

豚小腸粘膜のペプチダーゼに関する研究

第1報 可溶性区分のアリルアミダーゼ の2・3の性質

長谷川喜斐*・児玉 治・赤塚尹己

Studies on Hog Small Intestinal Mucosa Peptidases

I. Some properties of soluble arylamidases

YOSHII HASEGAWA, OSAMU KODAMA, TADAMI AKATSUKA

1. 緒 言

食品中のタンパク質が体内において消化・吸収される場合タンパク質分解酵素類の関連は極めて深く、特に小腸粘膜においてタンパク質の分解産物であるペプチド類の水解に当りアミノペプチダーゼは重要な役割をはたしていると考えられる。¹⁾²⁾

小腸粘膜のペプチダーゼは主に Brush border 膜に結合している場合と細胞質の可溶性区分に存在する場合の2通りの場合があり、Brush border 膜に結合しているペプチダーゼと可溶性のペプチダーゼとは異なる性質を有すると報告されている。^{3)~6)}特に膜結合酵素は可溶性酵素よりトリペプチドを良く水解するが、逆に可溶性酵素が膜結合酵素よりジペプチドを良く水解することが知られている。⁶⁾可溶性酵素と膜結合酵素が小腸粘膜においてそれぞれの機能を有するとすれば、可溶性酵素と膜結合酵素をそれぞれ分離してその性質を比較検討することは重要な課題と考えられる。

豚小腸粘膜の可溶性ジペプチダーゼの精製はNoren⁷⁾により報告されている。本酵素はロイシル- β -ナフチルアミドおよびロイシル- 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かった。一方Maroux

⁹⁾は豚小腸の Brush border 膜に結合しているアミノペプチダーゼの可溶化と精製について報告している。本酵素の分子量は約280,000であり、ジペプチダーゼ活性、トリペプチダーゼ活性およびアリルアミダーゼ活性のいずれも確認された。Kim¹⁰⁾はラット小腸の Brush border 膜結合ペプチダーゼの可溶化と精製を行い、等電点が異なり分子量の等しい2種のペプチダーゼの存在を明らかにした。

今回著者らは豚小腸粘膜の抽出液の可溶性区分に2種のアリルアミダーゼが存在することを見出し若干の性質を明らかにした。また105,000 \times g沈殿区分の膜結合のアリルアミダーゼと比較した結果についても報告する。

2. 実験方法

(A) 試料

屠殺直後の豚小腸粘膜を用いた。

(B) 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粘膜をはぎとりピーカーに集めてこれに3倍量の冷 $1/15$ 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3枚重ねのガーゼで濾過し濾液を酵素液として以後の実験に供した。

* 福島県立会津短期大学

(C) ゲル濾過法による分子量の推定

Andrews¹¹⁾の方法に従って行った。すなわち各種標準タンパク質5mgを2mlの1/15 Mリン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解し、同緩衝液で緩衝化したSephadexG-200のカラム (2×50 cm) にかかけ、14 ml/hrの流速で溶出し、3.9 mlずつ採取した。標準タンパク質としては、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社) およびヘモグロビン (分子量: 64,000, 牛血液, Sigma社) を用いた。ウレアーゼ活性はVanslyke¹²⁾の方法、カタラーゼ活性はBeers¹³⁾の方法により測定し、溶出位置を求め、ヘモグロビンの溶出位置は、410 nmの吸光度より求めた。

(D) 酵素活性の測定

(i) アミノ酸-β-ナフテルアミドを基質にした場合:
松谷ら¹⁴⁾の方法を改良した児玉ら¹⁵⁾の方法に従った。すなわち試験管に 6×10^{-4} Mのロイシル-β-ナフテルアミド溶液 0.1 ml および 1/15 Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 0.4 ml を加え 40℃ 5分間ブレインキュベートした後、基質緩衝液に酵素液 0.1 ml を加え酵素反応を開始し一定時間後、反応混液より 0.2 ml を 0.2 N HCl 溶液 0.2 ml を含む試験管にとり反応を停止させ 0.05% p-ジメチルアノ桂皮アルデヒド・エタノール溶液 2.5 ml を加え 15分間室温で放置後 540 nm で比色定量した。

(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 6×10^{-4} Mのアミノ酸-p-ニトロアニリド溶液 0.4 ml および 1/15 Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 1.6 ml を加え 40℃ 5分間ブレインキュベートした後、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 $8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ¹⁶⁾ 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 当たり 1 分間に 1 μmole の β-ナフテルアミドまたは p-ニトロアニリンを遊離する酵素量を 1 単位とした。

(E) タンパク濃度の測定

牛血清アルブミンを標準物質として、Lowry法¹⁷⁾により測定した。

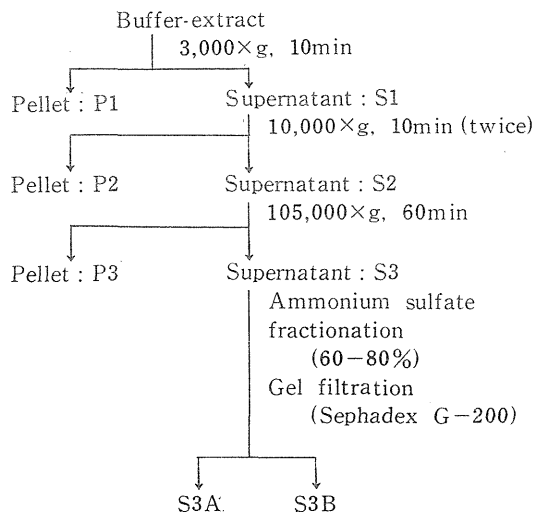


Fig. 1. Flow Diagram for the Fraction of Buffer-extract of Hog Small Intestinal Mucosa.

豚小腸粘膜の抽出液を Fig.1 に従って分画した。すなわち抽出液を 3,000×g, 10分間遠心分離し沈殿区分を分画 P1 とし上澄区分を分画 S1 とした。分画 S1 をさらに 10,000×g, 10分間遠心分離し得られた沈殿物を 1/15 Mリン酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁後再び 10,000×g, 10分間遠心を行い沈殿区分を分画 P2, 2回の 10,000×g の遠心分離で生じた上澄液を合わせた区分を分画 S2 とした。分画 S2 をさらに 105,000×g, 60分間遠心分離を行い沈殿区分を分画 P3 とし、上澄区分を分画 S3 とした。

Table 1. Activities towards Leu-β-naphthylamide in Fractions derived from the Buffer-extract of a Hog Small Intestinal Mucosa

Fraction	Activity
S1	78
P1	22
S2	81
P2	19
S3	56
P3	44

The separation of the fractions is illustrated in Fig.1. Table I indicates the distribution of percent activity for Leu-β-naphthylamide between pellet and supernatant after each centrifugation.

3. 実験結果と考察

Table I に 3,000×g, 10,000×g および 105,000×g の遠心におけるそれぞれの沈殿区分および上澄区分のアリルアミダーゼ活性の分布を示した。この結果 3,000×g および 10,000×g の遠心分離においては上澄区分にアリルアミダーゼ活性が強く認められ、105,000×g の遠心では沈殿区分(分画P3)および上澄区分(分画S3)のいずれにもほぼ等しいアリルアミダーゼ活性が認められた。

分画S3をさらに0-40%, 40-60%および60-80%飽和の硫酸分画を行い総活性および比活性のいずれも高い60-80%飽和の硫酸沈殿区分を $1/15$ Mリン酸緩衝液(pH7.0)に対して一昼夜透析を行いさらにSephadex G-200によるゲル濾過を行った。その結果をFig. 2 に示した。活性のピークが2つ認められ溶出

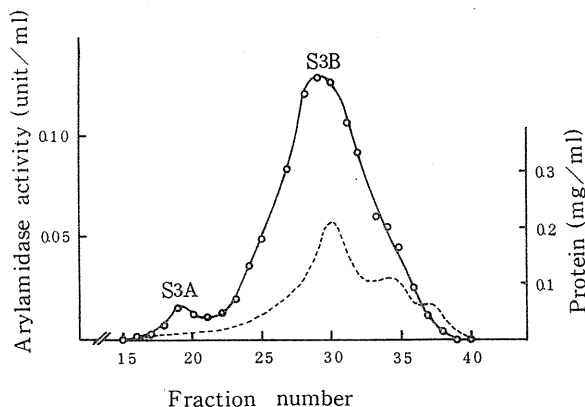


Fig.2. Gel Filtration of Arylamidases of Fraction S3 on Sephadex G-200.

A column of Sephadex G-200 (2×50cm) was equilibrated with $1/15$ M phosphate buffer (pH7.0). Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 14ml/hr.

.....protein, —○— arylamidase activity.

順序に従いそれぞれの分画を、分画S3Aおよび分画S3Bとした。分画S3Aはカラムの排除容量(Void Volume)に溶出し分画S3Bの溶出量は113mlであり、分画S3Bの分子量はAndrewsの方法より求めた結果、約13万と推定された(Fig.3)。

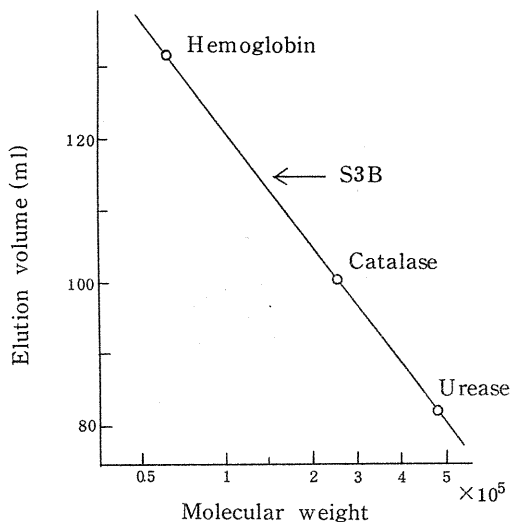


Fig.3. Molecular Weight Estimation of Fraction S3B by the Gel Filtration on Sephadex G-200.

The enzyme and the standard protein solutions were applied to the column (2×50cm) equilibrated with $1/15$ M phosphate buffer, pH7.0.

以後、Sephadex G-200により分画した分画S3A、分画S3Bおよび105,000×gの沈殿区分であるP3区分のそれぞれのアリルアミダーゼの性質を比較した。

Table II に数種のアミノ酸のp-ニトロアニリドおよびロイシル-β-ナフチルアミドに対する各分画のア

Table II. Substrate Specificity of Arylamidase Fractions

Substrate	Relative activity (%)		
	S3A	S3B	P3
Leu- <i>p</i> -nitroanilide	100	100	100
Ala- <i>p</i> -nitroanilide	107	44	98
Glu- <i>p</i> -nitroanilide	2	1	7
Lys- <i>p</i> -nitroanilide	32	101	43
Leu-β-naphthylamide	115	127	112

The final substrate concentration was 1×10^{-4} M. The assay conditions were described in "Experimental method 2-(D)." Relative activity was calculated with activity against Leu-*p*-nitroanilide taken as 100.

リルアミダーゼの基質特異性を示した。分画S3Aおよび分画P3の基質特異性はほぼ同じ傾向を示し、ロイシル-*p*-ニトロアニリドおよびアラニル-*p*-ニトロアニリド等の中性アミノ酸の*p*-ニトロアニリドを良く水解した。分画S3Bは塩基性アミノ酸であるリジンの*p*-ニトロアニリドをロイシル-*p*-ニトロアニリドと同程度に良く水解した。グルタミル-*p*-ニトロアニリドはいずれの分画によってもほとんど水解されなかった。ロイシル-*p*-ニトロアニリドおよびロイシル- β -ナフチルアミドの水解を各分画を用いて比較したがほぼ同じ水解度を示した。

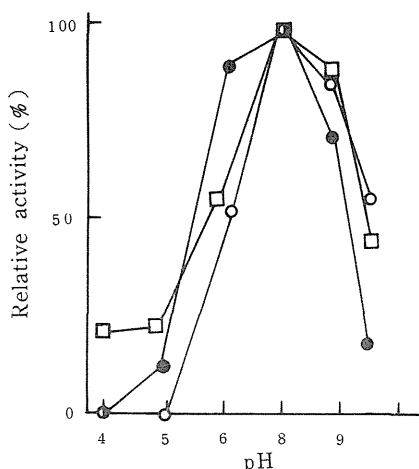


Fig. 4. Effect of pH on the Activity of Arylamidase.

Enzymatic activities were determined with Leu-*p*-nitroanilide as a substrate. Buffers used were acetate buffer (pH 4.0-5.0), phosphate buffer (pH 6.0-7.0) and veronal buffer (pH 8.0-8.5).

—○— S3A, —●— S3B, —□— P3

次に酵素活性におよぼす pH の影響を Fig. 4 に示した。分画 P3 および分画 S3A の至適 pH は 7.0-7.5 付近、分画 S3B の至適 pH は 6.5-7.0 付近に認められた。

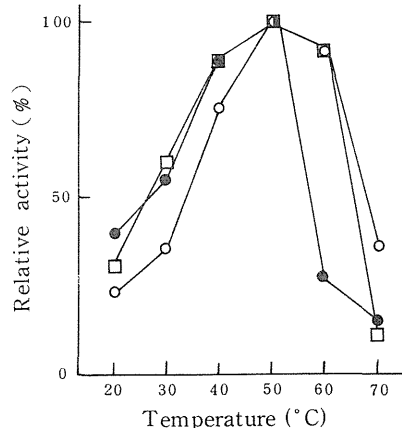


Fig. 5. Effect of Temperature on the Activity of Arylamidase.

Enzymatic activities were determined with Leu-*p*-nitroanilide as a substrate.

—○— S3A, —●— S3B, —□— P3

Fig. 5 に酵素反応におよぼす温度の影響を示した。いずれの分画も約 50 °C 付近に活性発現の最適温度が認められた。分画 S3B は 60 °C において急激な活性の低下が認められ、分画 S3A および分画 P3 に比較し熱に不安定な傾向を示した。

なお Norén⁷⁾ はラット小腸粘膜の結合ペプチダーゼが可溶性ペプチダーゼより熱に対して安定であると報告している。

各分画のアリルアミダーゼ活性に及ぼす各種試薬の影響を調べた結果が Table III である。分画 S3B は 2-メル

Table III. Effect of Various Reagents on the Activity of Arylamidase Fractions

Reagents	Remaining activity (%)		
	S3A	S3B	P3
None (control)	100	100	100
Ethylenediaminetetraacetate (EDTA)	64	20	80
<i>o</i> -Phenanthroline	52	65	53
<i>p</i> -Chloromercuribenzoate (PCMB)	84	23	78
2-Mercaptoethanol	105	167	104
Diisopropylfluorophosphate (DFP)	91	88	96

Mixtures of arylamidase fractions and indicated reagents at concentrations of 1×10^{-4} M (pH 7.0) were preincubated for 10 min at room temperature. After incubation, each activity for Leu-*p*-nitroanilide (1×10^{-4} M) was assayed by spectrophotometric method, and compared with a control.

カプトエタノールにより活性化を受けさらにPCMBにより阻害が認められることから本酵素の活性発現にSH基が関与していると考えられる。分画S3Aおよび分画P3はEDTAよりも α -フェナントロリンにより阻害を受けやすいが分画S3Bは逆に α -フェナントロリンよりもEDTAにより著しく阻害を受けた。有機リン剤であるD

FPによってはいずれの分画もほとんど影響を受けなかった。

Smith¹⁸⁾らは小腸粘膜の可溶性のロイシンアミノペプチダーゼが Mn^{2+} および Mg^{2+} により活性化することを報告した。又ラット肝臓および腎臓のアリルアミダーゼも Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} 等により著しい活性化が認められ

Table V. Effect of Various Metal Ions on the Activity of Arylamidase Fractions

Metal Ions	Relative activity (%)					
	S3A		S3B		P3	
	Leu-p-NA	Lys-p-NA	Leu-p-NA	Lys-p-NA	Leu-p-NA	Lys-p-NA
None	100	100	100	100	100	100
CoCl ₂	95	102	107	104	58	53
ZnSO ₄	101	108	104	82	102	101
MgSO ₄	107	111	106	115	81	67
MnCl ₂	101	110	106	106	81	67
HgCl ₂	23	32	10	29	8	6

Mixtures of arylamidase fractions and indicated metal ions at concentrations 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 ($1 \times 10^{-4} M$) and Lys-p-nitroanilide ($1 \times 10^{-4} M$) was assayed by spectrophotometric method, and compared with a control. (NA: nitroanilide)

¹⁹⁾た。

著者らも Table V に示した様にロイシル-p-ニトロアニリドおよびリジル-p-ニトロアニリドを基質として金属イオンの影響を検討したが顕著な活性化は認められなかった。

Smithらは基質にロイシルグリシンを使用して金属イオンの影響を検討していることから、著者らがアミノ酸のp-ニトロアニリドを基質として活性を測定した為、アリルアミダーゼはロイシンアミノペプチダーゼと同一の酵素でありながら基質の違いにより金属イオンによる活性化が認められないのか、あるいはアリルアミダーゼがSmithらの報告したロイシンアミノペプチダーゼと異なる酵素であるかを今後明らかにする必要がある。

4. 文 献

- Kim, Y.S., J.A.Nicholson, and K.J.Curtis: Med.Clin.N.Am., **58**, 1397 (1974)
- Adibi, S.A. and D.W.Mercer: Biochem.J., **120**, 195 (1970)
- Peters, T.J: Biochem. J., **120**, 195 (1970)
- Kim, Y.S., W.Bitwhistle, and Y.W.Kim: J. Clin.Invest., **51**,1419 (1970)
- Heizer, W.D., R.L.Kerley, and K.J.Isselbacher: Biochim. Biophys. Biophys.Acta., **264**, 450 (1972)
- Kim, Y.S., Y.W.Kim, and M.H.Sleisenger: Biochim. Biophys. Acta., **370**, 283 (1974)
- Noren, O., H.Sjostrom, and L.Josefsson: Biochim. Biophys. Acta., **327**, 446 (1973)
- Patterson, E.K., S.H.Hsiao, and A.keppel: J. Biol. Chem., **238**, 3611 (1963)
- Maroux, S., D.Louvard, and J.Baratti: Biochim. Biophys. Acta., **321**, 282 (1973)
- Kim, Y.S. and E. Brophy: J. Biol. Chem., **251**, 3199 (1976)
- Andrews, p: Biochem. J., **91**, 222 (1964)
- Vanslyke, D.D. and R.M. Archibald: J. Biol. Chem., **154**, 623 (1944)
- Beers, R.F., Jr. and I.W. Sizer: J. Biol. Chem., **195**, 133 (1952)

- | | |
|---|---|
| <p>14) 松谷 衛・竹久元彬・福波黎子・島末 明・菊川 縫子：臨床検査., 11, 92 (1967)</p> <p>15) Kodama, O., K.Sugawara, and T.Ouchi : Scientific Reports of the Faculty of Agriculture Ibaraki University., 20, 41 (1972)</p> <p>16) Erlanger, B.F., N.Kakowsky, and W.Cohen : Arch.Biochem.Biophys., 95, 271 (1961)</p> | <p>17) Lowry, O.H., N.J.Rosebrough., A.L.Farr, and R.J.Randall : J.Biol.Chem., 193, 265 (1951)</p> <p>18) Smith, E.L. and M.Bergmann : J.Biol.Chem., 153, 627 (1944)</p> <p>19) Mahadevan, S. and A.L.Tappel : J.Biol.Chem., 242, 2369 (1967)</p> |
|---|---|

Summary

Two fractions (S3A, S3B) of arylamidase were separated from the soluble fraction of buffer-extract of a hog small intestinal mucosa by ammonium sulfate fractionation and gel filtration on Sephadex G-200.

Fraction S3A was taken as the void volume of the column of Sephadex G - 200, and hydrolyzed both Leu-*p*-nitroanilide and Ala-*p*-nitroanilide. This arylamidase was not activated by various metal ions and 2-mercaptoethanol.

Fraction S3B was taken about 110ml-115ml of the Sephadex G - 200 column. Accordingly, the molecular weight of this enzyme was estimated to be about 130,000. This enzyme hydrolyzed both Leu-*p*-nitroanilide and Lys-*p*-nitroanilide and was strongly inhibited by EDTA and PCMB, however the remarkable activation of this enzyme was found by the addition of 2-mercaptoethanol.