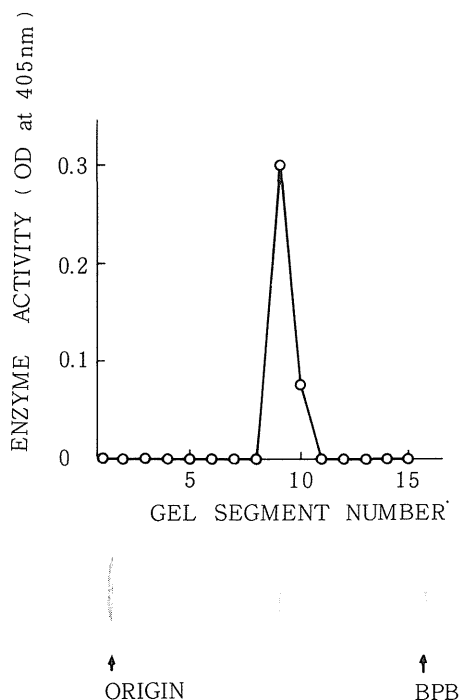


Fig. 2. Acrylamide Gel Electrophoresis of the Final Preparation and Measurement of activity in Eluates from Gel Segments.

Tube number 23 from the DEAE-cellulose was concentrated with the Minicon (B 15) and then the sample was applied on the top of the gel. Electrophoresis was conducted at 2 mA per tube for 1.5 hr. Enzyme activity for Leu-*p*-nitroanilide ( $1 \times 10^{-4} M$ ) was assayed by spectrophotometric method in the presence of 2-mercaptoethanol ( $1 \times 10^{-3} M$ ).

られた。2-メルカプトエタノールによつては  $1 \times 10^{-2} M$  においても活性の減少は認められなかった。

#### 4. 基質特異性

*p*-ニトロアニリドの誘導体に対するアリルアミダーゼの基質特異性を Table 4. に示した。この結果アリルアミダーゼはリジル-*p*-ニトロアニリドを最も良く水解し次いでロイシル-*p*-ニトロアニリド、アラニル-*p*-ニトロアニリド、アルギニル-*p*-ニトロアニリドの順に水解した。酸性アミノ酸であるアスパラギン酸お

Table II. Effect of Several Metal Ions on the Activity of Arylamidase

Metal Ions	Relative activity (%)
None	100
CoCl <sub>2</sub>	166
ZnCl <sub>2</sub>	0
MgCl <sub>2</sub>	95
MnCl <sub>2</sub>	100
CdCl <sub>2</sub>	0
KCl	106
CaCl <sub>2</sub>	102

Mixtures of the arylamidase and indicated metal ions at concentration of  $1 \times 10^{-4} M$  (pH 7.0) were preincubated for 10 min at room temperature. After incubation, each activity for Leu-*p*-nitroanilide ( $1 \times 10^{-4} M$ ) was assayed by spectrophotometric method in the presence of 2-mercaptoethanol ( $1 \times 10^{-3} M$ ) and compared with a control.

Table III. Effect of Several Reagents on the Activity of Arylamidase

Reagents	Remaining activity (%)
None (control)	100
Ethylene diamine tetraacetate (EDTA)	5
<i>o</i> -Phenanthroline	31
Phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF)	100
Carbaryl (Sevin)	90
<i>N</i> -Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK)	9
<i>N</i> -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)	67
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	0

Mixtures of the arylamidase and indicated reagents at concentration of  $1 \times 10^{-4} M$  (pH 7.0) were preincubated for 10 min at room temperature. After incubation, each activity for Leu-*p*-nitroanilide ( $1 \times 10^{-4} M$ ) was assayed by spectrophotometric method in the presence of 2-mercaptoethanol ( $1 \times 10^{-3} M$ ) and compared with a control.

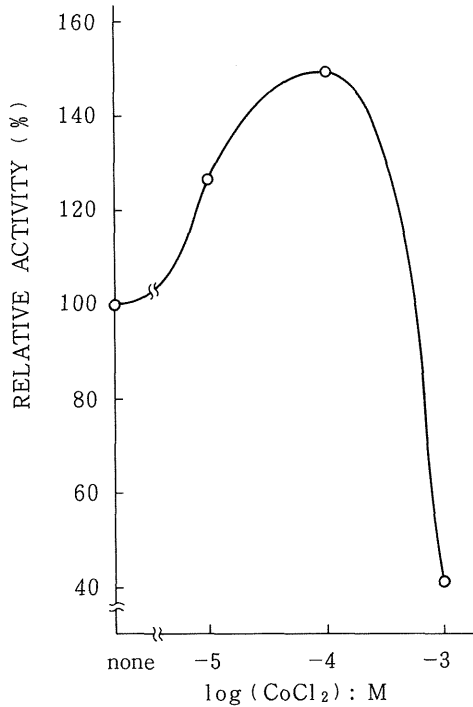


Fig. 3. Stimulation of the Arylamidase by  $\text{Co}^{2+}$ . Mixtures of the arylamidase and varying amounts of  $\text{CoCl}_2$  were preincubated for 10 min at room temperature. After incubation, each activity for Leu-*p*-nitroanilide ( $1 \times 10^{-4}$  M) was assayed by spectrophotometric method in the presence of 2-mercaptoethanol ( $1 \times 10^{-3}$  M).

よびグルタミン酸の *p*-ニトロアニリドはいずれも水解せず、アミノペプチダーゼA様の活性は示さなかった。プロティナーゼの合成基質であるベンゾイルアルギニル-*p*-ニトロアニリドおよびトリペプチドの *p*-ニトロアニリドであるグリシル-プロリル-ロイシル-*p*-ニトロアニリドはいずれも水解しなかった。

次にジペプチダーゼ活性およびトリペプチダーゼ活性の有無をロイシル-グリシン、アラニル-グリシンおよびロイシル-グリル-グリシンを基質として検討した。Table V に示したように豚小腸粘膜の可溶性アリルアミダーゼはジペプチダーゼ活性およびトリペプチダーゼ活性を示した。

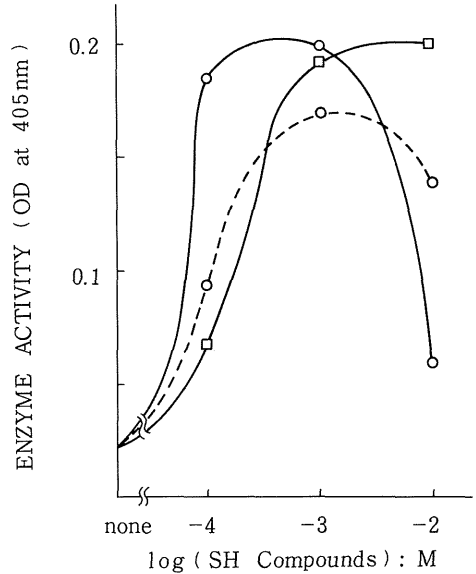


Fig. 4. Stimulation of the Arylamidase by SH Compounds.

Mixtures of the arylamidase and varying amounts of SH compounds were preincubated for 10 min at room temperature. After incubation, each activity for Leu-*p*-nitroanilide ( $1 \times 10^{-4}$  M) was assayed by spectrophotometric method.

—○— cysteine; ···○··· glutathione; —□— 2-mercaptoethanol

## 考 察

著者らは豚小腸粘膜の可溶性区分よりアリルアミダーゼの精製を行った。本酵素は精製後急激な活性の減少が認められるが、SH還元試薬の添加により活性は回復するSH依存性のアリルアミダーゼである。Fig. 4に示した様にシステインおよびグルタチオンによっては  $1 \times 10^{-3}$  M付近において最も強く活性化し、 $1 \times 10^{-2}$  Mにおいては活性の阻害が認められた。一方2-メルカプトエタノールによっては、 $1 \times 10^{-2}$  Mにおいても活性の阻害は全く認められなかった。

ラット表皮に認められるSH依存性のアリルアミダー

Table IV. Action of the Arylamidase on Various Amino Acid-*p*-nitroanilides

Substrate	Relative activity (%)
Leu- <i>p</i> -nitroanilide	100
Ala- <i>p</i> -nitroanilide	75
Arg- <i>p</i> -nitroanilide	53
Lys- <i>p</i> -nitroanilide	139
Glu- <i>p</i> -nitroanilide	0
Asp- <i>p</i> -nitroanilide	0
Gly-Pro-Leu- <i>p</i> -nitroanilide	0
Benzoyl-arg- <i>p</i> -nitroanilide	0

The final substrate concentration was  $1 \times 10^{-4}$  M. Enzyme activity was assayed by spectrophotometric method in the presence of 2-mercaptoethanol ( $1 \times 10^{-3}$  M). Relative activity was calculated with activity against Leu-*p*-nitroanilide taken as 100.

<sup>4)</sup>ゼは、生体成分として存在するシステインおよびグルタチオンによって  $1.5 \times 10^{-3}$  M 付近において活性の極大が認められ、 $2.5 \times 10^{-3}$  M 以上の SH 濃度になると著しく活性を阻害するが、合成化学薬品であるジチオスライトールおよびチオグリコール酸では  $2.5 \times 10^{-3}$  M 以上の濃度でも活性の低下は認められず、豚小腸粘膜の可溶性アリアルミダーゼと類似の傾向が認められ興味深い。しかし、ラット表皮のアリアルミダーゼは EDTA により全く阻害を受けない点で豚小腸粘膜の可溶性アリアルミダーゼと異なる。

Fig. 3 に示した様に豚小腸粘膜の可溶性アリアルミダーゼは  $1 \times 10^{-4}$  M の  $\text{Co}^{2+}$  により約 1.5 倍の活性化が認められたが、他の金属イオンによっては活性化は認められなかった。 $\text{Co}^{2+}$  により活性化するアリアルミダーゼとしては、ラット肝臓のプラズマメンブランに結合しているアリアルミダーゼ<sup>5)</sup> および人肝臓のアリアルミダーゼ<sup>6)</sup> が報告されている。両酵素とも PCMB により阻害を受けず、SH 還元試薬によっては活性化を受けない。

Mäkinen<sup>7)</sup> らは人皮膚のアリアルミダーゼがアラニンおよびメチオニンの  $\beta$ -ナフチルアミドを良く水解し、 $\text{Co}^{2+}$  および SH 還元試薬で活性化する事を報告してい

Table V. Action of the Arylamidase on Several Peptides

Peptide	OD (at 575 nm)
Leu-Gly	0.150
Ala-Gly	0.065
Leu-Gly-Gly	0.470

The final substrate concentration was  $2 \times 10^{-4}$  M. Enzyme activity was assayed by ninhydrin method in the presence of 2-mercaptoethanol ( $1 \times 10^{-3}$  M).

る。 $\text{Co}^{2+}$  により活性化し SH 依存性のアリアルミダーゼの報告は極めて少なく著者らの知る限りでは人皮膚<sup>7)</sup> およびラット表皮<sup>4)</sup> のアリアルミダーゼのみであり、今後  $\text{Co}^{2+}$  により活性化を受ける SH 依存性のアリアルミダーゼの活性中心機構の解明が待たれる。

アミノペプチダーゼにはペプチダーゼ活性およびアリアルミダーゼ活性のいずれも示す酵素とペプチダーゼ活性のみ示しアリアルミダーゼ活性を示さない酵素の2種類存在するが、本酵素はアリアルミダーゼ活性、ジペプチダーゼ活性のいずれをも示しており基質特異性の点から見れば、Maroux<sup>8)</sup> らが報告している豚小腸 Brush border 膜に結合しているアミノペプチダーゼと類似している。

Nören<sup>9)</sup> らは豚小腸粘膜の可溶性区分よりジペプチダーゼの精製を報告している。このジペプチダーゼはロイシル-*p*-ニトロアニリドを水解せずアリアルミダーゼ活性を示さないことから可溶性区分のアリアルミダーゼとは異なる酵素であろう。

著者らは DEAE-セルロースのイオン交換クロマトグラフィーにおいて、アリアルミダーゼ活性を示さないペプチダーゼの存在を確認しておりこのペプチダーゼは Nören<sup>9)</sup> らの報告している可溶性ジペプチダーゼと類似の酵素と考えられ、現在このペプチダーゼの精製を進めている。

## 要 約

1. 可溶性アリアルミダーゼを豚小腸粘膜よりリン酸

緩衝液 ( $\frac{1}{15}$  M, pH 7.0) を用いて抽出し, 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。最終酵素標品は pH 8.3 のポリアクリルアミドディスク電気泳動によりほぼ均一であり比活性は約 125 倍増加した。

2. 本酵素は SH 依存性であり, シスチンおよびグルタチオンにより  $1 \times 10^{-3}$  M の濃度で最も強く活性化したが,  $1 \times 10^{-2}$  M においては活性を強く阻害した。しかし, 2-メルカプトエタノールによっては  $1 \times 10^{-2}$  M においても活性の阻害は全く認められなかった。

3. 本酵素は  $1 \times 10^{-4}$  M の  $\text{Co}^{2+}$  により約 50% 活性化したが, 他の金属イオンでは活性化は認められなかった。

## 文 献

- 1) 長谷川喜斐・児玉治・赤塚尹巳：茨大農学術報告, No. 24, p.127 (1976)
- 2) Erlanger, B. F., N. Kakowsky and W. Cohen : Arch. Biochem. Biophys. **95**, 271 (1961)
- 3) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951)
- 4) 富原靖博・菅原潔・児玉治・大内毅：茨大農学術報告, No. 24, p.103 (1976)
- 5) Emmelot, P and A. Visser : Biochim. Biophys. Acta, **241**, 273 (1971)
- 6) Charles, W. G and F. J. Behal : Biochemistry, **13**, 3227 (1974)
- 7) Mäkinen, P.-L and J. Paekallio : Enzymologia, **36**, 93 (1969)
- 8) Maroux, S., D. Louvard and J. Baratti : Biochim. Biophys. Acta, **321**, 282 (1973)
- 9) Nören, O., Sjostrom and L. Josefsson : Biochim. Biophys. Acta, **327**, 446 (1973)

## Summary

1. From the buffer-extract of hog small intestinal mucosa, a soluble arylamidase was purified by ammonium sulfate precipitation, gel filtration on Sephadex G-200 and column chromatography on DEAE-cellulose. The final preparation was nearly homogeneous in polyacrylamide gel disc electrophoresis at pH 8.3 and was purified about 125-fold.
2. This arylamidase activity depended on the presence of SH compounds. The maximum activity was observed at a concentration of  $1 \times 10^{-3}$  M cysteine or glutathione, and at a concentration of  $1 \times 10^{-2}$  M the thiols, the activity was reduced remarkably. On the other hand, in the presence of  $1 \times 10^{-2}$  M 2-mercaptoethanol, no decrease of the activity was observed.
3. The arylamidase was activated about 1.5-fold by  $1 \times 10^{-4}$  M  $\text{Co}^{2+}$ , but no metal ion, other than  $\text{Co}^{2+}$ , activated the enzyme activity.