

担子菌 *Agrocybe tuberosa* アミノペプチダーゼについて

大内 毅・平松 昭・児玉 治・田中滋生

Studies on Aminopeptidases from *Agrocybe tuberosa*

TAKESHI OUCHI, AKIRA HIRAMATSU, OSAMU KODAMA, and
SHIGEFU TANAKA

緒 言

担子菌のプロティナーゼ〔EC 3.4.4. group〕の報告は多く見られるが、そのうち川合は担子菌ヒダナンタケ目 (*Aphyllorphorales*) は高い酸性プロティナーゼを、マツタケ目 (*Agaricales*) は高い塩基性プロティナーゼを菌体外に生産することを報告した。友田はヒイロタケ (*Tranetes sanguinea*) の酸性プロティナーゼを結晶標品として得、pH 2.3~2.5, 55℃ で最高の活性をあたえ、分子量 34,000, 等電点 3.5 であると報告した。また小林らは *Tranetes osteiformis* の培養液液中に凝乳酵素の生産の高いことを見出し、この酵素を Disc 電気泳動的に均一な標品として得、pH 2, 60℃ で最高の活性をあたえ、分子量 35,000 であると報告した。しかしながら担子菌のペプチダーゼに関する報告は見られない。

担子菌 *Agrocybe tuberosa* の類似菌の子実体が漢方薬雷丸として使用されることは良く知られている。この雷丸は古くから糸虫の駆虫薬として常用され、雷丸の成分により糸虫の頭部がくずれることから、著者らはこの菌類には強い蛋白分解酵素が産生されているものと考え、検討を進めた。担子菌 *Agrocybe tuberosa* は菌体内および菌体外でのカゼイン水解活性はきわめて微弱であったが、菌体内に強いアミノペプチダーゼ (EC 3.4.1. group) 2種が存在することを見出すことが出来た。これら2種の酵素をアミノペプチダーゼ I (APase I と略す) および II (APase II と略す) とした。そしてアミノペプチダーゼ I は L-フェニールアラニル-および

L-ロイシル-β-ナフチルアミドを良く水解し、アミノペプチダーゼ II は L-アルギニル-および L-リジル-β-ナフチルアミドを良く水解する興味あることを見出したのでここに報告する。

本研究を発表するに当たり、菌の培養に御便宜を賜った日研化学株式会社小山田孝一氏に対し厚く御礼申し上げます。

実 験 方 法

1. 菌 株

担子菌 *Agrocybe tuberosa*^{*} を使用した。

2. 試 薬

DEAE-セルロース (0.89 meq/g) は Brown Co., およびセファデックス G-100 は Pharmacia Fine Chemical Co. より購入した。H-Leu-β-NA^{**}, H-Val-β-NA, H-Gly-β-NA および H-Lys-β-NA は財団法人蛋白質研究奨励会, H-Ala-β-NA および H-Met-β-NA は Sigma Chemical Co. ならびに H-Phe-β-NA, H-Arg-β-NA および Bz-Arg-β-NA は Schwarz/Mann Company より購入した。H-Leu-Gly-OH および H-Leu-Gly-Gly-OH¹⁹⁾ は当研究室で Sheehan と Hess の方法で合成した。

* 工業技術院微生物工業技術研究所に申請書受理番号第 3008 号として寄託した。

** H-Leu-, leucyl; H-Val-, valyl; H-Gly-, glycyl; H-Lys-, lysyl; H-Ala-, alanyl; H-Met-, methionyl; H-Phe-, phenylalanyl; H-Arg-, arginyl; Bz-, benzoyl, β-NA, β-naphthylamide の略

* 本論文内容は日本農芸化学会関東支部大会 (1974 年 10 月宇都宮大学) において発表したものである。

3. 菌の培養法

酵母エキス0.2%, グルコース2%および炭酸カルシウム0.1%を含む培地をpH 7.0に調整し、この培地100 mlを500 ml 坂口コルベンに入れ、滅菌したのち、菌の孢子または菌糸を接種し、27°C に保って2週間振盪培養した。培養後、ろ別して菌体を得た。

4. 酵素活性の測定法

a) アミノ酸ナフチルアミドを基質とした場合

²⁰⁾松谷らの方法を一部改良した²¹⁾児玉らの方法で、酵素作用により生じたβ-ナフチルアミンをp-ジメチルアミノ桂皮アルデヒドと反応させ比色定量した。すなわち消化試験管に6mM の各種 L-アミノ酸β-ナフチルアミド溶液(特に記した場合を除き、アミノペプチダーゼIの基質としてH-Leu-β-NA, アミノペプチダーゼIIの基質としてH-Lys-β-NAを使用した)40 μlをとり、0.1M Tris-HCl 緩衝液、pH 7.0, 160 μlを加え、37°C に5分間放置後、酵素液40 μlを加えて反応させた。一定時間後(10分間)、反応混液より50 μlをとり、あらかじめ試験管内に0.2NHCl溶液50 μlを入れておき、これに加えて反応を停止させた後、0.1% p-ジメチルアミノ桂皮アルデヒド・エタノール溶液800 μlを加えて、15分後に535 nm における吸光度を島津分光光度計QR-50²²⁾により比色測定した。酵素液1 mlが1分間に1 μmoleのβ-ナフチルアミンを生成する酵素活性を1単位とした。

b) ロイシルペプチドを基質とした場合

H-Leu-Gly-OHおよびH-Leu-Gly-Gly-OH²²⁾を基質としてMethesonとTattieの方法を改良した方法で測定した。すなわち消化試験後、消化混液をペーパークロマトグラフィーまたはペーパー電気泳動法により基質と遊離アミノ酸を分離し、遊離したロイシンを²⁷⁾Morrisのニンヒドリン・カドミウム法を一部改良した²⁸⁾方法で測定した。

5. 酵素蛋白質の測定法

²³⁾Lowry法によって測定した。標準物質として結晶牛血清アルブミン(2回結晶, Sigma Chemical Co.)を使用した。

6. Disc電気泳動

²⁴⁾Davisの方法に従って、7.5%アクリルアミドゲルおよび0.1M Tris-硼酸塩緩衝液(pH 8.3)を使用して行

なった。なお方法として濃縮用ゲルおよび試料用ゲルを省き、蔗糖を加えて30%溶液(W/V)とした試料50 μlを分離ゲルの上に乗せ、チューブ(5×70 mm)1本当たり2 mAの定電流で1.25時間泳動した。泳動後1本は常法に従ってCoomassie Brilliant Blue R-250(半井化学K.K.)で染色し、他方の1本は2.5 mmの長さのカミソリを用いて切り、個々のゲル切片をそれぞれ別々の試験管に入れ、0.1 Mリン酸塩緩衝液(pH 7.0)1 mlを加え、ホモジネートとし、3時間酵素を抽出し、この抽出液の酵素活性を測定した。

7. 等電点分画法

AmpholineはpH範囲3~10(40%水溶液)の製品をL.K.B社より購入し、²⁵⁾VesterbergとSvenssenの方法に従って等電点分画を行なった。

8. ゲルろ過法による分子量の測定

²⁶⁾Andrewsの方法に従って測定した。標準蛋白質2mgを1 mlの0.15 M NaClを含む0.1 Mリン酸塩緩衝液(pH 7.0)に溶解し、同緩衝液で平衡化したセファデックスG-100のカラム(0.9×45 cm)にかけ3.7 ml/時の流速で、2 mlづつ溶出液を採取した。標準蛋白質として牛血清アルブミン(分子量 M=68,000, Sigma Chemical Co. 2回結晶)、卵アルブミン(M=45,000 N.B.Co. 2回結晶)および馬心筋チトクロームC(M=12,400, N.B.Co.)を使用した。

実験結果および考察

1. アミノペプチダーゼ I および II の相互分離と精製

担子菌の菌体1.400 gを数回にわけ、電動式ホモゲナイザー(日本精機製作所製 HC型)に入れ、これに0.01 Mリン酸塩緩衝液、pH 7.0を菌体重と同重量加え、4°C, 3,000回転/分で2分間磨研した。この磨研物を4°Cに2時間放置後、8,000×g, 10分間で冷却遠心分離し、その上清を集め、粗酵素液とした。

この粗酵素液をあらかじめ0.01 Mリン酸塩緩衝液、pH 7.0で平衡化したDEAE-セルロースカラム(3×30 cm)に吸着させた。吸着したアミノペプチダーゼは0.2 M NaClを含む0.01 Mリン酸塩緩衝液、pH 7.0で95 ml/時の流速で溶出し、溶出液を20 mlづつに分画した。アミノペプチダーゼ活性を含む溶出区分378 mlを集め

これを DEAE-セルロースクロマトグラフィー溶出液とした。

上記溶出液に硫酸を 80% 飽和になるように加え、酵素蛋白質を沈澱させた。約 1 時間冷室 (4°C) に放置した後、生じた沈澱を冷却遠心分離 (8000×g, 10 分) した。沈澱した酵素は 0.01 M リン酸塩緩衝液, pH 7.0, 5 ml 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 0.15 M 食塩を含む 0.01 M リン酸塩緩衝液, pH 7.0 で平衡化したセファデックス G-100 カラム (2.0×100 cm) に重層し、同上緩衝液 19 ml/時の流速で展開溶出した。溶出液は 2.5 ml づつに分画した。分画液の蛋白質質量, H-Leu-β-NA 水解活性および H-Lys-β-NA 水解活性を測定した結果を第 1 図に示した。この結果アミノペプチダーゼ II (H-Lys-β-NA 水解酵素) がはじめに溶出し、ついでアミノペプチダーゼ I (H-Leu-β-NA 水解酵素) が溶出した。

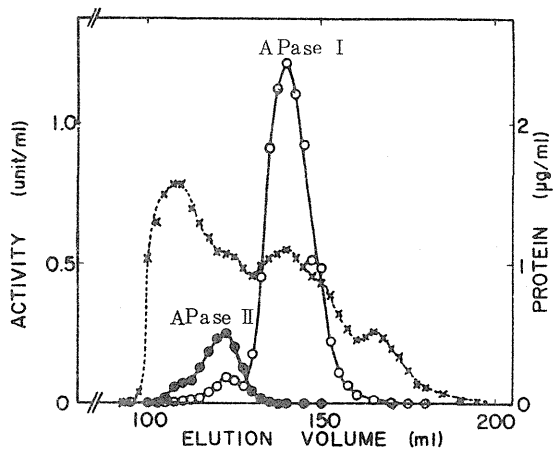


Fig.1. Chromatography of the aminopeptidase I and II on a column of Sephadex G-100.

Enzyme solution fractionated chromatography on a column of DEAE-cellulose was placed on the top of a column (2.0×100 cm) of Sephadex G-100 which had been equilibrated with 0.01M phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.15M NaCl. Enzyme was eluted with the same buffer. The flow rate was 19 ml per hr and fractions of 2.5 ml were collected. ...×..., concentration of protein; -○-, H-Leu-β-NA splitting activity; -●-, H-Lys-β-NA splitting activity.

Table 1. Purification of the Aminopeptidase I and II from *Agrocybe tuberosa*

Fraction	Aminopeptidase I				Aminopeptidase II			
	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)
Crude enzyme solution	299	76	0.3	100	6.3	0.02	100	
DEAE-Cellulose chromatography	49	70	1.4	92	5.8	0.12	92	
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	18	34	1.9	45	3.0	0.16	47	
Sephadex G-100 chromatography	4.5	17	3.8	23	3.8	1.5	0.36	23
Sephadex G-100 chromatography	1.7	8	13.4	11	1.2	0.7	0.63	11

One unit of the aminopeptidase activity was defined as the amount of enzyme that the solution hydrolyzate from substrate corresponding to one μmole of β-naphthylamine per min per ml of enzyme solution. Specific activity was expressed in units per mg of protein of the enzyme solution.

これら両酵素は各々別個に次の操作により精製酵素液を調製した。

まづダイアフィルター(G-10T, B.E.Co)を用いて2~3mlに濃縮し, 前記と同様にして各々の酵素をセファデックスG-100を用いて再クロマトグラフィーを行なった。かくして得られた溶出液を精製酵素液として以下の実験に使用した。アミノペプチダーゼIおよびIIの精製過程の一覧を要約して第1表に示した。アミノペプチダーゼIは収率11%で約45倍に, アミノペプチダーゼIIは収率11%で約32倍に精製された。

2. アミノペプチダーゼIおよびIIの均一性

アミノペプチダーゼIはDisc電気泳動法および等電点分画法で, アミノペプチダーゼIIはDisc電気泳動法でそれぞれ均一性を調べた。これらの結果を第2図, 第3図および第4図に示した。アミノペプチダーゼIは易動距離1.8~2.0cmに蛋白質の染色バンドとH-Leu-β-NA水解活性とがよく一致した(第2図参照)。また, 等電点分画法においてもH-Leu-β-NA水解活性は1バンドのみであった(第3図参照)。蛋白質量は僅少で

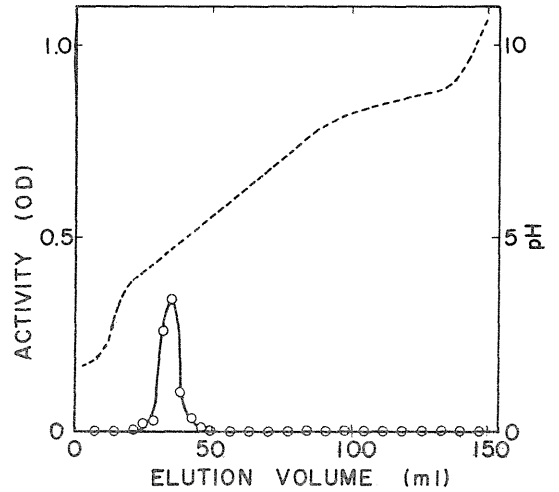


Fig.3. Isoelectric focusing patterns of the purified aminopeptidase I.

Isoelectric focusing patterns were obtained by the method of Vesterberg and Svensen (25), using the pH range from 3 to 10. 68.0 μg of the enzyme was applied and electrophoresis was carried out at 300 V for 18 hr., pH; -○-, H-Leu-β-NA splitting activity.

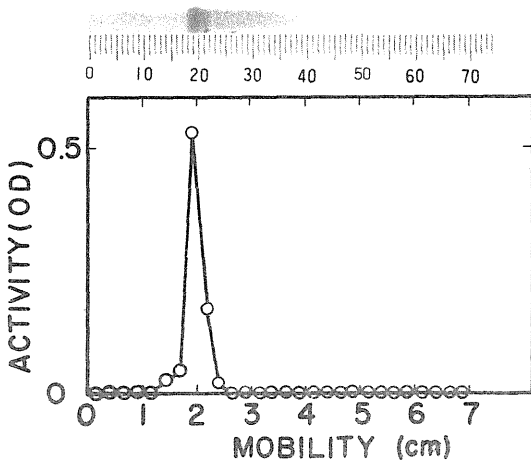


Fig.2. Electrophoresis of the purified aminopeptidase I on acrylamide gel.

Electrophoretic pattern was obtained by the method Davis (24) using 7.5 percent acrylamide gel at pH8.6. 136 μg of the enzyme was applied on the top of the gel. -○-, H-Leu-β-NA splitting activity.

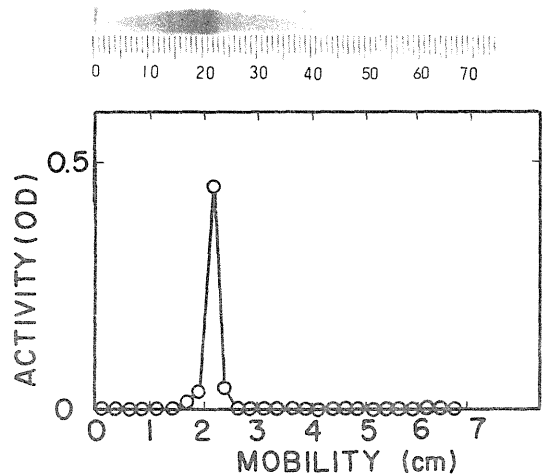


Fig.4. Electrophoresis of the purified aminopeptidase II on acrylamide gel.

The conditions of run were the same as those illustrated in Fig.2. 80 μg of the enzyme was applied on the top of the gel. -○-, H-Lys-β-NA splitting activity.

あったため、280 nm の吸光測定が出来なかった。またアミノペプチダーゼ I の等電点は 4.7 付近にあると推定した。これらの結果からアミノペプチダーゼ I はほぼ均一であると思われる。

アミノペプチダーゼ II は易動距離 2.0~2.25 cm に蛋白質の染色バンドと H-Lys- β -NA 水解活性とがよく一致した。しかし 1.7~1.9 cm に濃い染色バンドと 1.5 cm 付近にわずかな染色バンドが認められた。これらの結果からアミノペプチダーゼ II は不純蛋白質を若干含むものと考えられる。

3. アミノペプチダーゼ I および II の分子量

アミノペプチダーゼ I および II を Andrews²⁶⁾ の方法に従って分子量を測定し第 5 図に示した。この結果アミノペプチダーゼ I の分子量は 58,000 で、アミノペプチダーゼ II の分子量は 72,000 であった。友田⁴⁾ および小林¹⁶⁾ が報告した担子菌の酸性プロテイナーゼの分子量が約 35,000 であるのと比較して、これら両酵素の分子量はかなり大きい。

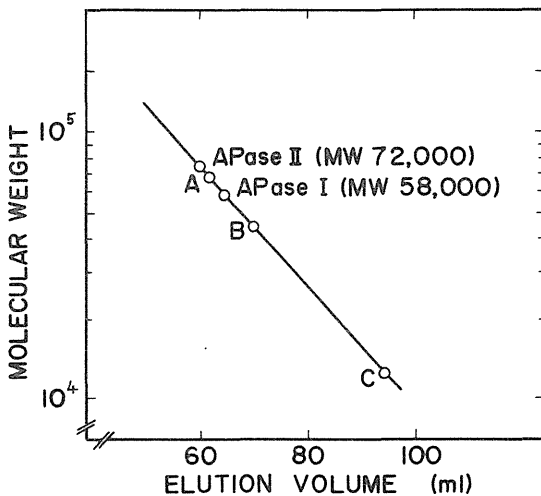


Fig.5. Estimation of molecular weight of the purified aminopeptidase I and II with Sephadex G-100 gel filtration.

The column (0.9×45cm) of Sephadex G-100 was equilibrated with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.15 M NaCl. A serum albumin; B, ovalbumin; C, cytochrome c (horse).

4. 最適 pH

アミノペプチダーゼ I および II にそれぞれの基質を使用し、酵素作用の最適 pH を検討して第 6 図に示した。両酵素共に最適 pH は 7.0 であって、pH 5 および 9 においてその作用が 10~20% となり、pH 作用範囲がかなり狭いことを示した。

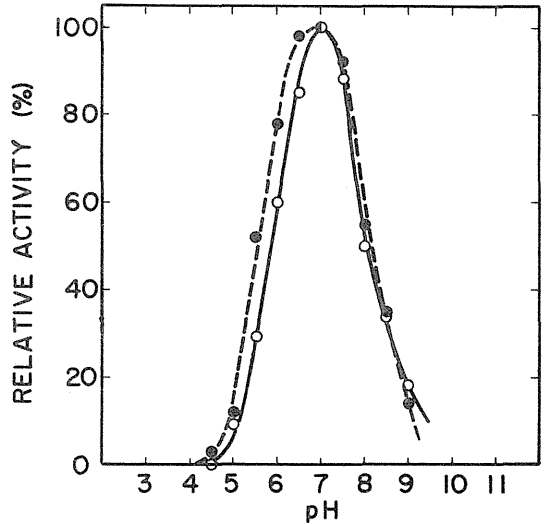


Fig.6. Effect of pH on the activity of the purified aminopeptidase I and II.

The reaction mixture contained 40 μ l of the enzyme solution (1.7 μ g for APase I and 6.0 μ g for APase II), 40 μ l of substrate solution and 160 μ l of buffer solution at various pH's. Buffers used were 0.1 M acetate buffer for pH 4.5 to 6.0, 0.1 M phosphate buffer for pH 6.0 to 8.0, and 0.1 M Tris-HCl buffer for pH 7.5 to 9.0. -○-, H-Leu- β -NA splitting activity. -●-, H-Lys- β -NA splitting activity.

5. 最適温度

最適 pH 7.0 でアミノペプチダーゼ I および II のそれぞれの基質に対する最適温度を検討し第 7 図に示した。両酵素共に最適温度は 37°C で、温度の上昇と共に酵素活性は低下し、60°C で酵素活性を失った。アミノペプチダーゼ I は酵素活性を示す温度範囲がきわめて狭く、30°C でわずかに 10% で、25°C では酵素活性を示さなかった。アミノペプチダーゼは一般の酵素を比較して作用 pH および温度範囲がきわめて狭いことは興味深い。アミノ

ペプチダーゼIIは比較的温度範囲がやや広く30℃で85%, 20℃で70%の酵素活性を示した。

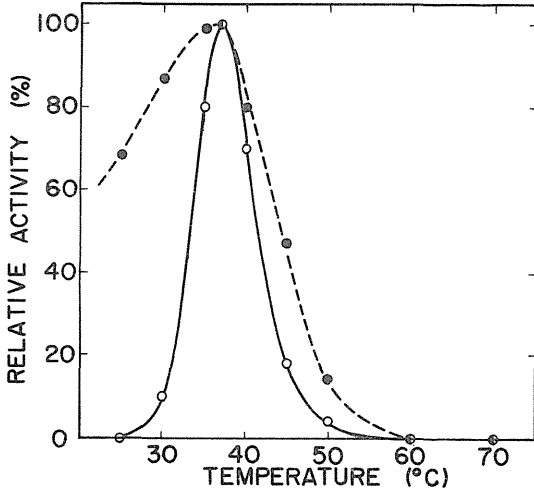


Fig.7. Effect of temperature on the activity of the purified aminopeptidase I and II.

The reaction mixture contained 40 μ l of enzyme solution (1.7 μ g for APase I and 6.0 μ g for APase II), 40 μ l of substrate solution and 160 μ l of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. The assay solution was incubated at various temperatures for 10 min. -○-, H-Leu- β -NA splitting activity; ····, H-Lys- β -NA splitting activity.

6. pH 安定性

酵素液を 0.1N HCl および 0.1N NaOH を用いて所定の pH に調整し, 4℃で 20 時間放置した後, pH 7.0 に戻してこれら処理酵素の残存酵素活性を測定して, アミノペプチダーゼ I および II の各 pH 安定性を調べ第 8 図に示した。この結果両酵素は共に pH 7 から 9 付近で安定であるが, この範囲を越えると急速に酵素活性を失なった。

7. 熱安定性

酵素液を pH 7.0 で 10 分間各温度に放置後, 氷水中で 10 分間急冷した後, 直ちに常法に従って残存酵素活性を測定し, アミノペプチダーゼ I および II の温度に対する安定性を調べ第 9 図に示した。この結果両酵素は共に 35℃までは安定であるが, アミノペプチダーゼ I は温度の上昇と共に急速に失活し, 50℃で完全に酵素活性を失

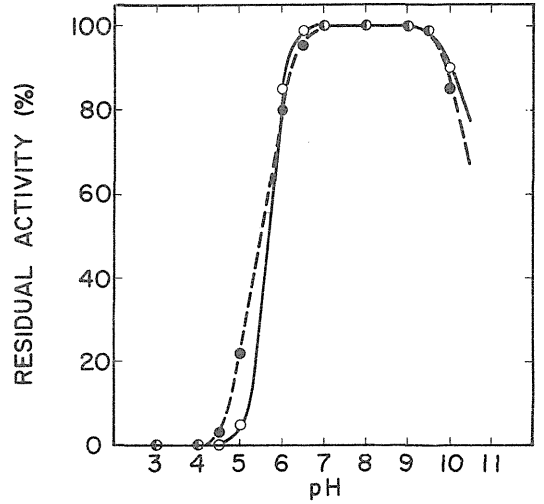


Fig.8. pH stability of the purified aminopeptidase I and II.

The enzyme was preincubated with the buffer at the indicated pH's for 20 hr at 4°C, in a total volume of 1.0 ml. The enzymes were used 42 μ g for APase I and 150 μ g for APase II. -○-, H-Leu- β -NA splitting activity; ····, H-Lys- β -NA splitting activity.

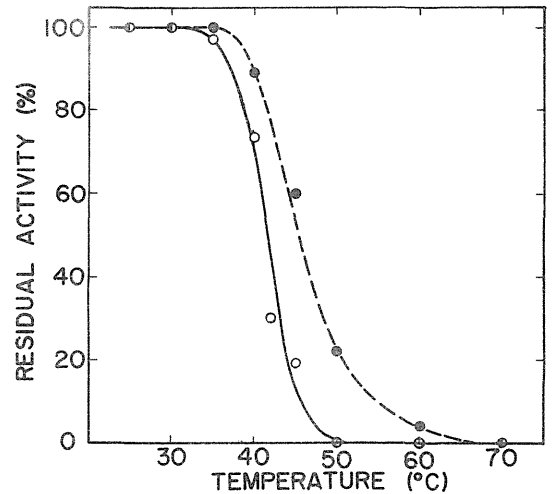


Fig.9. Thermal stability of the purified aminopeptidase I and II.

The enzymes were heated as indicated temperature for 10 min in 40 μ l of 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, and the immediately cooled at 0°C. The enzymes were 1.7 μ g for APase I and 6.0 μ g for APase II. -○-, H-Leu- β -NA splitting; ····, H-Lys- β -NA splitting activity.

った。アミノペプチダーゼIIは温度の上昇と共に徐々に失活し、50℃で22%の残存酵素活性を示し、70℃で完全に失活した。

8. 各種金属イオンの影響

各種金属イオン (10^{-3} M) のアミノペプチダーゼIおよびIIにおよぼす影響をそれぞれの基質でpH7.0, 37℃において測定し第2表に示した。アミノペプチダーゼIはAg⁺で阻害を受け、アミノペプチダーゼIIはZn⁺⁺で強い阻害を受け、ついでCu⁺⁺およびFe⁺⁺で阻害を受けた。

9. 各種試薬の影響

Table II. Effect of Metal Ions on the Activity of the Purified Aminopeptidase I and II.

Metal ions	Residual activity	
	APase I	APase II
none	100	100
MgCl ₂	112	62
CaCl ₂	88	93
MnCl ₂	119	98
FeCl ₂	85	46
FeCl ₃	109	114
CoCl ₂	95	87
NiCl ₂	72	78
CuCl ₂	71	27
ZnCl ₂	87	8
AgNO ₃	44	—
CoCl ₂	96	97

The enzymes (1.7 μg for APase I and 6.0 μg for APase II) were treated with indicated metal ions at concentrations of 1×10^{-3} M (pH 7.0) for 10 min at room temperature, in a total volume of 40 μl.

*1 TPCK, N-Tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone; *2 SDS, Sodium dodecylsulfate; *3 PMSF, phenylmethylsulfonylfluoride の略

各種試薬の両酵素活性に対する影響をそれぞれの基質を用いてpH 7.0, 37℃で測定し第3表に示した。この結果、アミノペプチダーゼIはTPCK^{*1}およびSDS^{*2}に強く阻害された。アミノペプチダーゼIIはo-phenanthroline, TPCK, PMSF^{*3}およびSDSによって強く阻害された。

Table III. Effect of Various Chemicals on the Activity of the Purified Aminopeptidase I and II

Chemicals	Residual activity	
	APase I	APase II
none	100	100
Monoiodoacetic acid	74	69
N-Ethylmaleimide(NEM)	100	96
L-Cysteine	107	100
Dithiothreitol(DTT)	100	100
Ethylene diamine tetraacetate(EDTA)	86	67
o-Phenanthroline	84	0
N-Tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone (TPCK)	19	17
N-Tosyl-L-lysine chloromethylketone (TLCK)	100	94
Phenylmethylsulfonyl-fluoride(PMSF)	87	0
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	7	14

The enzymes (1.7 μg for APase I and 6.0 μg for APase II) were treated with the indicated chemicals at concentrations of 1×10^{-3} M (pH 7.0) for 10 min at room temperature, in a total volume of 40 μl.

10. 基質特異性

各種基質に対するアミノペプチダーゼIおよびIIの基質特異性をpH 7.0, 37℃で測定し第4表に示した。この結果、アミノペプチダーゼIはH-Phe-β-NAを良く水解し、H-Leu-β-NAの約2倍の活性を有し、ついでH-Met-β-NAを水解し、H-Ala-β-NAをわずかに水解したが、H-Val-β-NA, H-Gly-β-NA, H-

Lys-β-NA, H-Arg-β-NAおよびBz-Arg-β-NAは水解しなかった。またロイシルペプチドに対してH-Leu-β-NAに比較して、H-Leu-Gly-Gly-OHは20%, H-Leu-Gly-OHはわずか3%水解した。

アミノペプチダーゼIIは基質特異性の巾が広く、実験に使用した合成基質のなかでBz-Arg-β-NAを除くすべてのL-アミノ酸-β-ナフチルアミドに酵素活性を示した。特にH-Arg-β-NAおよびH-Lys-β-NAに強い酵素活性を示したことは興味深い。またH-Met-β-NAおよびH-Ala-β-NAに強い酵素活性が見られ、これらについてH-Leu-β-NA, H-Phe-β-NA, H-Gly-β-NAおよびH-Val-β-NAを水解した。なおH-Leu-β-NAを基質とした場合、アミノペプチダーゼIおよびIIの比活性を比較するとアミノペプチダーゼIが1.34 unit/mg of protein に対し、アミノペプチダーゼIIが0.37 unit/mg of protein で、約2.7%の酵素活性であった。

H-Leu-β-NAを水解するアミノペプチダーゼは生物界に広く分布し、哺乳動物の脳、腸粘膜、腎臓、

³⁴⁾・³⁵⁾・⁴³⁾・⁴⁴⁾眼、³³⁾肝臓、および血液に見られ、また大麦⁴¹⁾、豆類⁴²⁾、*Aspergillus* 属³⁹⁾、*Bacillus* 属³⁶⁾、*Streptomyces* 属³⁷⁾・³⁸⁾、および *Aeromonas* 属⁴⁰⁾ 等植物界および微生物界に存在することが知られている。これらのうち哺乳動物質臓のロイシンアミノペプチダーゼは詳細に研究されている。なかんづくHassonとHiitter³¹⁾は1,300倍に精製し、至適pH9.0~9.5でMg⁺⁺イオンで安定化し、EDTAで失活し、Mn⁺⁺イオンで活性化し、またMelius³²⁾らは分子量255,000で4個のサブユニットからなると報告した。NakagawaとTsuji³³⁾は血清ロイシンアミノペプチダーゼが至適pH7.2~7.5、至適温度45℃でEDTAで失活したと報告した。眼水晶体ロイシンアミノペプチダーゼはHanson³⁴⁾らにより至適pH1.05、至適温度40℃でEDTAで失活し、RetmannとHanson³⁵⁾らにより1分子当たり5~7.5個の亜鉛を含むことが報告された。

さらに *Bacillus subtilis*³⁶⁾、*Streptomyces gri-*³⁷⁾ *seus* および *Streptomyces sioyansis*³⁸⁾ の生産するロイシンアミノペプチダーゼならびに大麦および緑豆のロイシンアミノペプチダーゼはすべてEDTAで強く阻害される。上記のロイシンアミノペプチダーゼの多くはH-Leu-ペプチド、H-Leu-NH₂、H-Leu-β-NA等高い基質特異性を有し、N-末端のH-Leuに代りにH-Gly、H-His^{*}、H-Glu^{*}などのペプチド類にも作用した。担子菌アミノペプチダーゼIはH-Phe- およびH-Leu-β-NAをよく水解するが、EDTAで強く阻害されない点で異なる。

H-Arg-β-NAおよびH-Lys-β-NAを水解するアミノペプチダーゼはラットおよびヒト肝臓中に見出され、ラット肝臓の酵素はMakinen⁴³⁾らにより約1,000倍に精製され、EDTAで強く阻害され、シスチン、DTT^{*}により活性化されると報告した。担子菌アミノペプチダーゼIIはH-Arg- およびH-Lys-β-NAをよく水解するが、肝臓アミノペプチダーゼに比較して基質特異性の巾が広い。

Table IV. Action of the Purified Aminopeptidase I and II on Various Synthetic Peptides

Substrate	Relative activity	
	APase I	APase II
H-Phe-β-NA	198	54
H-Leu-β-NA	100	59
H-Val-β-NA	0	13
H-Ala-β-NA	6	100
H-Gly-β-NA	0	22
H-Met-β-NA	83	128
H-Lys-β-NA	0	100
H-Arg-β-NA	0	152
Bz-Arg-β-NA	0	0
H-Leu-Gly-OH	3	—
H-Leu-Gly-Gly-OH	20	—

Enzymes were used 1.7 μg for APase I and 6.0 μg for APase II. Concentration of substrate was 1×10⁻³M in the digestion mixtures.

文 献

1. Reissig J.L., J.L.Strominger and L.F.Lelori :

* H-Leu-NH₂, leucine amide; H-His-, histi- histidyl; H-Glu-, glutamylの略

- J.Biol.Chem., 217, 959 (1955)
2. Tracey M.V.: Biochem.J., 61, 579 (1955)
3. Tomoda K. and H.Shimazono: Agr.Biol. Chem., 28, 770 (1964)
4. Tomoda K.: Agr.Biol.Chem., 28, 774 (1964)
5. Arima K., S.Iwasaki and G.Tamura: Agr. Biol.Chem., 31, 540 (1967)
6. Iwasaki S., G.Tamura and K.Arima: Agr. Biol.Chem., 31, 546 (1967)
7. Arima K., S.Iwasaki and G.Tamura: Agr. Biol.Chem., 32, 1048 (1968)
8. Arima K. and S.Iwasaki: Agr.Biol.Chem., 32, 1051 (1968)
9. Ku J., G.Tamura and K.Arima: Biochim. Biophys. Acta, 171, 138 (1968)
10. Kawal M. and N.Mukai: Agr.Biol.Chem., 34, 159 (1970)
11. Kawai M.: Agr.Biol.Chem., 34, 164 (1970)
12. Kawai M.: Agr.Biol.Chem., 35, 1517 (1971)
13. 坂本政義, 藤森光弘, 小林文男, 稲葉央子: 日本獣医畜産大学紀要, 21, 179 (1972)
14. 川谷正允: 日農化, 47, 467 (1973)
15. 川谷正允, 日農化 47, 616 (1973)
16. 小林文男, 矢吹稔, 星野一雄, 坂本政義: 日農化, 49, 81, (1975)
17. 梁宰: 満州医学雑誌, 26, 799 (1936)
18. 寺田文次郎, 梁宰: 満州医学雑誌, 28, 1181 (1938)
19. Sheehan J.C. and G.P.Hess: J.Am.Chem.Soc., 77, 1069 (1955)
20. 松谷衛, 竹久元彬, 福波黎子, 島未明, 菊川縫子: 臨床検査, 11, 92 (1967)
21. Kodama O., K.Sugawara and T.Ouchi: Sci. Rep.Fac.Agr.Ibaraki Univ., 20, 31 (1972)
22. Metheson A.T. and L.B.Tattrie: Can.J. Biochem., 42, 951 (1965)
23. Lowry O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall, J.Biol.Chem 193, 265 (1951)
24. Davis B.J.: Ann.New York Acad.Sci., 121 406 (1946)
25. Verterberg O. and H.Svensen: Acta Chem. Scand., 20, 820 (1966)
26. Andrews P.: Biochem.J., 91, 222 (1963)
27. Morris A.J.: Biochem.J., 81, 606 (1961)
28. Hiramatsu A.: J.Biochem., 61, 168 (1967)
29. Sobel R.E. and A.S.Brecher: Can.J.Biochem., 49, 676 (1971)
30. Kim Y.S. and E.J.Brophy: J.Biol.Chem., 251, 3199 (1976)
31. Hanson H. and H-J. Hütter: Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., 347, 118 (1966)
32. Melius P., M.H.Moseley and D.M.Brown: Biochim.Biophys.Acta, 221, 62 (1970)
33. Nakagawa S. and H.Tsuji: Clin.Chim.Acta, 13, 155 (1966)
34. Hanson H., D.Hlässer, M.Hadewig, N-G. Mannsfeldt and M.John: Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., 348, 689 (1967)
35. Kettann U. and H.Hanson: FEBS Letters, 10, 17 (1970)
36. Minamiura N., Yamamoto T. and J.Fukumoto: Agr.Biol.Chem., 30, 186 (1966)
37. Ouchi T.: Agr.Biol.Chem., 26, 728 (1962)
38. 森原和之, 続木博茂: 塩野義研究所年報, 13, 91 (1963)
39. Ehmman K.E., H.Uhlig and K.Lehmann: Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., 350, 99 (1969)
40. Prescott M.J. and S.H.Wilkes: Arch. Biochem. Biophys., 117, 328 (1967)
41. Burger W.C., N.Prentice and M.Moeller: J.Inst.Brewing, 77, 291 (1971)
42. 大内毅, 平松昭: 茨大農学術報告, 5, 53 (1957)
43. Hopsu V.K., K.K.Makinen and G.G.Glenner: Arch. Biochem. Biophys., 114, 557, and 567 (1966)
44. Makinen K.K.: Arch. Biochem. Biophys. 126, 803 (1968)

Summary

1. Aminopeptidase I and II [EC 3.4.1 group] were isolated from the homogenate of *Agrocybe tuberosa* by the chromatography on a column of DEAE—cellulose and gel filtration on Sephadex G-100 . The purified aminopeptidase I was homogeneous by disc electrophoresis and purified about 45 fold. The purified aminopeptidase II was nearly homogeneous by disc electrophoresis and purified about 32 fold.
2. The purified aminopeptidase I had optimum activity at pH 7.0 on 37 °C and exhibited a high activity against H-Phe- β -NA and H-Leu- β -NA. The molecular weight and isoelectric point of the enzyme were estimated to be about 58,000 and pH 4.7, respectively
3. The purified aminopeptidase II had optimum activity at pH 7.0 on 37 °C and exhibited a high activity against H-Arg- β -NA, H-Lys- β -NA, H-Met- β -NA, and H-Ala- β -NA. The molecular weight of the enzyme was estimated to be about 72,000.