[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol.58, No. 1, pp. 9~16, 1984]

ブタ小腸粘膜のペプチダーゼに関する研究 可溶性トリペプチダーゼの精製と若干の性質

長谷川喜斐*, 志賀利勝, 児玉 治, 赤塚尹巳

(*福島県立会津短期大学, 茨城大学農学部)

昭和 58 年 8 月 8 日 受 理

Studies on Peptidases of Hog Small Intestinal Mucosa Purification and Some Properties of Tripeptidase in Soluble Fraction

Yoshii HASEGAWA*, Toshikatsu SHIGA, Osamu KODAMA
and Tadami AKATSUKA

*Aizu Junior College of Fukushima Prefecture, Aizuwakamatsu, 965

Department of Agricultural Chemistry, Ibaraki University, Ami, Ibaraki 300-03

Tripeptidase [EC 3.4.1.3] in the cytosol fraction of hog small intestinal mucosa was purified by DEAE-cellulose column chromatography, Cellulofine GC-100 gel filtration, preparative electrofocusing, Sephadex G-150 gel filtration and affinity chromatography using Octylamino Sepharose 4B. The overall procedure gave on approximately 12-fold purification, and the purified enzyme was found to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of this enzyme was estimated to be about 45,000 by gel filtration. The optimum pH, optimum temperature and apparent K_m value of this tripeptidase were 7.5, 45°C and 0.927 mM, respectively. Inhibition was found by the addition of pCMB and Hg^{2+} , while no inhibition was found by EDTA and other metal chelating agents. Among the several tripeptides tested, Leu-Gly-Gly and Ala-Gly-Gly were hydrolyzed rapidly but Gly-Gly-Gly hydrolyzed slowly. No activity was found against dipeptides, acyltripeptide and tripeptideamide.

(Received August 8, 1983)

緒 言

ブタ小腸粘膜のペプチダーゼに関する研究は古くから行われ, Smith および Bergmann⁽¹⁾ ならびに Johnson⁽²⁾ の報告がある。しかし, これらの研究は酵素を精製し, 酵素の詳細な性質を明らかにしたものではなく, また, 酵素の局在性についても不明であった。

最近にいたりブタ小腸粘膜のペプチダーゼに関する研究の見直しが行われ, Noren ら⁽³⁾ による可溶性ジペプチダーゼの精製と特異性について報告され, Sjöström ら⁽⁴⁾ により可溶性プロリダーゼの精製と特異性について報告された。

一方, Maroux ら⁽⁵⁾ によりブタ小腸の brush border 膜結合ペプチダーゼに関する研究が報告された。

膜結合ペプチダーゼにはアミノペプチダーゼ, アリルアミダーゼ, ジペプチダーゼ, トリペプチダーゼを含んでいるが, 彼らはとくにアミノペプチダーゼを可溶化して精製を行い, その性質について報告した。

この報告はブタ小腸粘膜のペプチダーゼを膜結合酵素と可溶性酵素とに分画し, 可溶性画分に含まれるトリペプチダーゼ [EC 3.4.1.3] について初めてディスク電気泳動の均質な酵素タンパク質として精製し, 本酵素の若干の性質を明らかにしたものである。

試料および方法

1. 試料 屠殺直後のブタ小腸粘膜を使用した。なお, この試料はコアミ畜産より恵与された。

2. 試薬 DEAE-cellulose は Whatman Chemical

Corporation 製, Cellulofine GC-100 は生化学工業製および Sephadex G-150 は Pharmacia Fine Chemicals 製のものをそれぞれ実験に使用した。基質として用いたペプチド類は著者らにより合成したものである。

基質特異性の実験に使用したペプチド類の名称および略号は次のようである。

L-leucylglycylglycine (Leu-Gly-Gly),
L-leucylalanylglycine (Leu-Ala-Gly),
L-alanylglycylglycine (Ala-Gly-Gly),
glycylglycylleucine (Gly-Gly-Leu),
glycylglycylglycine (Gly-Gly-Gly),
L-leucylglycylglycineamide (Leu-Gly-Gly-NH₂),
carbobenzoxy-L-leucylglycylglycine (Z-Leu-Gly-Gly),
L-leucylglycine (Leu-Gly),
L-alanylglycine (Ala-Gly).

また, L-アミノ酸オキシダーゼ, 西洋ワサビパーオキシダーゼ, O-ジアニジンは Sigma Chemical Company よりそれぞれ購入した。Octylamino Sepharose 4 B は Jennissen および Heilmeyer ら⁽⁶⁾の方法に従って合成したものを使用した。

3. 粗酵素液の調製 屠殺直後のブタの胃の末端部より約 5 cm 下から約 50 cm の小腸部分を取り, 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 0.25 M sucrose を含む冷 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えホモジナイザーを用いて摩砕し, 二枚重ねのガーゼで濾過した。次にこの濾液を 600×g, 10 分間遠心分離し, 上澄液を 10,000×g, 20 分間遠心分離し, 得られた上澄液を 105,000×g, 60 分間遠心分離した。得られた上澄液を pH 8.0 に調整した液を粗酵素液として使用した。

4. 酵素活性の測定

(1) 酵素法 Nicholson および Kim の方法⁽⁷⁾に準じて行った。すなわち, 試験管に 10 mm の基質を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 0.25 ml および L-アミノ酸オキシダーゼ試薬 0.5 ml を加え, 40°C, 5 分間放置後, 酵素液 25 μ l を加え酵素反応を開始し, 10 分間反応させた。40% 硫酸溶液 0.5 ml を加え反応を停止させた後, 10 分間室温で放置し, 530 nm で吸光度を測定した。1 分間に 1 μ mol のロイシンを遊離する酵素量を 1 単位とした。

L-アミノ酸オキシダーゼ試薬の調製法は次のごとくである。L-アミノ酸オキシダーゼ 21.2 mg (約 7 ユニット), 西洋ワサビパーオキシダーゼ 1.3 mg (約 400 ユニット) および 1 ml のエタノールに溶解した O-ジアニジン 6.6 mg を 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に溶解し, 同緩衝液により 65.5 ml とした。

(2) ニンヒドリン法 試験管に 1 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 0.41 ml および酵素液 50 μ l を加え 40°C, 5 分間放置後, 2.5 mM の基質溶液 40 μ l を加え酵素反応を開始し 20 分間反応させた。反応終了後, 1 ml のニンヒドリン溶液を加え 100°C, 10 分間加熱後水冷し, 2.5 ml の 50% アセトン溶液を加え 575 nm の吸光度を測定し, 1 分間に 1 μ mol のアミノ酸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製法は次のようにして行った。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を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第一スズ粉末を約 0.1% になるように加えた。

5. タンパク質濃度の測定 ウシ血清アルブミンを標準物質として, Lowry 法⁽⁸⁾およびウシ血清アルブミンを標準物質とした Bio Rad 社の Bio Rad Protein Assay 法⁽⁹⁾により測定した。

6. 電気泳動的等電点分画 Vesterberg および Svensen の方法⁽¹⁰⁾により行った。

7. ディスク電気泳動 Davis⁽¹¹⁾の方法に準じて行った。すなわち, 7.5% ポリアクリルアミドを用い, pH 8.3 で, カラム当り 2 mA, 約 75 分間通電した。ゲルは 0.5% アミドブラック 10 B で染色し, 7% 酢酸で脱色した。

8. 分子量の推定 Andrews⁽¹²⁾の方法に準じて酵素タンパク質の分子量を推定した。標準タンパク質としてアルカリホスファターゼ (分子量, 115,000), 卵アルブミン (45,000), チトクローム c (13,000) を使用した。

アルカリホスファターゼ活性は Garen ら⁽¹³⁾の方法, 卵アルブミンは 280 nm 吸光度測定, チトクローム c は 410 nm 吸光度測定によりそれぞれの溶出量を求めた。

実験結果

1. 可溶性トリペプチダーゼの精製

pH 8.0 に調整した粗酵素液を, あらかじめ 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した DEAE-cellulose

Fig.1. DEAE-Cellulose Column Chromatography of Peptidases from Hog Small Intestinal Mucosal Extracts. A DEAE-cellulose column was equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 8.0). The column was washed with the same buffer and developed in a linear gradient formed from 400 ml of the same buffer in the mixture, and 400 ml of the same buffer containing 0.3 M NaCl in the reservoir. The flow rate was 38 ml per hr and fractions of 7.6 ml were collected. O, Leu-Gly-Gly splitting activity; ●, Leu-Gly splitting activity; ----, protein concentration.

Fig.2. Gel Filtration of Peptidases of Fraction No. 24~No. 31 of DEAE-Cellulose Column Chromatography on Cellulofine GC-100. The fraction of No. 24 to No. 31 obtained by a DEAE-cellulose eluate was concentrated by ultrafiltration and applied to a column (2.0×52 cm) of Cellulofine GC-100, equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 8.0). The flow rate was 12 ml per hr and fractions of 4.4 ml were collected.

カラム (2.5×23 cm) に吸着させた。吸着したペプチダーゼは、同緩衝液中の塩化ナトリウム濃度を 0~0.3 M の範囲で直線的に上昇させて溶出した。その結果を Fig. 1 に示した。

Fig.3. Preparative Electrofocusing of Peptidases of Fraction No. 14~No. 16 of Cellulofine GC-100 Gel Filtration. The density gradient was formed by 0~45% sucrose solution containing of 0.68% Ampholine pH 4~6.5 in a 150 ml column. Condition: initial voltage 300 V, constant voltage 700 V, conducted at 4°C for 24 hr. Fractions of 3.0 ml were collected.

最初にトリペプチダーゼ活性を示すピークが現れ、次にトリペプチダーゼおよびジペプチダーゼ活性を示すピークが認められた。トリペプチダーゼ活性を示すピーク (Fraction No. 24~No. 31) を限外濾過法 (東洋ウルトラフィルター UK-10) により濃縮し、濃縮液を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した Cellulofine GC-100 によるゲル濾過を行った。その結果を Fig. 2 に示した。次に Cellulofine GC-100 のゲル濾過によって得られた

Fig. 4. Gel Filtration of Peptidases of Fraction No. 17~No. 19 of Preparative Electrofocusing on Sephadex G-150. The fraction of No. 17 to No. 19 obtained by preparative electrofocusing was applied to a column (2.3×58 cm) of Sephadex G-150, equilibrated with 0.01M phosphate buffer (pH 8.0). The flow rate was 12 ml per hr and fraction of 4.4 ml were collected.

トリペプチダーゼ活性区分 (Fraction No. 14~No. 16) を電気泳動的等電点分画を行い、得られた結果を Fig. 3 に示した。

Fig. 3 に見られるようにトリペプチダーゼの等電点は pH 4.90 であった。また、トリペプチダーゼ活性を示すピークとタンパク質のピークはこの段階では一致しなかった。そこで等電点分画法によって得られたトリペプチダーゼ活性区分 (Fraction No. 17~No. 19) を Sephadex G-150 (0.01 M リン酸緩衝液, pH 8.0 で平衡化した) によるゲル濾過を行った結果を Fig. 4 に示した。

トリペプチダーゼ活性を示すピークとタンパク質のピークは一致したが、なお若干のジペプチダーゼ活性が認められた。

次に Sephadex G-150 のゲル濾過によって得られたトリペプチダーゼ活性区分 (Fraction No. 29~No. 34) を、

Fig. 5. Affinity Chromatography of Tripeptidase of Fraction No. 26~No. 33 of Sephadex G-150 Gel Filtration on Octylamino Sepharose 4 B. An Octylamino Sepharose 4 B column (2×14 cm) was equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 8.0). The column was washed with the same buffer and eluted with the same buffer containing 0.2 M NaCl. The flow rate was 12 ml per hr and fraction of 4.4 ml were collected.

あらかじめ 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した Octylamino-Sepharose 4 B によるアフィニティクロマトグラフィーを行った。その結果は Fig. 5 に示した。

Fig. 5 に示したように、トリペプチダーゼ活性を示すピークと酵素タンパク質を示すピークは完全に一致した。また、ジペプチダーゼ活性は全く認められなかった。この結果トリペプチダーゼは精製されたと考えられる。

以上のトリペプチダーゼの精製段階における酵素活性、比活性、酵素タンパク質濃度、収率等を Table I にまとめた。

収率は DEAE-cellulose 吸着溶出トリペプチダーゼ活性区分から算出すれば 5% であり、比活性は約 7 倍であった。

次に得られた最終酵素液の均一性を確かめるためにディスク電気泳動を行った。その結果、Fig. 6 に示したように、本酵素は単一バンドを示し、電気泳動的に均質であることが認められた。

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

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)
DEAE-cellulose chromatography	5.87	24.0	4.09	100
Cellulofine GC-100 chromatography	1.78	5.5	3.09	23
Electrofocusing	—	4.3	—	18
Sephadex G-150 chromatography	0.20	3.1	15.5	13
Octylamino-Sepharose 4 B chromatography	0.044	1.2	27.3	5

2. 分子量の推定

分子量既知の標準タンパク質とともに Sephadex G-150 を用いたゲル濾過法で、分子量の測定を行った結果を Fig. 7 に示した。卵アルブミンと同じ fraction に溶出されたので、本酵素の分子量は約 45,000 と推定された。

3. 至適 pH

酵素活性に及ぼす pH の影響を調べた結果を Fig. 8

Fig. 6. Acrylamide Gel Electrophoresis of the Final Preparation and Measurement of Activity in Eluates from Gel Segment. Fraction No. 34 from the Octylamino Sepharose B4 was concentrated with the Minicon (B15) and then the sample was applied on the top of the gel. Electrophoresis was conducted at 2 mA per tube for 75 min.

Fig. 7. Estimation of Molecular Weight of Tripeptidase by Gel Filtration on Sephadex G-150. The enzyme and standard protein solutions were applied to the column (2.0×50.5 cm) equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 8.0) and elution was performed with the same buffer. A, cytochrome *c* (horse); B, egg albumin; C, alkaline phosphatase (calf intestine); X, tripeptidase.

にまとめた。活性発現の最適 pH は 7.5 付近であった。

4. 至適溫度

酵素反応に及ぼす温度の影響を pH 8.0, 30 分間の反応で調べた結果を Fig. 9 に示した. その結果, 活性発現の最適温度は 45°C 付近に認められ, 比較的耐熱性の酵

Fig. 8. Effect of pH on the Activity of Tripeptidase. The activity was assayed with Leu-Gly-Gly as a substrate at various pH values at 40°C for 30 min. The activity assayed at pH 7.0 was expressed at 100%. Buffers used were 0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ buffer (pH 6.0~9.0) and 0.05 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ buffer (pH 10.0).

Fig. 9. Effect of Temperature on the Activity of Tripeptidase. The activity was assayed with Leu-Gly-Gly as a substrate at various temperature for 30 min in 0.001 M phosphate buffer (pH 8.0). The activity assayed under the standard condition (at 50°C) was expressed at 100%.

Fig. 10. Apparent K_m Value of Tripeptidase. The activity was assayed with Leu-Gly-Gly as a substrate at various concentration (0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM and 10 mM).

素であると判断された。

5. K_m 値の測定

K_m 値の測定をロイシル-グリシル-グリシンを基質として、基質濃度 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 10 mM の 4 点で pH 8.0, 40°C の条件下で 5 分間の反応で調べた結果を Fig. 10 に示した。

Fig. 10 より $K_m = 0.927$ mM と算出された。

6. 各種金属イオンの影響

酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を pH 8.0 で各種金属塩化物とともに 10 分間室温でブレインキューベートした後に 40°C, 30 分間の酵素反応で調べた。その結果を Table II に示した。本酵素活性は 0.1 mM の金属イオン濃度において、 Hg^{2+} によって著しい活性の阻害が認められた。

7. 各種試薬の影響

酵素活性に及ぼす各種試薬の影響について、金属イオンの場合と同一な方法で測定し、その結果を Table III に示した。

キレート試薬である EDTA によって阻害は受けなかった。また、SH 試薬である 0.1 mM 濃度の PCMB により著しい阻害を受けた。また、有機リン剤である DFP, ハロゲン化スルホニルである PMSF により阻害を受けなかった。

Table II. Effect of Various Metal Ions on the Activity of Tripeptidase

Metal ions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None		100
CoCl ₂	0.1	105
	1	35
ZnCl ₂	0.1	93
	1	20
MgCl ₂	0.1	98
	1	105
MnCl ₂	0.1	106
	1	102
HgCl ₂	0.1	20
KCl	0.1	109
CaCl ₂	0.1	91

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

Table III. Effect of Various Reagents on Activity of Tripeptidase

Reagents	Remaining activity (%)
None (control)	100
Ethylene diamine tetraacetate (EDTA)	91
<i>o</i> -Phenanthroline	102
<i>p</i> -Chloromercuribenzoic acid (PCMB)	18
<i>N</i> -Ethylmaleimide (NEM)	102
2-Mercaptoethanol	99
L-Cysteine	100
Diisopropylphosphofluoridate (DFP)	98
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	97
<i>N</i> -Tosyl-L-lysine	95
chloromethylketone (TLCK)	
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	94

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

8. 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。その結果を Table IV に示した。

本酵素はトリペプチドに作用し、ジペプチド、トリペプチドアミド、アシルトリペプチド等に作用しないことからトリペプチダーゼとみなされる。

Table IV. Action of the Tripeptidase on Various Peptides

Substrate	Relative activity (%)
Leu-Gly-Gly	100
Leu-Ala-Gly	82
Ala-Gly-Gly	71
Gly-Gly-Leu	40
Gly-Gly-Gly	25
Leu-Gly-Gly-NH ₂	0
Z-Leu-Gly-Gly	0
Leu-Gly	0
Ala-Gly	0

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

考 察

ブタ小腸粘膜の可溶性酵素画分からディスク電気泳動の均質な酵素として分子量約 45,000 のペプチダーゼを得た。本酵素はトリペプチダーゼに作用し、ジペプチド、トリペプチドアミド、アシルトリペプチド等に作用しないことからトリペプチダーゼとみなされる。

トリペプチダーゼは Fruton^(14,15) により calf thymus より得られ、また、Adams⁽¹⁶⁾ により equine erythrocytes から得られている。これらはいずれもエタノール沈殿法や硫酸分画法により部分精製されたもので、酵素タンパク質の純度については検討されていない。これらのトリペプチダーゼと著者らの精製したトリペプチダーゼの基質特異性の著しい差異は、前者はグリシル-グリシル-グリシンをよく水解するが後者はあまり水解しないことである。

これらの酵素活性に対する EDTA や金属の阻害はほとんどみられないことから金属酵素ではないと考えられる。

また、PCMB あるいは HgCl₂ により強い阻害を受けることから活性発現に SH 基の関与が示唆される。

DFP による阻害を受けないことから、いわゆるセリン酵素とは考えられない。

酵素の活性発現と活性中心の構造等に関する知見は今後の詳細な検討にまたねばならない。

また、ブタ小腸粘膜の可溶性画分から得られたトリペプチダーゼの小腸における役割についても今後の検討すべき課題であろう。

要 約

(1) 可溶性トリペプチダーゼをブタ小腸粘膜よりリン酸緩衝液 (0.01 M, pH 8.0) を用いて細胞分画法により抽出し、DEAE-cellulose イオン交換クロマトグラフィー、Cellulofine GC-100 ゲルフィルトレーション、電気泳動的等電点分画、Sephadex G-150 ゲルフィルトレーションおよび Octylamino-Sepharose 4B アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製酵素液は pH 8.3 のポリアクリルアミドゲルによるディスク電気泳動により均一であり、比活性は約 7 倍に増加した。

(2) 本酵素の分子量は約 45,000、至適 pH は 7.5、至適温度は 45°C、等電点は pH 4.90 であり、Km 値は 0.927 mM であった。

(3) SH 酵素の阻害剤の影響について検討した結果、PCMB および Hg²⁺ により阻害が認められた。

(4) 本酵素はトリペプチドに作用し、ジペプチド、トリペプチドアミド、アシルトリペプチド等に作用しないことからトリペプチダーゼと考えられる。

- (1) E. L. Smith and M. Bergmann: *J. Biol. Chem.*, **153**, 627 (1944).
- (2) M. J. Johnson: *J. Biol. Chem.*, **122**, 89 (1937).
- (3) O. Noren, H. Sjöström and L. Josefsson: *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 446 (1973).
- (4) H. Sjöström, O. Noren and L. Josefsson: *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 457 (1973).
- (5) S. Maroux, D. Louvard and J. Baratti: *Biochim. Biophys. Acta*, **321**, 282 (1973).
- (6) H. P. Jennissen, L. M. G. Heilmeyer, Jr.: *Biochemistry*, **14**, 4 (1975).
- (7) J. A. Nicholson and Y. S. Kim: *Anal. Biochem.*, **63**, 110 (1975).
- (8) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (9) M. Bradford: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- (10) O. Vesterberg, H. Svensen: *Acta. Chem. Scand.*, **20**, 820 (1966).
- (11) B. J. Davis: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 373 (1964).
- (12) P. Andrews: *Biochem. J.*, **96**, 595 (1965).
- (13) A. Garen and C. Levinthal: *Biochim. Biophys. Acta*, **38**, 470 (1960).
- (14) J. S. Fruton, V. A. Smith and P. E. Driscoll: *J. Biol. Chem.*, **173**, 457 (1948).
- (15) D. Ellis and J. B. Fruton: *J. Biol. Chem.*,

191, 153 (1951).

Biol. Chem., **199**, 845 (1952).

(16) E. Adams, N. C. Davis and E. L. Smith : *J.*