

放線菌 *Streptomyces griseus* ATCC 3463 のアルカリプロティナーゼの相互分離と酵素化学的性質について

四十九院成子*・大内 毅・平松 昭

Isolation and Enzymatic Properties of the Alkaline Proteinases from *Streptomyces griseus* ATCC 3463

SHIGEKO TSURUSHIIN, TAKESHI OUCHI and AKIRA HIRAMATSU

緒 言

著者らは前報¹⁾において、放線菌 *Streptomyces griseus* ATCC 3463 の培養液からペプチダーゼ 活性を含まない3種のアルカリプロティナーゼ〔EC 3.4.4. グループ〕を分離し、そのうちの1種すなわち耐熱性プロティナーゼを精製しその酵素化学的性質について報告した。他の2種のアルカリプロティナーゼと同様、DFP^{*}で阻害を受けるセリン酵素であると思われる。

本報では、粗酵素液のエタノール分画沈澱、セフデックスG-100クロマトグラフィー、CM-セルロースクロマトグラフィーによる一連の精製操作によって2種のアルカリプロティナーゼを得、さらに等電点分画法に供した後セフデックスG-100クロマトグラフィーによって均一な標品とし、ダイアフィルターによる濃縮を行い、それぞれ6.2倍及び6.6倍に精製した。そしてその酵素化学的性質について検討し、さらに大内の報告したアルカリプロティナーゼ²⁾との相互比較を行った。その結果これら2種のアルカリプロティナーゼは、大内の報告した酵素が精製法の検討によりさらに2種の酵素に分離されたものと考えられたので報告する。

実 験 方 法

1. 酵素原液

放線菌 *Streptomyces griseus* ATCC 3463 の培

養液を連続式冷却遠心機(富永製作所製S-62型)を用いて菌体を除去し、この上澄液を酵素原液とした。

2. プロティナーゼ活性の測定法

萩原の考案したカゼイン-275nm法³⁾に準じた測定法を用いた。すなわち0.01Mホウ酸緩衝液(pH 10.0)を用い、基質濃度を2%として40°Cで30分間消化試験の後、蛋白質沈澱試薬Bで除蛋白して275nmの吸光度を測定した。最適基質濃度は2種のアルカリプロティナーゼによって異なるが、特に記さない限り2%(消化混液中では1%)を使用した。

プロティナーゼの酵素単位は、上記基準条件下で1分間にL-チロシン1μmole相当量の生成物を与える酵素力価とし、unit/mlと略記した。また比活性は酵素蛋白質量で除した値を用い、unit/mgと略記した。

3. 酵素蛋白質量の測定法

酵素蛋白質の定量はLowry法⁴⁾により測定した。標準物質は結晶 egg albumin (2回結晶, Sigma社)を使用した。

3. 等電点分画法

SvensonとVesterberg^{5,6)}の方法に従って行った。Ampholine(40% v/v L.K.B社)はpH範囲3~10のものを使用し、電圧は300Vに維持して行った。

4. ダイアフィルターによる酵素蛋白質の濃縮

上述の精製法によって得た酵素溶液の蛋白質濃度が希薄である場合、あるいは液量を少なくする必要のある場合は、ダイアフィルター(日本真空技術KK, MG-2型, 膜G-10T又はG-05)を用いて濃縮した。

5. 分子量の測定

* お茶の水女子大学食物化学研究施設

* DFP: Diisopropylfluorophosphate の略

セファデックスG-100によるゲルろ過法によって求めた。標準蛋白質として牛血清アルブミン(MW=68,000)、卵アルブミン(MW=45,000)及びチトクロムc(MW=124,000)を用いた。

実験結果

1. アルカリプロティナーゼの相互分離

さきに報告したように放線菌 *Streptomyces griseus* ATCC 3463の培養液には、少なくとも3種のアルカリプロティナーゼが存在することが明らかになった。そのうち1種は著しい耐熱性を有するプロティナーゼであり、その精製法とともに酵素化学的性質を明らかにした。今回はさらにCM-セルロースで溶出された他の2種のアルカリプロティナーゼについて精製を試みた。

CM-セルロースで溶出されたアルカリプロティナーゼI及びII(以下APase I及びAPase IIと略す)を、共存する食塩を透析により脱塩後、等電点法に供

した。この結果、第1図及び第2図に示したようにAPase IはpH 9.6、APase IIはpH 8.3に等電点をもち酵素蛋白質が主成分であることが認められた。両者の主要なピークから ampholine を除きさらに一層の精製を行うためセファデックスG-100を行った(第3図及び第4図参照)。ampholineは245 nmに吸収極大

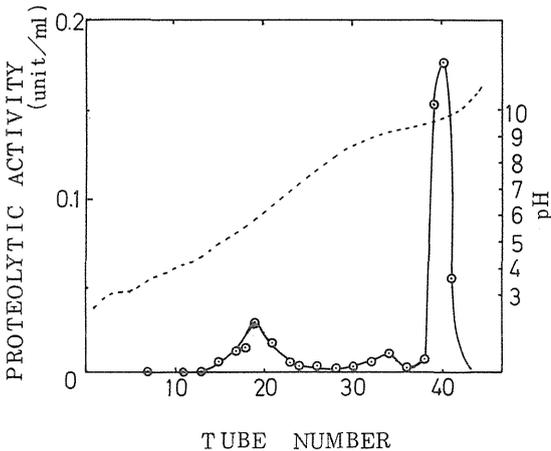


Fig.1. Isoelectric focusing of the alkaline proteinase I.

10.8 μg of the enzyme eluted from CM-cellulose chromatography was used and electrophoresis was carried out at 300V for 20.0 hr and a final current flow of 1.1 mA. pH range of Ampholine was used 3 to 10., pH; -○-, proteolytic activity. Fractions of 2.7 ml were collected.

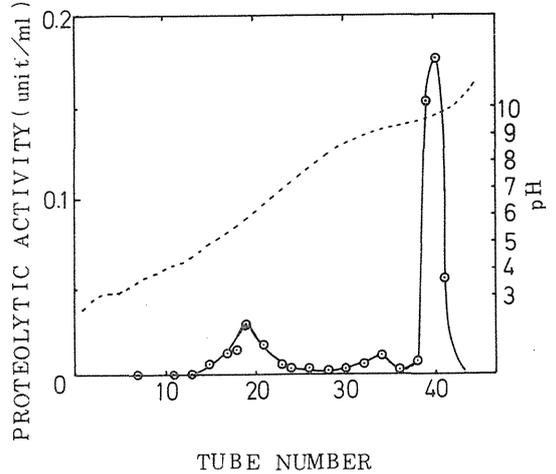


Fig.2. Isoelectric focusing of the alkaline Proteinase II.

190 μg of the enzyme eluted from CM-cellulose chromatography was used and electrophoresis was carried out at 300V for 21 hr and a final current flow of 1.2 mA pH range of Ampholine was used from 3 to 10., pH; -○-, proteolytic activity. Fractions of 2.7 ml were collected.

をもち、かつ Lowry 法による 750 nm の吸収にも高感度であり、酵素活性はそれより前の部分に各々単一のピークとして溶出され、等電点分析的並びにカラムクロマト的に均一であると認められた。この均一な区分をダイアフィルターにより濃縮し、酵素標品とした。

比活性は APase I が 7.8、APase II が 8.3 でそれぞれ 6.2 倍及び 6.6 倍の精製度であった。

精製過程の一覧を第1表に要約して示した。

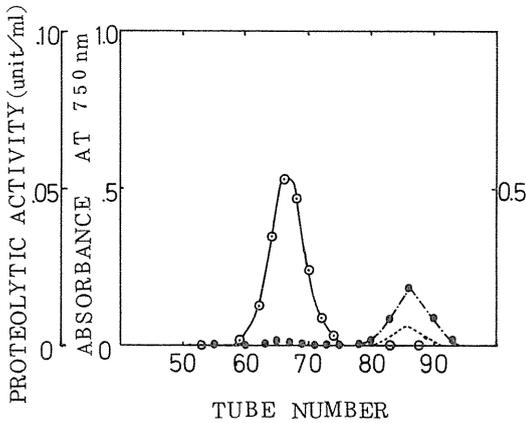


Fig. 3. Separation of the alkaline proteinase I from Ampholine on a column of Sephadex G-100.

5 ml of the enzyme solution which purified by isoelectric focusing was placed on the top of the column (3.0×4.4 cm) of Sephadex G-100 which had been equilibrated with 0.005M Tris-HCl buffer, pH 8.6, containing 0.001M CaCl₂ and 0.2M NaCl. The flow rate was 36 ml per hr and fractions of 3.3 ml were collected. -○-, proteolytic activity; -●-, absorbance at 750 nm; ·····, absorbance at 245 nm.

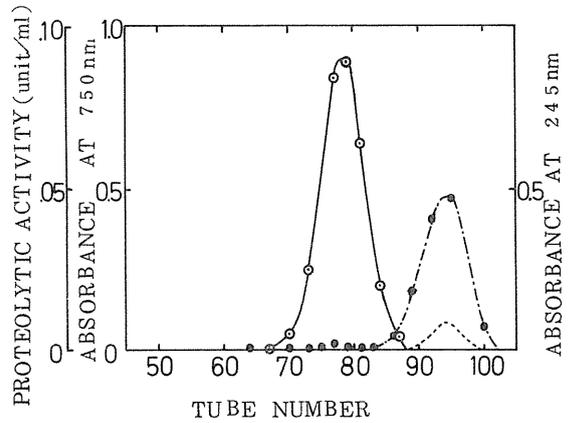


Fig. 4. Separation of the alkaline proteinase II from Ampholine on a column of Sephadex G-100.

5 ml of the enzyme solution which purified by isoelectric focusing was placed on the top of the column (3.0×4.4 cm) of Sephadex G-100. Experimental conditions were the same as those in Fig. 3. -○-, proteolytic activity; -●-, absorbance at 750 nm; ·····, absorbance at 245 nm.

Table I Purification of the Alkaline Proteinase I and II from *Streptomyces griseus* ATCC 3463

Fraction	Total Protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)
Crude enzyme solution	1,050	132	0.126	100
Ethanol precipitation	305	92	0.3	70
Sephadex G-100 chromatography	24	62	2.6	47
CM-Cellulose chromatography				
Alkaline proteinase I	2.1	13.5	6.6	10.2
Alkaline proteinase II	3.4	25.3	7.4	18.3
Isoelectric focusing				
Alkaline proteinase I		6.3		4.8
Alkaline proteinase II		17.5		13.2
Concentration with diafilter				
Alkaline proteinase I	0.32	2.5	7.8	1.9
Alkaline proteinase II	0.97	8.1	8.3	3.3

One unit of the proteolytic activity was defined as the amount of the enzymes that liberates TCA soluble hydrolysate from casein corresponding to one μ mole of L-tyrosine per min per ml of the enzyme solution. Specific activity was expressed in units per mg of the enzyme solution.

2. アルカリプロティナーゼの酵素化学的性質

i 反応時間と反応生成物との関係

2種の精製アルカリプロティナーゼについて、酵素量を一定にして基質濃度1% (消化混液中)、pH 10.0の条件で酵素反応の時間と生成物との関係について検討し第5図に示した。ミルクカゼイン水解においてAPase Iは5時間まで、APase IIは3時間まで反応生成物の量は時間に比例していた。なおこの図においてAPase IはS字型になることが認められた。

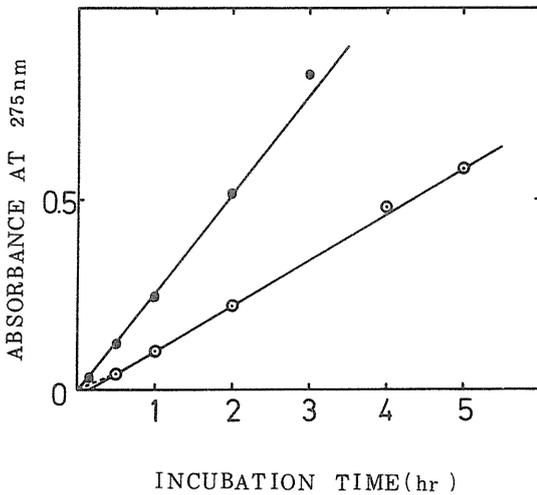


Fig.5. Relationship between reaction products and reaction time.

The reaction mixture contained 1.0 ml of the enzyme solutions (0.89 μ g for APase I and 1.62 μ g for APase II) and 1.0 ml of 1.0% milk casein in 0.01 M borate buffer, pH 1.00. The assay solutions were incubated for various periods. -○-, APase I; -●-, APase II.

ii 最適 pH

0.01 M ホウ酸緩衝液, pH 10.0 の 2% (消化混液中 1%) ミルクカゼインを 3N HCl, 2N NaOH で pH 7~1.3 に調整した基質を使用して最適 pH を測定した。この結果第 6 図に示すように APase I, APase II とともに pH 9.5 で最大活性を示していた。

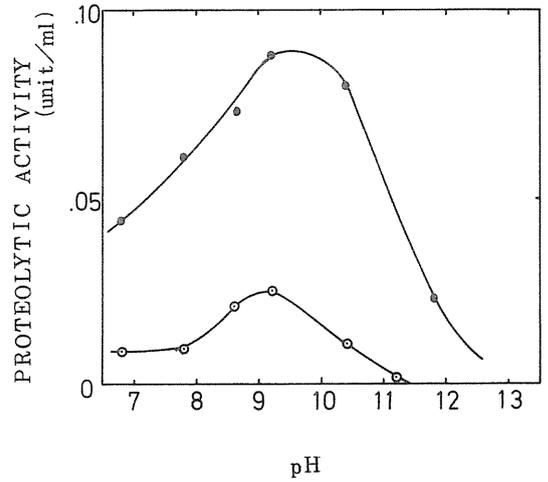


Fig.6. Effect of pH on the activity of the alkaline proteinase I and II.

The reaction mixture contained 1.0 ml of the enzyme solutions (10.7 μ g for APase I and 9.7 μ g for APase II) and 1.0 ml of substrate buffer solution at various pH's. -○-, APase; -●-, APase II.

iii 最適温度

pH 10.0 の 2% (消化混液中 1%) ミルクカゼインを基質として各温度における酵素活性を測定した。この結果第 7 図に示すように APase I は 40℃, APase II は 50℃ にそれぞれ最適温度が認められた。

iv 酵素の安定性と Ca⁺⁺ の影響

2種の精製アルカリプロティナーゼについてその pH, 熱及び凍結保存に対する安定性につき比較検討した。

イ pH 安定性

各酵素液を 0.1N HCl あるいは 0.1N NaOH を用いて所定の pH に調整し室温で 3 時間放置した後, pH 10 に戻して残存酵素活性を測定して各酵素の pH 安定性を検討した。なおこの際 10⁻²M の塩化カルシウムを共存させた場合についても検討した。この結果第 8 図に示したように APase I は pH 5~10, APase II は pH 1.5 及び 11.5 に安定領域が認められた。Ca⁺⁺ の保護作用は、いずれの酵素においても認められ、APase II は APase I よりも安定であった。

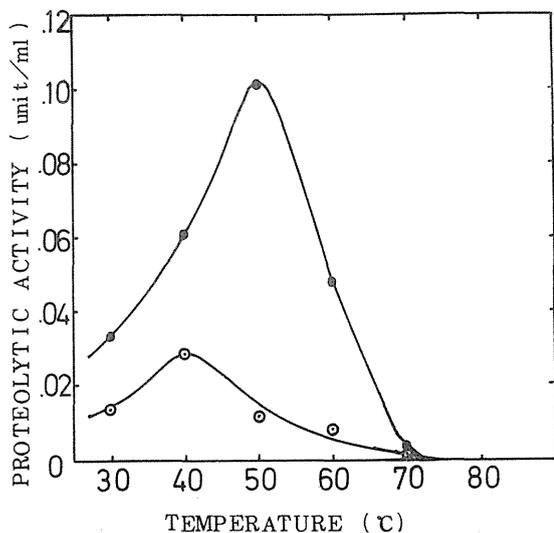


Fig. 7. Effect of temperature on the activity of the alkaline proteinase I and II.

The reaction mixture contained 1.0 ml of enzyme solutions (8.13 μg for APase I and 7.18 μg for APase II) and 1.0 ml of 1.0% milk casein in 0.01M borate buffer pH 10.0. —○—, APase I; —●—, APase II.

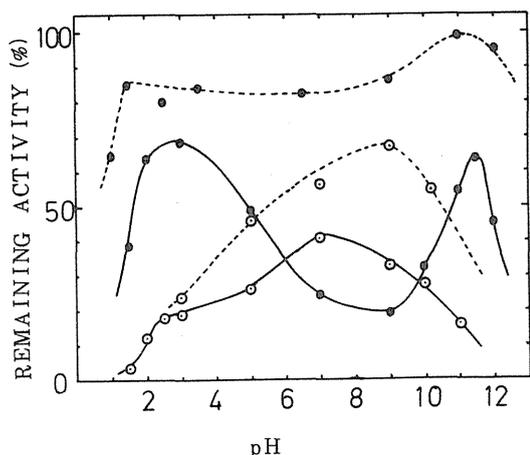


Fig. 8. Effect of pH on the stability of the alkaline proteinase I and II.

The enzyme solutions (5.37 μg for APase I and 6.09 μg for APase II) were preincubated at indicated pH's for 3 hr at 22°C in 1.0 ml of 10^{-4}M (—) and 10^{-2}M (---) CaCl_2 . Remaining activity was measured by the standard conditions as described in the text. ○, APase I; ●, APase II.

□ 熱安定性

各酵素液を10分間各温度に放置後、氷水中で10分間冷却した後、残存酵素活性を測定した。この結果第9図に示したように、APase Iは40°Cまでは安定であるが、40°Cを越えると急速に熱失活し、60°Cでは完全に失活した。

また Ca^{++} の保護作用はほとんど認められなかった。一方APase IIは50°Cまでは安定であるが、70°Cではほとんど失活した。 10^{-2}M の Ca^{++} の存在で熱に対する保護作用が認められ70°Cでも約50%の活性が残存した。

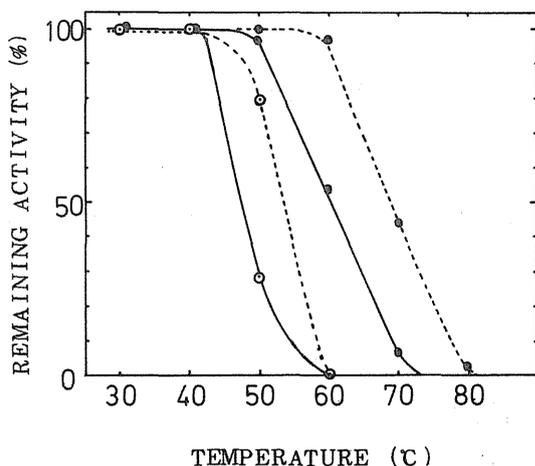


Fig. 9. Effect of temperature on the stability of the alkaline proteinase I and II.

The enzyme solutions (10.75 μg for APase II) were preincubated at indicated temperatures for 10 min in 1.0 ml of 10^{-4}M (—) and 10^{-2}M (---) CaCl_2 , and then immediately cooled in ice water. Remaining activity was measured by the standard conditions as described in the text. ○, APase I, ●, APase II.

ハ 凍結保存における安定性

精製アルカリプロテイナーゼの凍結保存における安定性を検討したところ、第10図に示したように 10^{-4}M の Ca^{++} の存在下では3日間の凍結保存時にAPase Iは53%、APase IIは63%に活性が減少した。一方 10^{-2}M の Ca^{++} が存在すれば、24日間の凍結保存時にAPase I

は75%, APase IIは100%活性が保持され、凍結保存においてもCa⁺⁺の保護作用が認められた。

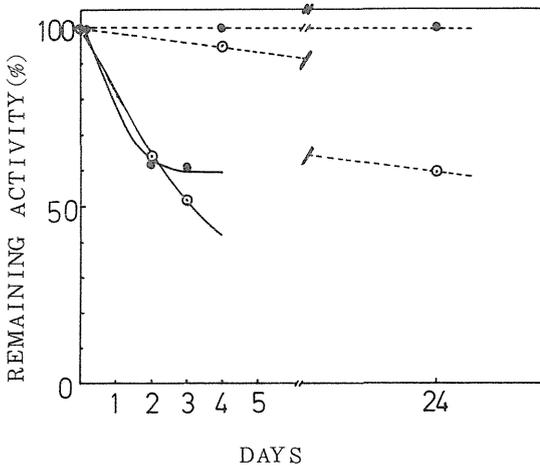


Fig. 10. Effect of Ca⁺⁺ on the stability during freezing of the alkaline proteinase I and II.

The enzyme solutions (8.13 μg for APase I and 7.18 μg for APase II) were frozen for indicated periods in 1.0 ml of 10⁻⁴M (—) and 10⁻²M (---) CaCl₂. Remaining activity was measured by the standard conditions described in the text.

○, APase I; ●, APase II.

v 金属イオンの影響

2種の精製アルカリプロティナーゼについて、0.1 M トリス-HCl 緩衝液、pH 7.5、2% (消化混液中1%) ミルクカゼインを基質として金属イオンの酵素活性に及ぼす影響を検討し、第2表に示した。この結果APase Iは銀イオン及び2価の鉄イオンで阻害された。またAPase IIは銀イオンでは阻害されたが、鉄イオンでは影響を受けていなかった。塩素、硫酸及び硝酸などの陰イオンはほとんど影響を与えず、特定の賦活金属イオンも認められなかった。

vi 各種試薬の影響

各種試薬の精製アルカリプロティナーゼに及ぼす影響を検討し、各酵素の活性部位の検索を行った。第3表に示すように2種の酵素はいずれも、SH試薬 (ICH₂COOH,

Table II Effect of Metal Ions on the Activity of the Alkaline Proteinase I and II.

Metal ions	Residual activity (%)	
	Alkaline proteinase I	Alkaline proteinase II
none	100	100
NaCl	98	105
Na ₂ SO ₄	86	96
NaNO ₃	96	96
MgCl ₂	99	92
AlCl ₃	102	93
CaCl ₂	68	74
MnCl ₂	95	81
FeSO ₃	17	66
FeCl ₃	62	98
CoCl ₂	69	71
CuCl ₂	56	59
ZnCl ₂	60	46
SrCl ₂	82	88
AgNO ₃	3	20
CdCl ₂	84	58
HgNO ₃	78	62
HgCl ₂	17	66

The enzymes (1.10 μg for APase I and 9.7 μg for APase II) were treated with the indicated metal ions at concentrations of 1×10⁻³M for 10 min at room temperature, in a total volume of 1.0 ml. The enzyme activity was assayed with pH 7.5 casein (0.01M Tris-HCl buffer).

NEM^{*1}, PCMB^{*2}, L-Cysteine, KCN及びω-Chloroacetophenone), EDTA^{*3}などの金属キレート試薬で阻害されずペプシンの阻害剤であるドデシル硫酸ソーダでも影響が少かった。これに対して酵素蛋白質の特定のセリン残基と特異的に反応して活性を消失させるDFPは各酵素をともに失活させた。これらのことから2種の酵素

*1 NEM :N-Ethylmaleimideの略

*2 PCMB :p-Chloromercuribenzoateの略

*3 EDTA :Ethylenediaminetetraacetateの略

Table III Effect of Various Chemicals on the Activity of the Alkaline Proteinase I and II.

Chemicals	Residual activity (%)	
	Alkaline proteinase I	Alkaline proteinase II
none	100	100
Diisopropylfluorophosphate (DFP)	0	0
Tosyl-L-lysine chloromethylketone (TLCK)	22	112
Tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone (TPCK)	165	104
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	53	0
Protease inhibitor from potato ¹⁾	97	5
Trypsin inhibitor from soy bean ¹⁾	57	108
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	59	83
Monoiodoacetic acid	85	97
ω -Chloroacetophenone	96	108
<i>p</i> -Chloromercuribenzoate (PCMB)	74	97
N-Bromosuccinimide (NBS)	0	0
Iodine	0	0
Potassium permanganate	67	62
Sodium thiosulfate	97	104
Ethylenediamine tetraacetate (EDTA)	90	105

The enzymes (11.0 μg for APase I and 9.7 μg for APase II) were treated with the indicated chemicals at concentration of $1 \times 10^{-3} \text{M}$ for 10 min at room temperature, in a total volume of 1.0 ml. The enzyme activity was assayed with pH7.5 casein (0.01 M Tris-HCl buffer).
1) 10 μg .

はいずれもセリン酵素に分類されると思われる。また、S-S結合の環元剤チオ硫酸ソーダで阻害されず、ヨウ素及びNBS^{*1}のようなL-Tyrosine, L-Histidine及びL-Tryptophanのヨウ素化剤及び酸化剤で阻害されたことは、S-S結合の間裂は酵素活性に影響を与えないが、L-Tyrosine, L-Histidine及びL-Tryptophanのいずれかが活性に関与しているものと思われる。またAPase IはTLCK^{*2}で阻害されるが、TPCK^{*3}では影響を受けずPMSF^{*4}での影響も少ないことから、トリプシンのようにL-Lysineを含むペプチドを特異的に

切断し、活性発現にL-SerineとともにL-Histidineが必須であることが示唆された。一方APase IIは、DFP, PMSFでは阻害されたが、TLCK, TPCKでともに影響を受けなかった。このことはAPase IIがAPase Iと同様活性発現にセリン残基が関与しているが基質特異性の面で両者は異なっていることを示唆していた。今後、合成基質を用いてその基質特異性についての検討を行って明らかにしたい。

vii 基質濃度と活性

酵素濃度を一定にして、ミルクカゼインの各種濃度における水解作用を測定した結果を第11図に示した。APase Iは消化混液中0.3%、APase IIは0.4%に最適基質濃度が認められた。また、ミルクカゼイン水解時におけるKm値をLineweaver-Burkの式⁹⁾より求めるとそれぞれ0.0425(%)、0.04(%)であった。

*1 NBS : N-Bromosuccinimideの略
*2 TLCK : Tosyl-L-lysine chloromethylketoneの略
*3 TPCK : Tosyl-L-phenylalanine chloromethylketoneの略
*4 PMSF : Phenylmethylsulfonylfluorideの略

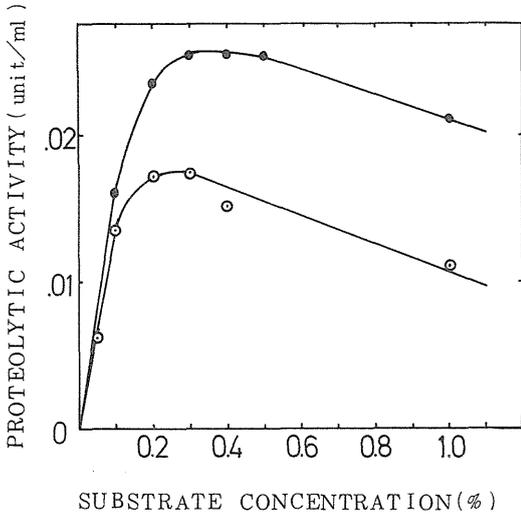


Fig.11. Effect of substrate concentration on the activity of the alkaline proteinase I and II.

The reaction mixture contained 1.0 ml of the enzyme solutions (19.5 μ g for APase I and 10.7 μ g for APase II) and 1.0 ml of various concentrations of 0.01 M milk casein in 0.01 M borate buffer, pH 10.0. -○-, APase I; -●-, APase II.

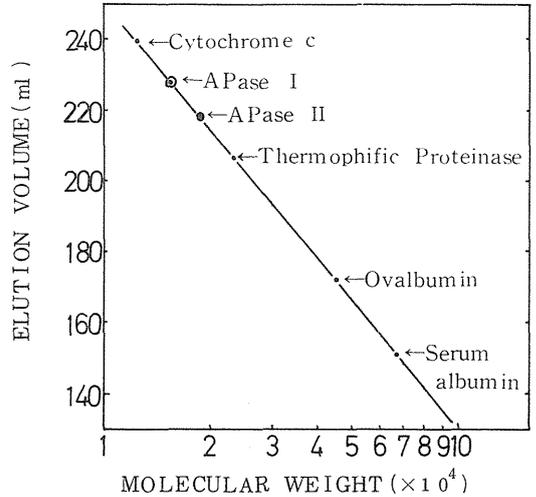


Fig.12. Molecular weight estimations of the alkaline proteinase I and II by gel filtration.

The column (3 \times 44 cm) was equilibrated with 0.005 M acetate buffer, pH 6.8, containing 0.001M calcium acetate and 0.1 M NaCl. 4 ml of each alkaline proteinases were placed on a top of the column and eluted with the same buffer. The flow rate was 11 ml per hr and fractions of 2.1 ml were collected. Standard proteins are serum albumin (bovine), ovalbumin, and cytochrome c (horse).

viii ゲルろ過法による分子量の算出

2種の精製アルカリプロティナーゼの分子量をセフェックスG-100によるゲルろ過法によって算出した。その結果第12図に示したようにAPase Iは18,500, APase IIは15,500と算出された。

またさらに報告した耐熱性プロティナーゼの分子量は23,000であった。

考 察

放線菌 *Streptomyces griseus* ATCC 3463 の培養液中に生産される蛋白分解酵素については、大内ら¹⁰⁾が最初にペプチダーゼとプロティナーゼを分離して以来それらの酵素化学的性質について報告されてきた。さらに著者らは前報¹⁾においてこの培養液中に著しく熱に安定な耐熱性プロティナーゼ及び2種のアルカリプロティナーゼが分離されたことを報告し、とくに耐熱性プロティ

ナーゼの酵素化学的性質について検討した。さらに本報において2種のアルカリプロティナーゼの精製を行いその酵素化学的性質について検討し、相互比較ならびに大内の報告したアルカリプロティナーゼの関連について考察する。

耐熱性プロティナーゼ、APase I及びAPase IIの酵素化学的諸性質を第4表に要約して示した。なおさきに大内ら^{2,14)}が報告したアルカリプロティナーゼの酵素化学的諸性質を比較のために並記した。

第4表で明らかなように、2種のアルカリプロティナーゼは両者とも比較的類似した酵素化学的性質を有しているが、安定pH領域、Ca⁺⁺の保護作用の有無、阻害剤等電点、分子量などの点でやや異っており、両酵素ともDFPで阻害されるセリン酵素であると思われる。また、APase IはTLCKによって阻害され、PMSFによって

Table IV. Comparison of some Properties between Alkaline Proteinase I, II, Thermophilic Proteinase and Alkaline Proteinase which Reported by Ouchi (2, 14)

Properties	Enzyme	Thermophilic Proteinase	Alkaline proteinase		Alkaline proteinase reported by Ouchi
			I	II	
Optimum pH		11.0	9.5	9.5	11.0
Optimum temperature (°C)		80	40	50	45
Optimum substrate concn.		0.2	0.3	0.4	1.2
pH stability		5-11	5-10	1.5&11.5	2.5&10
Effect of Ca ⁺⁺ on the stability		++	-	+	-
Thermostability (70°, %)		100	0	45	0
" (100°)		68	0	0	0
Inhibitors	DFP	DFP	DFP	DFP	PIP [*]
	PMSF	TLCK	PMSF	PMSF	I ₂
	PIP ^γ	NBS	PIP [*]	PIP [*]	NBS
	I ₂	I ₂	I ₂	I ₂	
	NBS		NBS	NBS	
Effect of metal ions (inhibition)	HgNO ₃	AgNO ₃	AgNO ₃	AgNO ₃	HgCl ₂
	FeSO ₄	FeSO ₄			FeSO ₄
Isoelectric point (pI)		8.8	9.6	8.8	9.8
Molecular weight		23,000	18,500	15,500	20,000
Km (%)		0.045	0.0425	0.040	-

* The abbreviations used are : PIP, protease inhibitor from potato ; other is the same as those illustrated in Table III.

は約50%阻害されることから、活性発現にL-セリン残基が関与し、かつトリジンを含むペプチドを水解するトリブシン様酵素であることが示唆された。また APase IIは DFP 及び PMCF により完全に阻害を受けた。PMSF はセリン酵素のうちキモトリブシンに強く反応することから、この酵素がキモトリブシン様酵素であることが示唆されたが、TPCKとの反応性がなく、詳細な検討が必要であると思われる。

一方、大内の報告したアルカリプロテナーゼは、第4表に示すほかに合成基質を用いた基質特異性についても検討され²⁾、トリブシンの合成基質である α -benzoyl-L-arginine-methyl ester (BAME)、キモトリブシンの合成基質である N-acetyl-tyrosine-ethyl ester (ATEE) 及びパバインの合成基質である α -benzoyl-

L-arginine amide (BAM) をよく水解した。しかし SH 試薬による阻害がないことから、パバインの様な SH 酵素ではないと述べている。なお DFP による阻害実験は行っていないが、基質特異性の面からトリブシン及びキモトリブシンの特徴を併せ持つセリン酵素であると思われる。さらにまたトリブシンとの交叉試験¹⁵⁾も行い、この結果よりトリブシンより広い基質特異性を有することが示唆されている。又 pH 安定性においてこのアルカリプロテナーゼは pH 2.5 付近が最も安定であるが pH 10 付近でもかなり安定で2つの安定 pH 領域を持ち、APase II の特徴と類似していた。

以上の点を考察すると、大内の報告したアルカリプロテナーゼは、今回分離した APase I 及び APase II の特徴を併せ持っていたものであり、精製法の進歩により

2種のアルカリプロティナーゼに分離精製することが出来たものと考えられる。精製度においても大内の約8倍に対し各々62倍及び66倍と大きく上昇させることが出来た。耐熱性プロティナーゼについては、大内らは当初認めていなかったが、これは耐熱性プロティナーゼの40℃における活性が至適温度(70℃)の約20%にしかおよばないため、精製過程においてその存在が確認出来なかったためと推察している。

このように放線菌 *Streptomyces griseus* ATCC 3463のプロティナーゼ系は多種多様であると思われる。

要 約

1. 放線菌 *Streptomyces griseus* ATCC 3463の培養液より、エタノール分画沈澱、セフデックスG-100クロマトグラフィー、CM-セルロースクロマトグラフィー及び等電点分画法によって2種のアルカリプロティナーゼを相互分離し、各々62倍及び66倍に精製した。

2. APase IはpH 9.5, 40℃で最高の活性を与え、pH安定領域は5~10で、DFP, TLCK, NBS及びヨードで阻害され、等電点は9.6、分子量は18500であった。

3. APase IIは、pH 9.5, 50℃で最高の活性を与え、pH安定領域は1.5及び1.5, Ca^{++} による保護作用が認められた。DFP, PMSF, 馬鈴薯のプロテアーゼインヒビター, NBS及びヨードで阻害され、等電点は8.8、分子量は15500であった。

文 献

1) 四十九院成子, 大内毅, 平松昭, ; 茨大農学術報

告, 23, 71 (1975)

2) Ouchi T.; Agr.Biol.Chem., 26, 734 (1962)

3) Hagihara B., H.Matsubara, M.Nakai and K.Okunuki; J.Biochem., 45, 185 (1958)

4) Lowry O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall; J.Biol.Chem., 193, 265 (1951)

5) Vesterberg and H.Svenson, Acta Chem, Scand., 20, 820 (1966)

6) Vesterberg O.; Acta Chem.Scand., 23, 2653 (1969)

7) Vesterberg O.; Science Tools, 16, 24, (1964)

8) Nilson P., T.Wadstrom and O.Vesterberg; Biochem.Biophys.Acta, 221, 146 (1970)

9) Lineweaver.H. and D.Burk; J.Am.Chem. Soc., 56, 658 (1934)

10) 大内毅, 平松昭; 茨大農学術報告, 6, 67 (1958)

11) 大内毅, 平松昭; 茨大農学術報告, 7, 69 (1959)

12) 大内毅, 平松昭, ; 同上, 8, 111 (1960)

13) Ouchi T.; Agr.Biol.Chem., 26, 723 (1962)

14) 大内毅, 平松昭; 酵素化学シンポジウム, 第18集, 62, (1962)

15) 平松昭, 大内毅; 茨大農学術報告, 11, 47 (1963)

16) Hiramatsu A.; J.Biochem., 61, 168 (1967)

17) 柴田和雄; 高次構造と化学的研究法, 119頁 (1969) 東大出版会

Summary

1. Two alkaline proteinases [EC 3.4.4 group] were isolated from the filtrate of culture of *Streptomyces griseus* ATCC 3463 by a method using the fractional precipitation with ethanol, gel filtration on Sephadex G-100, chromatography on a column of CM-cellulose, and isoelectric focusing. The purified alkaline proteinase I and II were purified about 62 and 66 fold, respectively.

2. The purified alkaline proteinase I had optimum activity at pH 9.5 and 40°C, and was stable from pH 5 to 10, and inactivated with DFP, TLCK, NBS, and I₂. The molecular weight and isoelectric point of the enzyme were estimated to be about 18,500 and pH 9.6, respectively.

3. The purified alkaline proteinase II had optimum activity at pH 9.5 and 50°C, and was stable at pH 1.5 and 11.5, and inactivated with DEP, PMSF, protease inhibitor from potato, NBS, and I₂. The molecular weight and isoelectric point of the enzyme were estimated to be about 15,500 and pH 8.8, respectively.