幽門垂蛋白分解酵素に関する研究—IV.*

鯉幽門垂蛋白分解酵素精製時の
Glycylglycine Dipeptidase の動行

勝 又 悌 三・斗 ケ 沢 宣 久

(1960 年 8 月 2 日受理)

STUDIES ON THE PROTEINASE OF PYLORIC CAECA—IV.
BEHAVIOUR OF THE GLYCYLGLYCINE DIPEPTIDASE DURING
THE REFINING OF CRYSTALLINE PROTEINASE
OF BONITO PYLORIC CAECA

Teizo KATSUMATA and Yoshihisa TOGASAWA**

The present investigation was made in order to elucidate the behaviour of the glycylglycine dipeptidase during the refining of crystalline proteinase of bonito pyloric caeca. The results were as follows:

The glycylglycine dipeptidase was adsorped on Amberlite XE-64 (Fig. 1), and the peptidase activity was observed in all the fractions except one case (fraction G) during the refining process (Table 1, Fig. 2 A~F).

As the peptidase activity disappeared in the fraction G, the crystalline proteinase obtained was known not to hydrolyze glycylglycine.

微生物から分離した結晶 proteinase が peptidase 活性を有するとの報告^{1,2,3)}もあり、著者等⁴⁾の分離した鯉幽門垂結晶 proteinase の peptidase 活性の有無を明らかにする目的で、proteinase の精製過程における glycylglycine (GG) dipeptidase の動行を検討した。

実 験 方 法

1. 酵素液調製法: 鯉 *Katsuwonus pelamis* LINNÉ 幽門垂を前報⁴⁾記載のごとく調製したものを使用した。

2. 酵素力測定法, 酵素単位表示法, 酵素純度表示法: 前報^{5,6,7,8)}に準じて行なつた。ただし GG dipeptidase の場合は酵素力測定法にしたがい、pH 8.0, 37° ± 1°C で1時間作用させた時の酵素反応液 0.2ml に対し N/100 alcoholic KOH 0.05ml を消費するような酵素量を 1 peptidase 単位とした。

3. イオン交換樹脂の調製: 前報⁹⁾のごとく再生した amberlite XE-64 を使用した。

結果ならびに考察

1. peptidase の吸着におよぼす XE-64 の量的関係

前報⁹⁾記載のごとく XE-64 6% 添加により鯉幽門垂の proteinase および amylase がともによく吸着されるが、鯉幽門垂 peptidase の XE-64 による吸着の有無を検討した。すなわち XE-64 の各量をそれぞれ

* 昭和 35 年 4 月, 日本農学大会水産部会において講演

** 岩手大学農学部 (Fac. Agr., Iwate Univ.).

Fig. 1. Adsorption of GG dipeptidase on various amounts of XE-64 with acetate buffer at pH 5.0.

Adsorption % of the peptidase were shown by the activity after 1 hr. incubation.

Fig. 2. Simplified scheme of crystallization procedure of bonito pyloric caeca.

5 ml メスフラスコにとり M/20 acetate buffer (pH 5.0) を加えて 5 ml とし、一昼夜室温に放置して緩衝化する。buffer を除き B 液 2 ml づつ加え更に同一 buffer で 5 ml とし、10 分間室温に放置吸着させた後遠心分離 (10000 r.p.m., 5 分) して得た上澄液を酵素力測定に供した。なお同時に control test を行ない、両者の差から XE-64 に吸着された酵素の百分率を算出し、結果を Fig. 1 に示した。

結果、1 時間加水分解の場合 1% 添加で 50%, 2% 添加で 83.4% 吸着、4% 以上では完全に吸着され、proteinase の場合とほとんど同様の結果が得られた。なお Fig. 2 における鰹幽門垂 proteinase 精製の場合、B 液に XE-64 6% を添加し proteinase ならびに peptidase を同時に完全吸着させた。

2. proteinase の結晶分離

前報⁴⁾ 記載の方法を要約して Fig. 2 に示した。ただし Fig. 2 における F 液は 80% アセトン処理により生じた沈澱物を冷 80% アセトンで洗滌後蒸留水 4 ml に溶解し、遠心分離 (10000 r.p.m., 5 分) して得た透明液であり、また G 液は生じた結晶 proteinase に 1 ml の冷 55% アセトンを加えて洗滌し遠心分離 (10000 r.p.m., 5 分) により洗液を捨て、この洗滌操作を 3 回繰返したものを真空乾燥後、N/10 ammonium buffer (最終 pH 6.0) に溶解したものである。

3. 精製過程における酵素力、収量ならびに比活性度

精製過程における proteinase, peptidase の酵素力は Table 1 のごとくであり、両酵素の各過程における収量ならびに比活性度を示すと Table 2 のごとくである。なお表中収量、比活性度は前報⁷⁾ 記載の方法にしたがい算出したものである。

すなわち収量は、C + D 液で proteinase 約 52% であるが、peptidase は 15% に減少する。これは amylase 除去のため acetate buffer (pH 5.0) で数回洗滌する際該酵素の失活と溶出に起因するものと考えられる。しかし peptidase の透析による損失は少ない。

Table 1. Activities of fractions of proteinase and peptidase

Enzyme	Frac. Hrs.	A	B	C	D	E*	F**	G
Proteinase	1	0.10	0.11	0.20	0.15	0.19	0.21	0.07
	2	0.22	0.24	0.30	0.21	0.26	0.22	0.10
	3	0.32	0.34	0.34	0.27	0.33	0.28	0.12
	6	0.42	0.42	0.43	0.34	0.43	0.36	0.15
	20	0.50	0.51	0.51	0.48	0.49	0.49	0.22
Peptidase	1	0.08	0.09	0.05	0.03	0.05	0.08	0
	2	0.15	0.17	0.07	0.05	0.08	0.15	0
	3	0.19	0.22	0.13	0.09	0.11	0.22	0
	6	0.27	0.30	0.19	0.13	0.14	0.26	0
	20	0.54	0.54	0.39	0.34	0.36	0.39	0

Figures denote ml of N/100 alcoholic KOH.

* E in Fig. 2 was diluted to 1/5.

** F in Fig. 2 was diluted to 1/10.

Table 2. Yields and specific activities of fractions of proteinase and peptidase

		A	B	C	D	E	F	G
Volume (ml)		2670	2250	410	390	110	5.1	75
Total protein N (mg)		2423	510.3	136.4	76.7	149.7	10.4	1.98
Proteinase	Total proteinase unit	356000	330000	109333	78000	139333	14280	7000
	Yield (%)	100	92.9	30.7	21.9	39.1	4.1	2
	Specific activity	147	647	802	1017	931	1373	3535
	Ratio of specific activity to A	1	4.4	5.5	6.9	6.3	9.3	24
Peptidase	Total peptidase unit	284800	270000	27333	15600	36666	5440	0
	Yield (%)	100	94.8	9.6	5.5	12.4	1.9	0
	Specific activity	118	529	200	200	245	523	0
	Ratio of specific activity to A	1	4.5	1.7	1.7	2.1	4.5	0

F液では proteinase 4.1% に対して peptidase は 1.9% であるが、G液で proteinase 2% に対して peptidase は 0% となる。

一方、比活性度は酵素原液の比活性度に対してB液では両酵素ともほとんど同じであるが、C, D, E 各液では proteinase がそれぞれ 5.5, 6.9, 6.3 と増加するのに対して peptidase はそれぞれ 1.7, 17., 2.1, F液で peptidase はようやくB液の比活性度 4.5 と同じ値になるが proteinase は 9.3 に増加する。G液において proteinase が 24 倍になり peptidase 活性は全く消失する。

吉田氏等¹⁾は *Aspergillus saitoi* から分離した結晶 proteinase が peptidase 活性を有していることを報告しており、また野本氏等^{2,3)}は *Streptomyces griseus* から分離した結晶 proteinase が基質蛋白を構成する全ペプチド鎖の 80% 以上を分解し GG をはじめ種々の合成ペプチドを分解することを報告しているが、鯉幽門垂結晶 proteinase 調製過程において peptidase 活性はB液まではほとんど損失なく、C+D液において 15% に減じ、E, F液においてなお proteinase と行動をともにし、透析液を脱色後アセトン処理して得られた結晶 proteinase 溶液G液においてはじめて peptidase 活性が消失する。すなわち鯉幽門垂結晶 proteinase は GG を全く分解しない。

要 約

鰾幽門垂結晶 proteinase の調製過程における GG dipeptidase の動行を追及し、同時に結晶 proteinase の peptidase 活性の有無を検討した結果はつぎのごとくである。

Fig. 2 における鰾幽門垂結晶 proteinase 調製過程において GG dipeptidase 活性は B 液までほとんど損失なく、amberlite XE-64 に吸着させ、amylase を除去後硫酸分別沈澱、透析、脱色後アセトン 0.8 飽和により生ずる沈澱にまで proteinase と行動をともにし、最終結晶 proteinase 溶液において全く peptidase 活性を消失した。すなわち鰾幽門垂結晶 proteinase は GG を全く分解しない。

文 献

- 1) F. YOSHIDA and M. NAGASAWA: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 262 (1956).
- 2) 野本正雄・奈良橋快子・村上 碩: 理化学研究所報告, **35**, 154 (1959).
- 3) 野本正雄・奈良橋快子・村上 碩: 理化学研究所報告, **35**, 261 (1959).
- 4) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・石川雅司: 本誌, **25**, 470 (1959).
- 5) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三: 本誌, **25**, 122 (1959).
- 6) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三: 本誌, **23**, 157 (1957).
- 7) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三: 本誌, **23**, 163 (1957).
- 8) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三: 本誌, **21**, 1070 (1956).
- 9) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三: 本誌, **25**, 402 (1959).