魚類幽門垂プロティナーゼに関する研究—Ⅲ.

サバ幽門垂プロティナーゼの基質特異性

大 城 善 太 郎

(1971 年 1 月 9 日受理)

Studies on Proteinase in the Pyloric Caeca of Fishes—III.

Substrate Specificity of Mackerel Proteinase

Zentaro OOSHIRO*

The substrate specificity of mackerel proteinase has been investigated with the use of many synthetic substrates.

Mackerel proteinase hydrolysed the following substrates: $N\alpha$ -benzoyl-L-arginine-amide, chloroacetyl-L-leucine, acetyl-DL-methionine and chloroacetyl-DL-methionine, while it did not hydrolyse the following substrates: carbobenzoxy-L-glutamyl-L-tyrosine, acetyl-L-tyrosineamide, $N\alpha$ -benzoyl-L-tyrosineamide and ϵ -benzoyl- α -acetyl-DL-lysine. These results show that the proteinase has very broad specificity.

Effects of various metals on the activity of this enzyme were examined. No effect was brought forth by di-valent metal ions.

Experiments with N-acylated derivatives of amino acid, such as methionine and leucine, indicated that the proteinase has an optical specificity, i. e. it hydrolyses the L-isomer, but not the D-isomer. It may be of interest that this enzyme can be used for the optical resolution of acylated DL-amino acids.

サバ幽門垂のプロティナーゼがわきめて強力な蛋白分解能を有し、カゼインに作用してそのペプチド結合の 70% を開裂させることは、前報¹⁾で述べた。この事實は、サバ幽門垂プロティナーゼの基質特異性が非常に低いことを示唆するものであるが、反面また魚類起源の酵素として特殊な基質特異性を有する可能性があり、比較酵素学的にも興味のある問題であると思われる。本報告では、各種の合成基質を用いてサバ幽門垂プロティナーゼの基質特異性につき検討したので、その結果を報告する。

実 験 方 法

使用酵素 この実験に用いた酵素は、前報^{1,2)}に記載の通りの精製サバ幽門垂プロティナーゼである。このものはクロマトグラフ的に単一で、分子量的にも均一、しかも電気泳動的にも単一なものである。

基質 使用した合成基質は Table 1 に示す通りであり、阪大理学部ならびに同蛋白質研究所蛋白質研究奨励会事業部より入手したものである。これらのプロティナーゼ関連基質を 0.05 M トリス緩衝液 (pH 9.0) に溶解して、各基質とも 0.02 M 濃度の溶液を調製した。

酵素反応 0.05 M トリス緩衝液 (pH 9.0) に溶解して得た 0.02 M の各基質液 1 ml を試験管にとり、これを 37°C に約 3 分間予温、これに別に予温しておいた酵素溶液 (0.028 mg-N/ml) 1 ml を加えて所定時間反応させ、0.4 M トリクロル酢酸 (TCA) 溶液 1 ml を加えて酵素反応を停止させた。反応時間は 10 分間とし、とくに加水分解され難い基質の場合は反応時間を適宜延長して活性を測定した後、単位時間当りに

* 鹿児島大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Kagoshima Univ., Shimoaratacho, Kagoshima).

Table 1. The action of mackerel proteinase on various types of substrates (37°C).

Substrate	Relative rate
N α -Benzoyl-L-arginineamide	100
N α -Benzoyl-L-tyrosineamide	3
N α -Acetyl-L-tyrosineamide	1
Carbobenzoxy-L-glutamyl-L-tyrosine	3
Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine	7
Chloroacetyl-L-leucine	132
Chloroacetyl-DL-leucine	130
N-Acetyl-DL-methionine	60
Chloroacetyl-DL-methionine	98
N-Acetyl-DL-tryptophan	10
ϵ -Benzoyl- α -acetyl-DL-lysine	0

The relative rates were compared with the standard-value of 100 for N α -benzoyl-L-arginineamide.

ゼの活性を測定した結果を Table 1 に記載する。

Table 1 から見取れるように、本酵素は N α -benzoyl-L-arginineamide に作用して、そのアミド結合を水解開裂する活性が強いことが明らかとなった。N α -benzoyl-L-arginineamide はトリプシンの典型的な基質であり、その限りでは本酵素はトリプシンに類似の性質を有する酵素であるといえるかもしれない。しかしながら、すでに前報¹⁾において明らかにしたように、カゼインに対する作用が本酵素とトリプシンでは著しく異なり、カゼインの水解率（ペプチド結合の水解開裂率）が、本酵素で約 70%，トリプシンでは約 15% 相当であることから、両者は明らかに異なるものであると思われる。プロティナーゼの基質特異性を論ずる場合には、合成ペプチド類とカゼインのような蛋白質に対する作用様式から総合的に判断することが必要であるということが痛感される。

さらにまた、本酵素は chloroacetyl-L-leucine に対しても顕著な活性を示した。chloroacetyl-L-leucine をよく水解する酵素として知られているものに、exopeptidase であるカルボキシペプチダーゼがある。すでに著者はサバ幽門垂からカルボキシペプチダーゼ⁵⁾を分離精製して、その性質を明らかにしているが、本精製プロティナーゼ区分にカルボキシペプチダーゼが混在する疑点が皆無とはいき切れない。しかしながら本酵素がカルボキシペプチダーゼの典型的な基質である carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine に対してはほとんど活性を示さないことからその混入する可能性はほとんどないと言つてよい。なお、本酵素がメチオニンの N-アシル誘導体に対して著しい活性を示すことも特徴的である。この場合、アシル基の種類によつて水解作用に影響が見られ、electronegative な chloroacetyl-DL-methionine の方が acetyl-DL-methionine より 2 倍の速さで加水分解されることも併せて認められた。

サバ幽門垂プロティナーゼの有する上述のような特性は、おそらくその活性中心の構造がとくに立体障害の少ないような原子配列、すなわち立体構造を有するために、多様な構造の基質に親和性を示すのではないかと考えられる。これらの点の解明は酵素作用の本質に関連するものとして興味深い研究課題と思われる。

光学特異性について 前述の通り、サバ幽門垂プロティナーゼが、L-ロイシン、DL-ロイシンおよび DL-メチオニンのアシル誘導体をよく水解することが明らかとなったが、あらためて chloroacetyl-L-leucine, chloroacetyl-DL-leucine, chloroacetyl-DL-methionine および N-acetyl-DL-methionine に対する本酵素の作用様式を検討した。すなわち 0.05 M ベロナール緩衝液 (pH 8.0) にとかした 0.02 M N-アシルロイシンおよびメチオニン溶液を基質とし、これに等容の酵素液 (0.0184 mg-N/ml) を加えて 35°C で反応させ、酵素反応により水解遊離したアミノ酸をニンヒドリン呈色法により定量して、その加水分解度を求めた。そ

換算して表示した。

酵素活性は酵素反応により、基質としてアミノ酸のアシル誘導体を使用した場合には遊離生成した α -アミノ基、アミノ酸アミドの場合には遊離生成したアンモニアをそれぞれニンヒドリン発色法^{3,4)}により比色定量した。発色値はすべてロイシン当量として算出して表示した。

各基質に対する加水分解度は便宜上 N α -benzoyl-L-arginineamide の場合を 100 としたときの相対値と比較した。

実験結果および考察

基質特異性について 各種の合成基質に対するサバ幽門垂プロティナーゼ

Fig. 1. Asymmetric hydrolysis of N-acylated amino acid by mackerel proteinase.

The reaction mixtures were composed of equal volume of 0.02 M N-acylated methionine and leucine in 0.05 M veronal buffer and enzyme solution (0.0184 mg-N/ml).

The reaction was made at pH 8.0, 35°C.

- : Chloroacetyl-DL-methionine.
- : N-Acetyl-DL-methionine.
- △—△: Chloroacetyl-DL-leucine.
- ▲—▲: Chloroacetyl-L-leucine.

Table 2. The effect of divalent metal ions on the activity of mackerel proteinase.

Metal ions	Relative activity (%)
Control (without metal ion)	100
Ca ⁺⁺	98.1
Mg ⁺⁺	94.2
Mn ⁺⁺	99.2
Zn ⁺⁺	108.2
Co ⁺⁺	110.3

The enzyme activity of mackerel proteinase was noted after it was pre-incubated with 0.01 M various metal ions for 30 minutes at 37°C.

The final concentration of metal ions in each enzyme-substrate reaction mixture was 0.002 M.

合成基質に作用させてその基質特異性を調べた。その結果きわめて広い基質特異性を有することが推定された。

2. このプロティナーゼによつて、よく加水分解される基質としては、N α -benzoyl-L-arginineamide, chloroacetyl-L-leucine, chloroacetyl-DL-leucine, chloroacetyl-DL-methionine および acetyl-DL-methionine などであることが明らかにされた。

3. 本酵素が合成 (DL) アミノ酸のうち、とくにロイシン、メチオニンのアシル誘導体に作用して、これらを不斉水解することが認められた。このことは、本酵素がこれらのアミノ酸の光学分割に利用できる可能

これらの結果を Fig. 1 に示した。図で明らかのように、DL-アミノ酸の N-アシル誘導体に対しては 50% 相当が不斉水解されることが認められた。しかし chloroacetyl-L-leucine に対してはこれをほとんど完全に加水分解して L-ロイシンを遊離することが明らかとなつた。以上の通り本酵素は合成ラセミアミノ酸のうち、DL-ロイシンおよび DL-メチオニンなどの N-アシルアミノ酸を不斉水解しうるものと思われる。

酵素活性に及ぼす金属イオンの影響

金属イオン特に Mn⁺⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Zn⁺⁺, Co⁺⁺ など 2 価金属イオンによつて多くの exopeptidase が活性化⁸⁻⁹⁾されることはすでによく知られているところであるが、endopeptidase である proteinase が金属イオンによつて賦活される例¹⁰⁻¹²⁾ はあまりないようである。

サバ幽門垂プロティナーゼに Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺ および Co⁺⁺ (いずれも塩化物を用いた) を加えて preincubate した後基質を加えて反応させ、酵素活性におよぼすこれら金属イオンの影響を調べた。その結果は Table 2 に示す通りである。

表から明らかなように、いずれの金属イオンも酵素活性に対しほとんど影響を示さなかつたが、Zn⁺⁺, Co⁺⁺ によつてわずかに活性増加が認められた。

要 約

サバ幽門垂から分離精製されたプロティナーゼの基質特異性ならびに光学特異性を明らかにするための検討を行ない、次の結果を得た。

1. サバ幽門垂プロティナーゼを諸種の

性を示すものである。

4. 酵素活性におよぼす種々の2価金属イオンの影響につき検討したが、ほとんど影響を示さなかつた。

文 献

- 1) 大城善太郎: 本誌, **37**, 145~148 (1971).
- 2) 大城善太郎: 本誌, **34**, 847~852 (1968).
- 3) E. W. YEMM and E. C. COCKING: *Analyst*, **80**, 209~213 (1955).
- 4) S. MOORE and W. H. STEIN: *J. Biol. Chem.*, **211**, 907~913 (1954).
- 5) 大城善太郎: 鹿大水紀要, **11**, 111~151 (1962).
- 6) E. L. SMITH: *Federation proc.*, **8**, 581~588 (1949).
- 7) E. L. SMITH: *J. Biol. Chem.*, **176**, 21~32 (1948).
- 8) E. L. SMITH: *Advances in Enzymol.*, **12**, 191~257 (1951).
- 9) E. L. SMITH and D. H. SPACKMANN: *J. Biol. Chem.*, **212**, 271~299 (1955).
- 10) L. GORINI: *Biochim. Biophys. Acta*, **6**, 237~255 (1951).
- 11) K. MORIHARA: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 49~59, 60~63 (1959).
- 12) 森原和之・増尾栄太郎: 酵素化学シンポジウム, **14**, 281~286 (1960).