コイ筋肉の数種のアミノペプチダーゼの部分精製とその性質

原 研治, 涼松 淳, 湯川 幸一, 石原 忠

(1986 年 7 月 26 日受理)

Partial Purification and Some Properties of Three Kinds of Aminopeptidase from Carp Muscle

Kenji Hara,^{*1} Atsushi Suzumatsu,^{*1} Kohichi Yukawa,^{*2}
and Tadashi Ishihara^{*1}

From the ammonium sulfate precipitate fraction (50-80%) of the crude extract of carp muscle, three kinds of aminopeptidase (designated AP-Ia, AP-II and AP-III) with different substrate specificity were separated by DEAE-Sephacel, hydroxyapatite and Sephadex G-150 column chromatography. The molecular weights of AP-Ia, AP-II and AP-III were estimated to be about 73,000, 115,000 and 107,000 by gel filtration, respectively. The pH optima of each enzyme were about 7.3, 8.5, and 7.3, respectively.

AP-Ia hydrolyzed amino acid- β -naphthylamides (Pro->Ala->Leu->Val->Phe- β NA), (Ala)₂, (Ala)₃, and (Ala)₄. But Asp- β NA, Gly- β NA, Gly-Gly and Leu-Gly were resistant to hydrolysis.

AP-II was strongly inactivated by *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) and *o*-phenanthroline (*o*-PHE), and slightly activated by Co²⁺, Mn²⁺ and Mg²⁺. A variety of dipeptide were hydrolyzed by this enzyme, but amino acid- β -naphthylamides, tripeptides, (Ala)₄, dipeptide-amides and benzoyl-dipeptides were not hydrolyzed.

AP-III was inactivated by PCMB and *o*-PHE, and slightly activated by dithiothreitol (DTT) and Co²⁺. Various tripeptides were hydrolyzed by this enzyme, but dipeptides, (Ala)₄ and amino acid- β -naphthylamides were not hydrolyzed.

From these results, AP-II and AP-III are probably dipeptidase [EC 3.4.13.11] and tripeptide aminopeptidase [EC 3.4.11.4], respectively.

動物の組織に種々のアミノペプチダーゼ系の酵素が存在することは多くの研究により知られている。しかし、筋肉を材料とした研究は少なく、特に、精製酵素で諸性質が調べられているアミノペプチダーゼ系の酵素としてはウサギ骨格筋の2種の酵素¹⁻⁴⁾があるに過ぎない。魚筋肉にもこの系の酵素活性が存在することは、粗抽出液での実験で知られている。⁵⁻⁷⁾しかし、この系の酵素は互いに類似した基質を水解するため、魚筋肉での精製酵素の研究例がない現状では、未だいかなる酵素が魚筋肉に確実に存在するかは明らかでない。

一方、魚肉のホモジネートを種々の pH に放置すると、酸性域ではエンドペプチダーゼに起因する Cu-Folin 法陽性物質が酸可溶性画分に著しく増加することがコイ⁸⁾で報告されている。しかし、中性域では Cu-Folin 法陽性物質の増加は非常に少なく、エキソペプチ

ダーゼに起因すると考えられるニンヒドリン陽性物質の増加が認められている。⁸⁾同様の傾向は著者らもコイ、メイトガレイ筋肉で確認しているし(未発表)、ウサギ筋肉でも報告されている。⁹⁾

これらのことより、著者らは魚筋肉のアミノペプチダーゼ系の酵素をできるだけ系統的に検策し、それらの性質を明らかにすることを目的とし、研究を計画した。本研究ではコイ筋肉を用いて2種のアミノペプチダーゼとジペプチダーゼ及びトリペプチドアミノペプチダーゼの存在を明らかにしたので報告する。

実験方法

試料 即殺直後のコイ *Cyprinus carpio* (平均体重 600~800 g) の普通肉を用いた。

試薬 DEAE-Sephacel, CM-Sephadex C-50, Sepha

^{*1} 長崎大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Nagasaki University, Bunkyo, Nagasaki 852, Japan).

^{*2} 長崎大学医学部 (Faculty of Medicine, Nagasaki University, Sakamoto, Nagasaki 852, Japan).

略語: β NA, β -naphthylamine or β -naphthyl amide; 2-MER, 2-mercaptoethanol; *o*-PHE, *o*-phenanthroline; DTT, dithiothreitol; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid).

Fig. 1. DEAE-Sephacel column chromatography of the ammonium sulfate fraction from the crude extract of carp ordinary muscle.

Ammonium sulfate fraction (about 4 g of protein) was applied to the column (2.6 × 40 cm) equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0). The arylamidase activity was assayed by the method of Matsutani.¹⁰⁾ 0.4 ml of 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.3), 0.48 ml of distilled water, 0.1 ml of the enzyme and 0.02 ml of 5 mM Leu-βNA (dissolved in dimethyl sulfoxide) were mixed and incubated at 37°C. After incubation for 15 min, 0.5 ml of ethanol containing 0.23 N HCl was added to stop the reaction. And then the mixture was combined with 0.5 ml of ethanol containing 0.06% *p*-dimethylaminocinnamaldehyde. After standing for 20 min at room temperature, the absorbance of the mixture was measured at 540 nm. The peptidase activity was assayed by the method of Cd²⁺-ninhydrin as described by Doi.¹¹⁾ 0.2 ml of 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.3), 0.2 ml of distilled water, 0.05 ml of the enzyme and 0.05 ml of 4 mM peptide solution were mixed and incubated at 37°C. After incubation for 15 min, 2 ml of the reaction-stopper solution (ethanol: acetic acid: H₂O = 8:1:4.5) and 1 ml of Cd²⁺-ninhydrin solution¹¹⁾ were added in the reaction mixture. And then the mixture was heated at 84°C for 5 min, and cooled in ice bath. The absorbance of the mixture was measured at 507 nm after centrifugation for 3 min at 3000 rpm. (---), Absorbance at 280 nm; (○), Activity for Leu-βNA; (□), For Leu-Gly; (●), For Leu-(Gly)₂; (Δ), For (Ala)₄. Elution buffer: A, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0); B, pH 7.0; C, pH 7.0+0-0.5 M NaCl.

dex G-150 は Pharmacia 製, hydroxyapatite は日本ケミカル製, 各種アミノ酸-β-ナフチルアミド (X-βNA) 及び各種のペプチドは Sigma 製を用いた。なお, 使用したペプチド等は全て L-アミノ酸である。

アリルアミダーゼ活性の測定 通常 0.2 M リン酸 Na 緩衝液 (pH 7.3) 0.4 ml, 蒸留水 0.48 ml, 酵素液 0.1 ml を混合し 37°C で 5 分間保温後, ジメチルスルホキシドに溶解した 5 mM アミノ酸-βNA (通常 Leu-βNA を使用) を 0.02 ml 加え 37°C で 15 分間反応させた。ついで, Matsutani ら¹⁰⁾の方法に従い遊離した βNA を発色させた。すなわち 0.23 N HCl-エタノール溶液 0.5 ml を加え反応を停止した後, 0.06% ケイ皮アルデヒドエタノール溶液 0.5 ml を加え室温に 20 分間放置

し, 540 nm の吸収を測定した。なお, 後述のアミノペプチダーゼ II (AP-II) の性質を調べた実験では, 上記のリン酸 Na 緩衝液を pH 8.5 の 0.2 M Tris-HCl 緩衝液に変えた。酵素 1 単位は 1 分間に 1 μmol の βNA を遊離する力とした。

ペプチダーゼ活性の測定 通常 0.2 M 緩衝液 0.2 ml, 蒸留水 0.2 ml, 酵素液 0.05 ml を混合し, 37°C で 5 分間保温後, 4 mM ペプチド溶液 0.05 ml を加え 37°C で 15 分間反応させた。ついでエタノール: 酢酸: 水 (8:1:4.5) 混液 2 ml を加え反応を停止した。これに Doi ら¹¹⁾の Cd²⁺-ニンヒドリン溶液 1 ml を加え 84°C で 5 分間加熱した後, 急冷し 507 nm の吸収を測定した。用いた緩衝液はアリルアミダーゼ活性の測定時と同

様であるが、リン酸 Na 緩衝液では発色時に濁りが生じるため、発色後遠心分離 (3000 rpm, 3 分) し、その上清液の吸収を測定した。なお、後述のアミノペプチダーゼ II, III (AP-II, III) の性質を調べた実験では、基質として通常前者には Leu-Gly, 後者には Leu-(Gly)₂ を用いた。酵素 1 単位は 1 分間に 1 μ mol のペプチド結合を水解する力とした。なおこの場合トリペプチド以上の基質では N 末端アミノ酸のみが遊離するとみなした。

実験結果

酵素の部分精製 コイ普通肉 1.4 kg を 5 倍量の冷蒸溜水と共に 3 分間ホモジナイズし、遠心分離 (10,000 $\times$ g, 30 分) にて粗抽出液を得た。これに固形 (NH₄)₂SO₄ を加え、50~80% 飽和画分を遠心分離にて集め、少量の 50 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、同緩衝液にて 20 時間 4°C で透析した。透析中に生じた沈殿を遠心除去後、同緩衝液で平衡化した DEAE-Sephacel カラムを用い、ステップワイズ法と NaCl グラディエント法により酵素を溶出し Fig. 1 の結果を得た。大部分のタンパク質は未吸着画分に溶出し、少量のタンパク質がグラディエント溶出部に溶出した。この未吸着画分 (No. 11~65) には Leu- β NA を水解するアミラーゼ活性と、Leu-(Gly)₂ 水解活性が重なって検出された。また未吸着画分のすぐあとに弱い Leu-Gly 水解活性が検出された。グラディエント溶出部の No. 154~166 には Leu-Gly 水解活性が検出され、No. 175~186 には Leu-(Gly)₂, (Ala)₄ 及び Leu- β NA 水解活性が重なって検出された。次に Fig. 1 の未吸着画分をブールし、(NH₄)₂SO₄ 塩析 (80% 飽和) にて沈殿を集め、少量の 50 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、同緩衝液にて透析後、65°C の温浴中にて 45°C, 30 秒間の熱処理を行った。生じた熱凝固物質を遠心除去し、25 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 6.0) にて 20 時間透析し試料液をえた。これをあらかじめ同緩衝液で平衡化した CM-Sephadex C-50 カラムを用いてクロマトグラフィーを行った。その結果、Leu- β NA 及び Leu-(Gly)₂ 水解活性の 90% 以上が未吸着画分に現れた。そこでこの未吸着画分の一部を凍結乾燥した後、少量の蒸溜水に溶解し、あらかじめ 50 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 7.3) で平衡化した Sephadex G-50 カラムを用い、ゲル濾過を行い、Fig. 2 の結果を得た。Leu- β NA と Leu-(Gly)₂ 水解活性は、わずかにずれて溶出した。次にこの両活性が含まれる部 (No. 25~34) をブールし、その一部を 1 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 7.0) にて透析した後、同緩衝液で平衡化した hydroxyapatite カラムを用いてクロマトグラフィーを行い、Fig. 3 の結果を得た。Leu- β NA 水解活性が初めに溶出し、ついで、

Fig. 2. Sephadex G-150 gel chromatography of the unadsorbed fraction from the DEAE-Sephacel column chromatography.

The unadsorbed fractions (No. 11~65) in Fig. 1 was pooled, and solid (NH₄)₂SO₄ was added in the solution to 80% saturation. The resulting precipitate was collected and dissolved in a minimum volume of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and then dialyzed against the same buffer for 20 h. After centrifugation, the supernatant was heated at 45°C for half min. Resulting precipitate was removed by centrifugation, and the supernatant was dialyzed against 25 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) for 20 h. The dialyzate was applied to a CM-Sephadex C-50 column equilibrated with the same buffer and then the column was washed with the same buffer. The activities for Leu- β NA and Leu-(Gly)₂ appeared in a unadsorbed fraction. The unadsorbed fraction was lyophilized and dissolved in a minimum volume of distilled water, and then applied to a Sephadex G-150 column (2.6 $\times$ 94 cm) equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer. The enzyme activities were assayed by the same methods as described in Fig. 1. (---), Absorbance at 280 nm; (○), Activity for Leu- β NA; (●), For Leu-(Gly)₂.

Leu-(Gly)₂ 水解活性が現れ、この操作で両酵素活性を分離することができた。前者 (No. 27~33) をアミノペプチダーゼ Ia (AP-Ia), 後者 (No. 37~46) をアミノペプチダーゼ III (AP-III) とし、-20°C に保存し以下の実験に供した。なお、両酵素は上記の精製操作により、DEAE-Sephacel 未吸着画分から前者は約 40 倍、後者は約 100 倍に精製された。

一方、Fig. 1 のグラディエント溶出部に検出された Leu-Gly 水解活性部 (No. 154~166) をブールし、限外濾過 (Amicon 社製 PM-10 を使用) にて濃縮し、Fig. 2 と同様な方法でゲル濾過を行い、Fig. 4 の結果を得た。この活性画分 (No. 57~64) をアミノペプチ

Fig. 3. Hydroxyapatite column chromatography of the Sephadex G-150 fraction.

The active fraction (No. 25-34) obtained by the Sephadex G-150 gel chromatography was applied to a hydroxyapatite column (1.2 × 20 cm), and eluted with sodium phosphate buffer, pH 7.0. (---), Absorbance at 280 nm; (○), Activity for Leu-βNA; (●), For Leu-(Gly)₂. Elution buffer: A, 1 mM; B, 10 mM; C, 0.1 M; D, 0.1 M-0.2 M.

Fig. 4. Sephadex G-150 gel chromatography of the active fraction (No. 154-166) in the DEAE-Sephacel column chromatography.

The active fraction obtained by the DEAE-Sephacel column chromatography was concentrated by ultrafiltration and applied to a Sephadex G-150 column (2.6 × 97 cm), and eluted by the same method as described in Fig. 2. The enzyme activity was assayed by the same method as described in Fig. 1 using Leu-Gly as a substrate. (---), Absorbance at 280 nm; (□), Activity for Leu-Gly.

ダーゼ II (AP-II) とし, 前記同様に保存し実験に供した。上記の操作により AP-II は粗抽液から約 280 倍に精製された。

なお, Fig. 1 のグラディエント溶出部の No. 175~186 の活性ピークの酵素はアミノペプチダーゼ Ib (AP-Ib) として次報で精製酵素としての性質を報告する予定

Fig. 5. Effect of pH on the enzyme activities.

The activities of AP-Ia (○), AP-II (□) and AP-III (●) were assayed using Leu-βNA, Leu-Gly and Leu-(Gly)₂ as a substrate, respectively. (—), Sodium phosphate buffer; (---), Tris-HCl buffer.

Table 1. Effect of various metal ions on the enzyme activities. The enzymes were pre-incubated with each additive at 37°C for 5 min at optimum pH of the each enzyme, respectively. And then residual activities were assayed. The activity of AP-Ia and AP-III were assayed at pH 7.3 (0.2 M sodium phosphate buffer) using Leu-βNA and Leu-(Gly)₂ as a substrate, respectively. The activity of AP-II was assayed at pH 8.5 (0.2 M Tris-HCl buffer) using Leu-Gly as a substrate. Other assay conditions were the same as described in Fig. 1.

Metal	Concentration (mM)	Relative activity (%)		
		AP-Ia	AP-II	AP-III
Control		100	100	100
CoCl ₂	0.1	85	111	109
	1	67	35	110
MnCl ₂	0.1	89	120	96
	1	83	1	87
MgCl ₂	0.1	81	115	99
	1	80	102	101
ZnCl ₂	0.1	75	35	102
	1	76	1	101
HgCl ₂	0.1	3	0	6
	1	2	0	3
AgCl ₂	0.1	26	3	5
CdCl ₂	0.1	99	33	42
	1	92	5	43

である。

分子量の推定 Andrews¹²⁾ の方法に従い, Sephadex G-150 によるゲル濾過法で各酵素の分子量を推定した。AP-Ia は約 73,000, AP-II は約 115,000, AP-III は約

107,000 と推定された。

反応に及ぼす pH の影響 酵素活性に及ぼす pH の影響を Fig. 5 に示した。最適 pH は AP-Ia, AP-III は約 pH 7.3, AP-II は約 8.5 であった。

反応に及ぼす温度の影響 酵素活性に及ぼす温度の影響を各酵素の最適 pH で調べた。その結果, AP-Ia は 50°C, AP-II は 37°C, AP-III は 45°C で最も活性が高かった。

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各酵素の最適 pH で各金属化合物と共に 10 分間ブレインキュベートした後, 常法により酵素活性を測定し Table 1 の結果を得た。AP-Ia は Hg^{2+} , Ag^{2+} により著しく阻害された。しかし, 活性化する金属はなかった。AP-II は Hg^{2+} , Ag^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} により阻害されたが, 0.1 mM の Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} により若干活性化された。しかし, 1 mM では Co^{2+} , Mg^{2+} でも阻害された。AP-III は Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{2+} により阻害され, Co^{2+} により若干活性化された。

各種試薬の影響 各種の試薬の影響を前実験と同様の方法で調べ Table 2 の結果を得た。AP-Ia は PMSF, DTT で阻害されたが, 多くのアミノペプチダーゼ系の酵素を阻害する金属キレート試薬の EDTA や *o*-PHE ではほとんど阻害されなかった。AP-II は *o*-PHE で著しく阻害されたが, EDTA ではあまり阻害されなかった。SH 試薬である PCMB, DTNB で阻害され, かつ SH 還元試薬である DTT, 2-MER でも阻害された。AP-III は *o*-PHE で著しく阻害され, DTT で若干活性化された。また, これらの3種の酵素はプロテイナーゼの分類にしばしば利用されているアンチペイン, E-64, ロイペプチン, キモスタチン及びペプスタチンによつては, 通常の使用濃度より高濃度で使用したにもかかわらず顕著な阻害は受けなかった。

基質特異性 各種のアミノ酸- β NA に対する AP-Ia の水解活性を調べ Table 3 の結果を得た。Pro- β NA に高い活性を示したほか, Leu, Ala, Val, Phe, Ile- β NA にもかなりの活性を示した。しかし, 非旋光性アミノ酸である Gly や酸性及び塩基性アミノ酸- β NA にはほとんど作用しなかった。なお, AP-II, III はアミノ酸- β NA には全く作用しなかった。次に種々のペプチドに対する作用を調べ Table 4 の結果を得た。AP-Ia はジ, トリ及びテトラペプチドに作用した。このうち Ala からな

Table 2. Effect of various chemicals on the enzyme activities. The assay methods of the enzyme activities were the same as described in Table 1.

Chemical	Concentration (mM)	Relative activity (%)		
		AP-Ia	AP-II	AP-III
Control		100	100	100
PMSE	1	26	98	101
TPCK	1	91	87	66
TLCK	1	84	68	93
Antipain	0.1	98	90	91
E-64	0.1	100	81	103
Leupeptin	0.1	102	83	100
Chymostatin	0.1	99	53	65
Pepstatin	0.1	97	—	102
2-MER	1	102	74	97
DTT	1	41	9	123
DTNB	1	87	61	94
PCMB	1	93	4	11
MIA	1	94	82	—
EDTA	1	100	90	84
<i>O</i> -PHE	1	92	8	15
NBS	1	3	16	15

るペプチドに対する作用は $(Ala)_3 > (Ala)_2 > (Ala)_4$ の順であった。AP-II はジペプチドの Leu-Gly, $(Ala)_2$, Val-Tyr, Gly-Leu 及び Ala-Leu に高い活性を示したが, 前3者のジペプチドとN末端側の2つのアミノ酸配列が同じである Leu-(Gly) $_2$, $(Ala)_3$, $(Ala)_4$, Val-Tyr-Val のようなトリ及びテトラペプチドには全く作用しなかった。また, ジペプチドのアミノ基またはカルボキシル基に他の基が結合した基質にも作用しなかった。しかし, ジペプチドでも Phe-Gly や Pro-Gly は水解されなかった。一方, AP-III はトリペプチドにのみ作用した。 $(Ala)_3$ に高い活性を示したが, $(Ala)_2$, $(Ala)_4$ には作用しなかった。Leu-(Gly) $_2$, (Gly) $_3$, Phe-(Gly) $_2$ などのトリペプチドをよく水解したが, これらのトリペプチドとN末端側の配列が等しいジペプチドには全く作用しなかった。

AP-Ia, AP-III の Leu-(Gly) $_2$ の水解機構 AP-Ia 及び AP-III が Leu-(Gly) $_2$ をどのように水解するかをペーパークロマトグラフィーで調べた。ペーパークロマトグラフィーは, 東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm) を用い, 展開溶媒として *n*-ブタノール: 酢酸: 水 (4:1:5) の上

Table 3. Substrate specificity of AP-Ia for various L- α -aminoacyl- β -naphthylamide. The assay method of the activity was the same as described in Table 1.

Relative activity (%) for L- α -aminoacyl- β -naphthylamide									
Leu	Ile	Val	Gly	Ala	Ser	Asp	Arg	Phe	Pro
100	14	56	3	99	7	0	2	44	186

Table 4. Substrate specificity of the enzymes of various peptides. Relative activities were calculated with the activities against Leu-(Gly)₂ for AP-Ia and AP-III, and Leu-Gly for AP-II. All peptides used consisted of L configuration amino acid. The assay method of the enzyme activities were the same as described in Table 1.

Substrate	Relative activity (%)		
	AP-Ia	AP-II	AP-III
Leu-(Gly) ₂	100	0	100
Leu-Gly	0	100	0
(Gly) ₃	66	0	68
(Gly) ₂	1	9	0
(Ala) ₄	46	0	0
(Ala) ₃	286	0	380
(Ala) ₂	123	124	0
Val-Tyr-Val	—	0	21
Val-Tyr	—	101	0
Phe-(Gly) ₂	—	0	126
Phe-Gly	—	0	0
Gly-Leu	—	67	0
Ala-Leu	—	144	0
Pro-Gly	—	0	0
Leu-amide	0	0	0
Gly-Phe-amide	0	0	0
Gly-Tyr-amide	0	0	0
Bz-Gly-Arg	0	0	0
Bz-Gly-Phe	0	0	0

層液を用い上昇法で行った。その結果, AP-Ia では反応時間の経過に伴い Leu-(Gly)₂ が消失し, Leu 及び (Gly)₂ の生成が確認でき, 長時間反応では微量の Gly の生成が認められた。一方, AP-III では反応経過に伴い Leu-(Gly)₂ の消失と Leu 及び (Gly)₂ の生成が認められたが, 長時間反応物でも Gly の生成は認められなかった。

考 察

コイ筋肉から3種のアミノペプチダーゼ系の酵素 (AP-Ia, AP-II, AP-III) を部分精製し, その性質を調べた。

AP-Ia は種々のアミノ酸-βNA を水解するアリルアミダーゼ活性をもち, かつジ, トリ及びテトラペプチドにも作用した。Leu-(Gly)₂ に対する水解機構をベークロマトグラフィーで調べた結果, N末端側から順次水解するアミノペプチダーゼ作用をもつことが判明した。本酵素の各種アミノ酸-βNA 水解活性の比は, Pro (100) > Leu (54), Ala (53) > Val (30), Phe (24) > Ile (8) > Ser (4), Gly (2), Arg (1) > Asp (0) であった。すなわち, Pro-βNA をよく水解し, 酸性及び塩基性アミノ酸-βNA をほとんど水解しなかった。分枝アミノ酸では γ-分枝の

Val と Ile の間で水解活性に大きな差があった。これらの特性はヒト肝臓のアミノペプチダーゼ¹³⁾ [EC 3.4.11.14] (Ala (100) > Phe (63) > Leu (36), Arg (28) > Gly (13) > Ser (6), Glu (4), Ile (3)) 及び次報で報告する予定である Fig. 1 の No. 175~186 に現れた AP-Ib 画分の酵素 (精製し, 最適 pH 7.0 のアミノペプチダーゼであることを確認している。Ala (100) > Phe (83), Arg (77) > Leu (62) > Pro (10), Ser (9), Gly (6), Val (4), Ile (4) > Asp (0)) の基質特異性とはかなり異なっていた。また, 本酵素の Ala からなるペプチドに対する活性比は (Ala)₃ (100) > (Ala)₂ (43) > (Ala)₄ (10) であった。このことより, 本酵素のテトラペプチド以上の基質に対する活性は低くなることが予想される。本酵素はロイシンアミノペプチダーゼ [EC 3.4.11.1] の好基質である Leu-NH₂ や Leu-Gly を全く水解しなかった。また Pro-βNA をよく水解するのでアミノペプチダーゼ M [EC 3.4.11.2] ではない。本酵素が Pro-βNA をよく水解したことより, プロリンイミノペプチダーゼ [EC 3.4.11.5] やプロリルジペプチダーゼ [EC 3.4.13.8] に類似した酵素とも考えられたが, これらの酵素は Mn²⁺ で活性化され, N末端が Pro 以外の基質には作用しないとされている。^{14,15)} AP-Ia は精製酵素標品でないため, 基質特異性の比較のみで上記の2種の酵素とは異なる酵素であると断定することはできない。今後さらに精製し本酵素の性質を明らかにする必要がある。

AP-II はアリルアミダーゼ活性はなく, アミノ基とカルボキシル基の両者が遊離している種々のジペプチドにのみ作用した。このことより本酵素はジペプチダーゼ [EC 3.4.13.11] であると判定した。本酵素の最適 pH は 8.5 であり, サル,¹⁶⁾ ブタ¹⁷⁾ の小腸粘膜可溶性ジペプチダーゼの pH 7.8 より少し高かった。分子量は約 115,000 であり, サル小腸粘膜¹⁸⁾ (MW 107,000, 54,000 のダイマー) 及びブタ腎臓ミクロソーム¹⁹⁾ (MW 90,000) のジペプチダーゼの分子量に近かった。本酵素は o-PHE で阻害され, Mn²⁺, Mg²⁺, Co²⁺ により若干活性化され, 金属酵素の性質を示した。ジペプチダーゼの o-PHE による失活は他起源の酵素でも報告されている。^{16,19)} サル小腸の酵素¹⁸⁾ は Zn²⁺ により活性化されるが, この影響は Tris 緩衝液での反応下ではみられなかったと報告されている。¹⁸⁾ 本酵素では, ブタ小腸粘膜の膜結合ジペプチダーゼ²⁰⁾ と同様に Zn²⁺ により活性は低下した。なお, Hayman and Patterson²¹⁾ はマウス腹水腫瘍細胞から 800 倍に精製したジペプチダーゼで金属イオンの影響は基質の種類により非常に異なると述べている。本酵素は SH 試薬の PCMB や DTNB により阻害され, 活性に SH 基が関与していることが推察された。しかし, SH 還元試薬の 2-MER や DTT でも阻

害された。同様の性質はサル小腸粘膜¹⁶⁾の酵素及びブタ小腸粘膜²⁰⁾の酵素でも報告されている。一方、魚筋肉では精製酵素の報告はないが、Schmitt⁵⁾らはタラ筋肉に5種、小長谷⁸⁾はスケトウダラ筋肉に12種のジペプチダーゼが存在すると推定している。これらの実験は粗抽出液を酵素液とし、各種ジペプチドの水解に対する金属イオン、キレート試薬及びpHの影響などから推定したものである。本実験ではFig. 1のNo. 78~85にLeu-Glyのみを水解する小さなピークが存在した。このことより、他のジペプチダーゼが存在することも推察されるし、ブタ腎臓酵素²³⁾のように本酵素ではあまり水解しなかった(Gly)₂をよく水解する酵素の存在や酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸及びProなどをN末端にもつジペプチドに各々特異性をもつ酵素の存在も考えられる。これらに関しては今後の研究によらねばならない。

AP-IIIはアリルアミダーゼ活性はなく、トリペプチドにのみ作用し、しかもLeu-(Gly)₂を基質にしたとき、N末端のLeuのみが遊離されることをペーパクロマトグラフィーで確認した。これらのことより、AP-IIIはトリペプチドアミノペプチダーゼ[EC 3.4.11.4] (以下トリペプチダーゼと呼ぶ)であると判定した。本酵素の最適pHは7.3であり、ブタ小腸粘膜の可溶性²³⁾及び膜結合²⁰⁾トリペプチダーゼ(最適pH 7.5, 8.0)やブタ腎臓²⁴⁾(最適pH 7.8)の酵素よりやや低かった。分子量は約107,000であり、これはブタ小腸^{20, 23)}の酵素(MW 45,000, 50,000)より大きかったが、ブタ腎臓²⁴⁾の酵素(MW 142,000, 71,000のダイマー)よりは小さかった。本酵素は α -PHEで阻害され、Co²⁺で若干活性化された。また、PCMBで阻害され、DTTで活性化された。このように金属酵素とSH酵素様の性質を示した。同様の性質はブタ腎臓²⁴⁾のトリペプチダーゼでも報告されている。トリペプチダーゼは動物組織に広く存在するとされているが、²⁵⁾精製酵素の研究例は非常に少ない。従って、基質特異性もあまり明らかでないが、ブタ腎臓の酵素²⁴⁾は基質特異性が非常に広い酵素である。魚筋肉に関しては小長谷⁸⁾がスケトウダラを初め数魚種について検策し、基質特異性の広いトリペプチダーゼが魚類に広く存在すると推察している。本酵素も、用いた6種のトリペプチドを全て水解しており、基質特異性の広い酵素と考えられる。

以上、コイ筋肉抽出液の(NH₄)₂SO₄塩析画分をDEAE-Sphacelカラムクロマトグラフィーに供し、未吸着画分にアミノペプチダーゼ(AP-Ia)とトリペプチダーゼ(AP-III)、吸着画分にジペプチダーゼ(AP-II)とアミノペプチダーゼ(AP-Ib)が存在することを明ら

かにした。このうち、AP-Ia, Ib, IIIはほぼ中性域に最適pHをもつ酵素であったことより、これらの酵素が初めに述べた中性域における魚肉の自己消化時のニンヒドリン陽性物質の増加に関与していることは充分考えられる。

文 献

- 1) Y. Otsuka, A. Okitani, P. Katakai, and M. Fujimaki: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 2335-2342 (1976).
- 2) Y. Otsuka, A. Okitani, Y. Kondo, H. Kato, and M. Fujimaki: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1617-1622 (1980).
- 3) A. Okitani, T. Nishimura, and H. Kato: *Eur. J. Biochem.*, **115**, 269-274 (1981).
- 4) T. Nishimura, A. Okitani, R. Katakai, and H. Kato: *Eur. J. Biochem.*, **137**, 23-27 (1983).
- 5) V. A. Schmitt and G. Siebert: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 1009-1016 (1967).
- 6) 小長谷史郎: 東海区水産研究所研究報告, 第94号, 1-28 (1978).
- 7) N. R. Jones: *Biochem. J.*, **60**, 81-87 (1955).
- 8) Y. Makinodan and S. Ikeda: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **42**, 665-670 (1976).
- 9) A. Okitani, Y. Otsuka, M. Sugitani, and M. Fujimaki: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 573-579 (1974).
- 10) M. Matsutani, M. Takehisa, R. Fukuba, A. Simasue, and N. Kikukawa: *J. Med. Technol.*, **11**, 300-307 (1967).
- 11) E. Doi, D. Shibata, and T. Matoba: *Anal. Biochem.*, **118**, 173-184 (1981).
- 12) P. Andrews: *Biochem. J.*, **224**, 4406-4412 (1969).
- 13) F. J. Behal, G. H. Little, and R. A. Klein: *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 118-127 (1969).
- 14) A. Nordwig and H. Mayer: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **354**, 380-383 (1973).
- 15) A. F. Akrawi and G. S. Bailey: *Biochim. Biophys. Acta*, **422**, 170-178 (1976).
- 16) M. Das and A. N. Radhakrishnan: *Biochem. J.*, **128**, 463-465 (1972).
- 17) O. Norén, H. Sjöström, and L. Josefsson: *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 446-456 (1973).
- 18) M. Das and A. N. Radhakrishnan: *Biochem. J.*, **135**, 609-615 (1973).
- 19) C. Harper, A. Rene, and B. J. Campbell: *Biochim. Biophys. Acta*, **242**, 446-458 (1971).
- 20) 長谷川喜斐, 児玉治, 赤塚尹巳: 日農化, **59**, 397-403 (1985).
- 21) S. Hayman and E. K. Patterson: *J. Biol. Chem.*, **246**, 660-669 (1971).
- 22) B. J. Campbell, Y. C. Lin, R. V. Davis, and E. Bailey: *Biochim. Biophys. Acta*, **118**, 371-386 (1966).
- 23) 長谷川喜斐, 児玉治, 赤塚尹巳: 日農化, **58**, 9-16 (1984).
- 24) D. Chenoweth, R. E. J. Mitchel, and E. L. Smith: *J. Biol. Chem.*, **248**, 1672-1683 (1973).