ノ ー ト

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi*
Vol. 58, No. 5, pp. 483~485, 1984]

麹菌(*Aspergillus oryzae*), 細菌(*Bacillus subtilis*) およびブタ腎臓のアミノペプチダーゼの各種合成基質に対する作用特性

長谷川喜斐*, 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 9 月 2 日 受 理

Substrate Specificity of Aminopeptidases from
Aspergillus oryzae, *Bacillus subtilis*
and Swine Kidney

Yoshii HASEGAWA*, Osamu KODAMA and
Tadami AKATSUKA

* Aizu Junior College of Fukushima Prefecture,
Aizuwakamatsu, Fukushima 965
Department of Agricultural Chemistry, Faculty
of Agriculture, Ibaraki University,
Ami-machi, Ibaraki 300-03

The substrate specificities of aminopeptidase from *Aspergillus oryzae* (AOP), aminopeptidase I and II from *Bacillus subtilis* (BSP-I, BSP-II) and leucine aminopeptidase from swine kidney (LAP) were investigated with various synthetic peptides.

AOP rapidly hydrolyzed tripeptides, such as Leu-Gly-Gly, Leu-Ala-Gly and Leu-Gln-Gly, and moderately hydrolyzed Gly-Gly-Val, Leu-Gly-Gly-NH₂, Ala-Leu-Gly and Ala-Gly-Leu. The enzyme slowly hydrolyzed Pro-Gln-Gly, Pro-Leu-Gly and Leu-Lys-Lys, but scarcely hydrolyzed Leu-Gly and Leu-NH₂.

BSP-I rapidly hydrolyzed Leu-Ala-Gly, Pro-Gln-Gly, Ala-Leu-Gly and Leu-Gln-Gly, and moderately hydrolyzed Leu-Gly-Gly and Ala-Gly-Leu, but scarcely hydrolyzed Leu-Gly and Leu-NH₂. BSP-II rapidly hydrolyzed Ala-Leu-Gly, Leu-Gly-Gly and Leu-Ala-Gly, and moderately hydrolyzed Gly-Gly-Val, Leu-Gln-Gly, Ala-Gly-Leu and Pro-Gln-Gly, but hardly hydrolyzed Leu-Gly and Leu-NH₂. BSP-I preferentially hydrolyzed Pro-Gln-Gly and Leu-Gln-Gly rather than BSP-II, while BSP-II hydrolyzed Ala-Leu-Gly, Ala-Gly-Leu, Gly-Gly-Val, Leu-Gly-Gly and Leu-Ala-Gly more rapidly than

BSP-I.

LAP preferentially hydrolyzed various oligopeptides that possessed L-Leu and L-Pro as the *N*-terminal amino acid, except Ala-Leu-Gly, and also hydrolyzed Leu-NH₂ and Leu-Gly-Gly-NH₂.

(Received September 2, 1983)

著者⁽¹⁾の一人は麹菌のアミノペプチダーゼの精製と性質について報告した。山本ら⁽²⁻⁴⁾は細菌 (*Bacillus subtilis*) のアミノペプチダーゼをアミノペプチダーゼ I および II に分離し精製を行いその性質について報告した。

本報告においては、これら 3 種のアミノペプチダーゼとブタ腎臓ロイシンアミノペプチダーゼ⁽⁵⁾ [EC 3.4.1.1] の 4 種類を精製酵素として用い、16 種類の合成ペプチド類に対する活性を調べ、これら酵素の基質特異性について比較検討した結果、興味ある作用特性を認めたのでここに報告する。なお、中台ら⁽⁶⁻⁸⁾は *Aspergillus oryzae* 460 を用いて特異的なロイシンアミノペプチダーゼ I, II, III を報告している。

麹菌 (*Aspergillus oryzae* RO-0129 A-2) のアミノペプチダーゼは著者らの方法⁽¹⁾により精製した酵素 (AOP と略称) を用いた。細菌 (*Bacillus subtilis*) のアミノペプチダーゼ I および II は大阪市立大学理学部教授山本武彦博士より提供された精製酵素 (BSP-I, II と略称) を用いた。ブタ腎臓ロイシンアミノペプチダーゼは Sigma Chemical Company より購入した精製標品 (Lot-9876) (LAP と略称) を用いた。

供試した合成基質は主として mixed anhydride 法^(9,10) および活性エステル法⁽¹¹⁾を用いて合成したものである。アミノ酸は DL-Valine を除いてすべて L-アミノ酸である。アミドの略号を -NH₂ で示した。

酵素反応は AOP の場合は 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) を用い、BSP-I, II の場合は 0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を用いた。また、LAP の場合は 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を用い、いずれの場合も基質濃度を 0.25 μ mol で 40°C, 10 分, 20 分, 30 分反応させ、反応液の一定量を濾紙 (東洋濾紙 No. 51) 上にスポットし、*n*-ブタノール, 酢酸, 水 (4:1:1) で下降法により 20 時間展開し、乾燥後 Morris のニンヒドリン法⁽¹²⁾により発色させた。次に発色部分を切り取り 5 ml の 0.0004 M CdCl₂ を含む 60% エタノール溶液で 5 分間溶出を行い、505 nm で比色定量し、アミノ酸の μ mol 数を求めた。

実験に使用した酵素タンパク質の濃度は, AOP の場合タンパク態窒素として 0.4 μg , BSP-I, II の場合はそれぞれタンパク態窒素 5.0 μg , 5.2 μg , LAP の場合はタンパク態窒素として 0.46 μg であった.

なお, 酵素タンパク質の測定は Lowry 法⁽¹³⁾により定量した. 水解活性は zero 次反応速度定数 K_0 を求め, K_0 を酵素反応液中のタンパク態窒素 (mg) で除した値を水解係数 C_0 で表した. 実験結果は Table I に示した.

AOP については Leu-Gly-Gly, Leu-Ala-Gly, Leu-Gln-Gly 等のトリペプチドおよび Leu-Gly-Gly-NH₂ を速やかに水解した. また, Gly-Gly-Val, Ala-Leu-Gly, Ala-Gly-Leu などに対してもかなりよく作用するが, Pro-Gln-Gly, Pro-Leu-Gly に対する活性は低い. とくに, 本酵素は Leu-Gly や Leu-NH₂ に対してはほとんど作用しなかった.

中台⁽⁶⁻⁸⁾は *Aspergillus oryzae* 460 から 3 種のロイシンアミノペプチダーゼを精製しているが, これらの 3 種の酵素とは基質特異性は異なり, AOP はトリペプチド類によく作用し, Leu-Gly や Leu-NH₂ 等にはほとんど作用しないアミノペプチダーゼの一種と考えられる.

BSP-I は Leu-Ala-Gly, Pro-Gln-Gly, Ala-Leu-Gly, Leu-Gln-Gly に対して強い活性を示したが, Leu-Gly-Gly に対する活性が相対的に弱かった. また, Gln を含むトリペプチドに対しては比較的活性が強く, Gly-Gly-Val, Leu-Gly-Gly-NH₂ に対する活性は微弱であった. Leu-Gly や Leu-NH₂ に対する活性はほとんど認められなかった.

BSP-II は Ala-Leu-Gly, Leu-Gly-Gly, Leu-Ala-Gly に対する活性が強く, 次いで Gly-Gly-Val, Ala-Gly-Leu, Leu-Gln-Gly, Pro-Gln-Gly の順に水解した.

また, Leu-Gly や Leu-NH₂ に対する活性はほとんど認められなかった. BSP-I および BSP-II の両酵素を比較すれば, 前者は Leu-Gln-Gly および Pro-Gln-Gly に対する活性が後者より著しく強く, 後者は Ala-Leu-Gly, Leu-Gly-Gly, Ala-Gly-Leu および Gly-Gly-Val の活性が前者より著しく強かった.

LAP は Leu-Gly-Gly, Leu-Gln-Gly, Leu-Ala-Gly, Ala-Leu-Gly に対する活性が強く, 次いで Leu-Gly, Leu-NH₂, Leu-Gly-Gly-NH₂ の順に活性を示した. Ala-Gly-Leu や Gly-Gly-Val に対してはほとんど活性を示さなかった. しかし, Leu-Lys-Lys, Leu-His-Gly,

Table I. Action of Several Aminopeptidases on Various Types of Substrates

Enzymes Substrates	Proteolytic coefficient (C_0)			
	AOP	BSP-I	BSP-II	LAP
Gly-Gly-Val	8,630	50	530	—
Gly-Pro-Leu-Gly	—	—	—	—
Ala-Gly-Leu	3,340	165	370	—
Ala-Leu-Gly	6,050	430	1,030	1,350
Ala-Lys-Lys-Gly	+	—	—	+
Leu-NH ₂	—	—	—	500
Leu-Gly	50	+	+	620
Leu-Gly-Gly	17,250	190	990	4,730
Leu-Gly-Gly-NH ₂	8,510	10	20	200
Leu-Ala-Gly	15,050	520	860	1,490
Leu-Gln-Gly	11,650	400	260	1,810
Leu-His-Gly	75	+	+	+
Leu-Lys-Lys	160	+	+	10
Phe-Gly-Gly	+	+	+	+
Pro-Gln-Gly	260	520	170	80
Pro-Leu-Gly	230	—	—	80

Condition of enzyme reaction is as follows :
Each substrate concentration was 0.25 μmol and reaction temperature was 40°C. Buffer used was 0.05 M Tris-HCl at pH 7.0 (AOP), at pH 7.5 (BSP-I, BSP-II) and at pH 8.0 (LAP). Enzyme concentration expressed as protein-N was 0.4 μg in AOP, 5.0 μg in BSP-I, 5.2 μg in BSP-II or 0.46 μg in LAP reaction mixture.

+ The N-terminal amino acid was slightly split in 10 hr.

— The N-terminal amino acid was not split at all.

Phe-Gly-Gly に対しては微弱ながら活性を認めた.

本酵素は Leu-Gly-Gly, Ala-Leu-Gly, Leu-Gly-Gly-NH₂ のみならず Leu-Gly や Leu-NH₂ に対しても活性を示し, いわゆるロイシンアミノペプチダーゼの基質特異性を示すことを確認した. また, Pro-Gln-Gly や Pro-Leu-Gly に対しても活性を示すことを明らかにした.

- (1) 赤塚尹巳, 佐藤正一: 茨城大農学術報告, No. 10, 41 (1962).
- (2) N. Minamiura, T. Yamamoto and J. Fukumoto: *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 186 (1966).
- (3) N. Minamiura, T. Yamamoto and J. Fukumoto: *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 653 (1969).
- (4) N. Minamiura, T. Yamamoto and J. Fukumoto: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 975 (1971).
- (5) E. L. Smith and D. H. Spackman: *J. Biol. Chem.*, **212**, 271 (1955).

- (6) T. Nakadai, S. Nasuno and N. Iguchi :
Agric. Biol. Chem., **37**, 757 (1973).
 - (7) T. Nakadai, S. Nasuno and N. Iguchi :
Agric. Biol. Chem., **37**, 767 (1973).
 - (8) T. Nakadai, S. Nasuno and N. Iguchi :
Agric. Biol. Chem., **37**, 775 (1973).
 - (9) J. P. Greenstein and M. Winitz : "Chemistry
of Amino Acids," Vol. II, John Wiley &
Sons, New York, 1961, p. 970.
 - (10) 赤塚尹巳 : 茨城大農学術報告, No. 20, 25
(1972).
 - (11) J. P. Greenstein, M. Winitz : "Chemistry of
Amino Acids," Vol. II, John Wiley &
Sons, New York, 1961, p. 1027.
 - (12) N. A. Gladys and C. J. O. R. Morris : *Bio-
chem. J.*, **81**, 606 (1961).
 - (13) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr
and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265
(1951).
-