発芽ダイズ種子カルボキシペプチダーゼ (第1報¹⁾) 2種のカルボキシペプチダーゼの精製と性質

久保田幸穂, 庄司省三, 山中照明, 大和正明
熊本大学薬学部²⁾

Carboxypeptidases from Germinating Soybeans. I. Purification and Properties of Two Carboxypeptidases

YUKIHO KUBOTA, SHOZO SHOJI, TERUAKI YAMANAKA and MASAOKI YAMATO
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University²⁾

(Received November 21, 1975)

Two kinds of carboxypeptidases, CPase S_a and CPase S_b, were separated from germinating soybeans (*Glycine Max.* AKIYOSHI) in a highly purified form. The enzymes liberated neutral, acidic, and basic amino acids including proline from the C-termini of N-substituted dipeptides at varying rates. Of the substrates tested, Z-Gly-Pro, Z-Pro-Pro, Z-Glu-Pro, Bz-Gly-Lys, and Bz-Gly-Arg were hydrolyzed very slowly. The specific activities of purified CPase S_a and S_b were 0.11 and 3.68 units/mg of protein, respectively, for Z-Glu-Phe. The enzyme also released C-terminal amino acid residues from peptide and protein substrates. They possessed weak esterase activity, but were free of endopeptidase and aminopeptidase activities. They had a pH optimum at 5.5 for Z-Glu-Phe. CPase S_b was strongly inhibited by diisopropylfluorophosphate (DFP) and HgCl₂, whereas CPase S_a was only partially inhibited. Other metal ions, anions, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), *o*-phenanthroline, N-ethylmaleimide (NEM), *p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB), dithiothreitol (DTT), and monoiodoacetic acid (MIA) showed no significant effect on the enzymic activity. The molecular weight of CPase S_a was 99000 ($s_{20,w}=6.9S$, $D_{20,w}=6.4 \times 10^{-7}$ cm²/sec) and that of CPase S_b, 106000 ($s_{20,w}=6.1S$, $D_{20,w}=5.4 \times 10^{-7}$ cm²/sec).

カルボキシペプチダーゼとして従来から広く研究の対象とされている豚 CPase A³⁾[EC 3.4.12.2] および B[EC 3.4.12.3] はいずれも Zn を活性中心にもつ金属酵素で, CPase A は中性および酸性アミノ酸を, また CPase B は主として塩基性アミノ酸をペプチド鎖 C 末端から順次遊離する。しかし両酵素ともペプチド鎖中のプロリンによってその作用をブロックされ, 水解はそこで停止する。これに対し Zuber⁴⁾ がオレンジの果皮中にペプチド鎖 C 末端プロリンを遊離する特異的な CPase C[EC 3.4.12.1] を発見して以来, 数種の植物起源の CPase⁵⁻¹¹⁾

- 1) 本論文の一部は日本薬学会第 81 回九州支部例会で発表。福岡, 1973 年 2 月。
- 2) Location: 5-1 Ōe-Honcho, Kumamoto, 862, Japan.
- 3) 次の略字を使用した。CPase: カルボキシペプチダーゼ, Z: ペンジルオキシカルボニル, Bz: ペンゾイル, NPA: *p*-ニトロフェニルアセテート, TAME: N-トシル-L-アルギニンメチルエステル, DFP: ジイソプロピルフルオロフォスフェート, EDTA: エチレンジアミン四酢酸, NEM: N-エチルマレイニミド, MIA: モノイオド酢酸, PCMB, *p*-クロロマーキュリ安息香酸, DTT: ジチオスライトール, PMSF: フェニルメタンサルフォニルフロリド。
- 4) H. Zuber, *Nature*, **201**, 613 (1964); *idem*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **349**, 1337 (1968).
- 5) B. Sprössler, H.-D. Heilman, E. Grampp, H. Uhlig, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1524 (1971).
- 6) J.R.E. Wells, *Biochem. J.*, **97**, 228 (1965); *idem*, *Biochim. Biophys. Acta*, **167**, 388 (1968).
- 7) K. Visuri, J. Mikola, T.-M. Enari, *Europ. J. Biochem.*, **7**, 193 (1969).
- 8) J.N. Ihle, L.S. Dure, III, *J. Biol. Chem.*, **247**, 5034 (1972); *idem*, *ibid.*, **247**, 5041 (1972); *idem*, *ibid.*, **247**, 5048 (1972).
- 9) T. Matoba, E. Doi, *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 1891 (1974); *idem*, *ibid.*, **38**, 1901 (1974).
- 10) Y. Kubota, S. Shoji, T. Funakoshi, H. Ueki, *J. Biochem.*, **74**, 757 (1973); *idem*, *ibid.*, **76**, 375 (1974).
- 11) 久保田幸穂, 庄司省三, 船越崇行, 植木 寛, 薬誌, **94**, 964 (1974).

が単離された。これらはいずれも動物起源の CPase A および B と異なって広い基質特異性をもち、ペプチド鎖 C 末端が中性、酸性および塩基性アミノ酸のみならずプロリンの場合にもこれらを遊離することができるので、タンパク質の C 末端配列分析に適すると考えられる。

ダイズ種子はタンパク質に富み、深沢ら¹²⁾ は発芽時にはその貯蔵タンパク (protein body) が急速に分解されることを電子顕微鏡を用いて解析した。この protein body の分解のためには種々の加水分解酵素が必要であり、発芽とともに加水分解酵素が生産されると推定される。本研究は発芽ダイズ種子から CPase を分離してその酵素化学的性質を明らかにするとともに、C 末端配列分析への応用を試みる目的で行った。この結果 2 種の酵素 CPase S_a および S_b を分離したが、前者の阻害剤に対する態度が他の植物 CPase と異なることを見出した。

実 験 の 部

酵素材料 ダイズ (*Glycine Max.* AKIYOSHI) は熊本県産のものを熊本県農業試験場より入手した。

試薬 Z-Glu-Phe, Z-Glu-Tyr, Z-Phe-Tyr, Z-Gly-Leu, Z-Phe-Pro, Z-Gly-Phe, Z-Gly-Pro, Z-Pro-Pro, Z-Glu-Pro, Bz-Gly-Arg, Bz-Gly-Lys, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Pro, leucinamide, TAME, Z-Gly-Pro-Leu-Gly は大阪大学蛋白質研究所から入手した。また、Z-Pro-Phe, NEM は Fluka 社, ウシ血漿アルブミンは Armour 社, NPA, HgCl₂, PCMB, Woodward 試薬 K は半井化学, DFP は Sigma 社, PMSF は Eastman Kodak 社, ワコーゲル B-5, EDTA は和光純薬, MIA は E. Merck 社, DTT, ヒトヘモグロビン (2×再結晶), DEAE-および CM-セルロースは生化学工業, o-フェナンスロリンは片山化学, セファデックス G-75 は Pharmacia 社, セルロースアセテート膜は常光産業, コロジオンバッグは Sartorius-Membrane Filter 社から入手した。他の試薬および有機溶媒はすべて特級または精密分析用を用いた。

酵素活性の測定 CPase 活性および他の酵素活性の測定は前報¹⁰⁾ 記載の方法により測定した。CPase 活性の測定には通常 0.02M Z-Glu-Phe を基質として用い、1 分間に 1 μmole のフェニルアラニンを基質から遊離させるのに必要な酵素量を 1 単位とし、比活性は酵素 1 mg あたりの単位数で表わした。他の合成基質の場合も同様に測定した。

タンパク質濃度の測定 タンパク質濃度は日立 101 型分光光度計を用い、280 nm における吸光度を測定して求めた。標準タンパク質としてウシ血漿アルブミンを用いた。

ディスク電気泳動 ディスク電気泳動は 0.03M ベロナール緩衝液, pH 7.0 を用い、Williams および Reisfeld,¹³⁾ Reisfeld, *et al.*¹⁴⁾ の方法に従って行なった。

超遠心分析 超遠心による純度検定および分子量測定は日立 UCA-1A 型超遠心機を用いて行なった。精製酵素溶液を 0.05M クエン酸緩衝液, pH 5.5 に対して一夜透析し最終濃度を 0.7% としたものを試料とした。沈降係数の測定は標準セルを用い 51200 および 60000 rpm の回転数で、拡散係数の測定は合成界面セルを用いて 15590 rpm で行ない、各実測値を 20° の純水中の値に換算してそれぞれ $s_{20,w}$ $D_{20,w}$ とした。

ペプチドおよびタンパク基質の水解 CPase S_a, S_b の高分子基質に対する作用を検討するため、Z-Gly-Pro-Leu-Gly, ウシ血漿アルブミン, ヒトヘモグロビンを用いて水解を試みた。基質 0.2—0.4 μmole を 0.1M クエン酸緩衝液, pH 5.5, 0.2 ml に溶かし、これに酵素溶液 (0.4—1.0 nmole) 0.1 ml を加え、35° で 0, 1, 2, 4, 24 hr 反応させた。各反応時間後、0.2M クエン酸緩衝液, pH 2.2 あるいは 0.1N HCl を 1.7 ml 加えて酵素反応を停止させ、コロジオンバックによる限外濾過により除タンパクを行ない、溶液中の遊離アミノ酸を日立 KLA-5 型アミノ酸分析計を用いて測定した。

結 果

発芽日数と酵素活性

発芽日数と酵素活性 (比活性) および酵素収量 (全活性) との関係を Fig. 1 に示す。全活性は発芽 4 日目以後はほぼ一定の値となったが、比活性は発芽日数とともに増加した。しかし発芽 5 日目以後はクロロフィルの生成が認められ、これが精製の障害となるので発芽 4 日目に収穫して酵素材料とした。

抽出、硫酸および等電点分画 発芽ダイズ種子 500 g に 1% MgCl₂ 水溶液 1 liter を加えてホモジナイズし、200—400 メッシュのナイロン布で濾過した。濾液を 4° で 1 夜放置したのち、11000×g で 15 min 遠心分離して得た上清 (M₁) に攪拌下結晶硫酸を加えて 0.4 硫酸飽和溶液とした。これを 1 夜放置したのち遠心分離して得た上清に再び結晶硫酸を加えて 0.8 硫酸飽和溶液とした。生じた沈殿を遠心分離して集め、少量の精製水に溶

12) 深沢親房, 宇高京子, 山口やす子, 貝沼圭二, 鈴木繁男, 生化学, **47**, 389 (1975).

13) D.E. Williams, R.A. Reisteld, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 373 (1964).

14) R.A. Reisteld, V.J. Lewis, D.E. Williams, *Nature*, **195**, 281 (1962).

Fig. 1. Effect of Germination Time on Carboxypeptidase Activity

Soybeans were germinated in the dark at room temperature in sea sand. Enzymatic activity was determined with crude enzyme (fraction M_3) as described under "Method" with Z-Glu-Phe as a substrate.

—○—: specific activity
—●—: total activity

Fig. 2. DEAE-Cellulose Column Chromatography of Fraction M_5

Effluent was collected in 5 ml fractions.

eluant: 1. 0.05M acetate buffer, pH 6.0

2. 0.1M acetate buffer, pH 6.0

3. 0.14M acetate buffer, pH 6.0

4. 0.22M acetate buffer, pH 6.0

flow rate: 20 ml/hr

—: absorption at 280 nm

.....: specific activity estimated with Z-Glu-Phe as a substrate

かし、精製水に対して3日間透析したのち、その透析内液を粗酵素 M_3 とした。 M_3 を 0.01M クエン酸緩衝液、pH 4.5 に対して4°で1夜透析し、生じた沈殿を遠心分離して除き、上清を 0.05M 酢酸緩衝液、pH 6.0 に対して4°で1夜透析したものを M_5 とした。発芽ダイズ 1 kg あたりの M_1 , M_3 , M_5 の収量はそれぞれ 93.6 g (9.4%), 5.6 g (0.56%), 2.6 g (0.26%)。

DEAE-セルロースカラムによる精製

0.05M 酢酸緩衝液、pH 6.0 で平衡化した DEAE-セルロースカラム (1.5×30 cm) に、同じ緩衝液に溶かした M_5 2.5 ml (329 mg) を添加し、0.05, 0.1, 0.14, 0.22M 酢酸緩衝液、pH 6.0 を用いて段階的に溶出した (Fig. 2)。酵素活性の大部分はカラムを素通りする画分 (D_1 , fraction Nos. 1—10) および 0.22M で溶出する画分 (M_7 , fraction Nos. 65—75) に検出された。 M_5 329 mg からの D_1 および M_7 の収量はそれぞれ 52.4 mg (15.9%), 6.0 mg (1.8%)。以後 D_1 および M_7 から精製した酵素をそれぞれ CPase S_a および CPase S_b とよぶ。

D_1 および M_7 からの CPase S_a , S_b の精製

CPase S_a は CM-セルロースカラムクロマトグラフィーおよび2回の Sephadex G-75 ゲル濾過により、また CPase S_b は同様2回のゲル濾過とセルロースアセテート膜電気泳動により精製した。

(1) CM-セルロースカラムクロマトグラフィー 0.01M 酢酸緩衝液、pH 5.5 で平衡化した CM-セルロースカラム (1.5×25 cm) に同じ緩衝液に溶かした D_1 11 ml (68.9 mg) を添加し、0.01, 0.03, 0.1M 酢酸緩衝液、pH 5.5 を用いて段階的に溶出した (Fig. 3)。酵素活性の大部分は 0.03M で溶出する画分 (D_3 , fraction Nos. 55—65) に検出された。 D_1 68.9 mg からの D_3 の収量は 14.3 mg (20.8%)。

(2) Sephadex G-75 によるゲル濾過 ゲル濾過による精製は 0.1M クエン酸緩衝液、pH 5.5 で平衡化した Sephadex G-75 カラム (4×100 cm) を用いて行った。 D_3 を試料とする第1回ゲル濾過、およびそれによって得られた活性画分 D_4 を試料とする第2回ゲル濾過の溶出曲線を Fig. 4 に、また同様に M_7 , M_8 をそれぞれ試料とする第1回、第2回ゲル濾過の溶出曲線を Fig. 5 に示す。 D_3 2 ml (97 mg) による第1回ゲル濾過の結果得られた D_4 (Fig. 4, × で示した溶出曲線の fraction Nos. 16—22) の収量は 14.8 mg (15.3%), また D_4 2 ml (45 mg) による第2回ゲル濾過の結果得られた比活性の等しい画分 D_5 (Fig. 4, ○ で示した溶出曲線の fraction No. 18—21) の収量は 9.3 mg (20.6%) であった。 D_5 はこの画分の最終精製品で、これを CPase S_a とした。

一方 M_7 2 ml (47 mg) による第1回ゲル濾過の結果得られた活性画分 M_8 (Fig. 5, × で示した溶出曲線の fraction No. 18—25) の収量は 4.9 mg (10.5%), また M_8 2 ml (28 mg) による第2回ゲル濾過の結果得られた

Fig. 3. CM-Cellulose Column Chromatography of Fraction D_1

Effluent was collected in 5 ml fractions.

eluant: 1. 0.01M acetate buffer, pH 5.5

2. 0.03M acetate buffer, pH 5.5

3. 0.1M acetate buffer, pH 5.5

4. 0.5N NaOH

flow rate: 20 ml/hr

—: absorption at 280 nm

.....: specific activity estimated with Z-Glu-Phe as a substrate

Fig. 5. Elution Patterns of Fraction M_7 and M_8 on a Column of Sephadex G-75

The first gel filtration ($\times$) was carried out with fraction M_7 , and the resulting active peak (M_8 , fraction Nos. 18—25) was submitted to the second gel filtration ($\circ$).

Effluent was collected in 5 ml fractions.

eluant: 0.1M citrate buffer, pH 5.5

flow rate: 20 ml/hr

—: absorption at 280 nm

.....: specific activity estimated with Z-Glu-Phe as a substrate

Fig. 4. Elution Patterns of Fraction D_3 and D_4 on a Column of Sephadex G-75

The first gel filtration ($\times$) was carried out with fraction D_3 , and the resulting active peak (D_4 , fraction Nos. 16—22) was submitted to the second gel filtration ($\circ$). Effluent was collected in 5 ml fractions.

eluant: 0.1M citrate buffer, pH 5.5

flow rate: 20 ml/hr

—: absorption at 280 nm

.....: specific activity estimated with Z-Glu-Phe as a substrate

Fig. 6. Cellulose Acetate Paper Electrophoresis of Fraction M_9

Fraction M_9 was applied to a starting line which was drawn 1.5 cm from the cathode-side edge of the paper. Electrophoresis was carried out at a constant current of 0.6 mA/cm for 13 hr.

活性画分 M_9 (Fig. 5, $\circ$ で示した溶出曲線の fraction Nos. 18—25) の収量は 9.3 mg (33.2%) であった。

(3) セルロースアセート膜電気泳動による精製

M_9 のセルロースアセート膜電気泳動による精製は前報¹⁰⁾ 記載の方法に準じて行った。0.1M クエン酸緩

衝液, pH 5.5 で浸潤したセルロースアセート膜 (2×6 cm) を電気泳動槽 (東洋科学産業 SE-2 型) にセットし, 陰極側から 1.5 cm の位置に, 限外濾過によって濃縮した M_9 (0.1 mg) を塗布して電気泳動を行った (Fig. 6)。ついでセルロースアセート膜を長辺方向に 2 分し, その一方 (guide strip) をボンソー 3R で 1.5 min 染色したのち 1% CH_3COOH で脱色した。これを参照してタンパクのバンド (A, B, C) を切りとり, 同じ緩衝液で 1 夜抽出した。酵素活性はバンド A (M_{10}) に検出された。 M_9 1 mg からの M_{10} の収量は 0.35 mg (35%) であった。Table I に両酵素の精製結果をまとめた。

純度および分子量

CPase S_a および S_b のディスク電気泳動図を Fig. 7 に, 超遠心沈降図を Fig. 8 に示す。この結果から両酵素ともほぼ均質と認められた。沈降係数 $s_{20,w}$ は CPase S_a が 6.9S, S_b が 6.1S, また拡散係数 $D_{20,w}$ は CPase S_a が $6.4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$, S_b が $5.3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ であった。これらの測定値から分子量は CPase S_a 99000,

TABLE I. Purification of Carboxypeptidase S_a and S_b from Germinating Soybeans

Fraction	Amount ^{a)} (mg)	Total activity (units)	Specific ^{b)} activity (units/mg protein)	Purifi- cation (-fold)	Recovery of activity (%)
M ₁	112316	78.6	0.0007	1	100
M ₃	6769	60.9	0.009	13	77
M ₅	3135	53.3	0.017	24	68
CPase S _a					
D ₁	499	9.5	0.019	27	12
D ₃	104	3.1	0.030	43	4
D ₄	16	1.0	0.064	91	1.3
D ₅	3.3	0.4	0.11	157	0.5
CPase S _b					
M ₇	57	13.1	0.23	329	17
M ₈	6	8.6	1.43	2043	11
M ₉	2	7.7	3.83	5471	10
M ₁₀	0.7	2.6	3.68	5257	3.3

Fraction D₁ and M₇ were separated from the same crude enzyme, fraction M₅, by DEAE-cellulose chromatography.

a) amounts from 1200 g of germinating soybeans

b) specific activities toward Z-Glu-Phe

S_b 106000 と算出された。なお偏比容として CPase S_b のアミノ酸組成から求めた値 0.736 ml/g を用いた。

最適 pH および最適温度

両酵素に対する pH および温度の影響をそれぞれ Fig. 9, 10 に示す。最適 pH は両酵素とも pH 5.5 であった。また、基質との反応時間 30 min の場合の最適温度は CPase S_a が 70°, S_b が 50° であった。

基質特異性

CPase S_a (17.8 nmole) および S_b (2.7 nmole) 0.1 ml を基質 (0.02M) 0.2 ml に加え、50° で 10—60 min 反応させ遊離するアミノ酸を測定し、両酵素の各基質に対する相対活性を算出した (Table II)。両酵素とも中性、酸性および塩基性アミノ酸のみならずプロリンも C 末端から遊離した。また両酵素とも弱いエステラーゼ活性を示し、TAME および NPA に対する比活性はそれぞれ CPase S_a が 0.008 および 0.016、CPase S_b が 0.12 および 0.024 であった。しかし、ウシ血漿アルブミンに対するアルカリ性および酸性エンドペプチダーゼ活性、Gly-Gly-Gly に対するトリペプチダーゼ活性、Gly-Gly に対するジペプチダーゼ活性、Gly-Pro に対するプロリダーゼ活性および leucinamide に対するロイシンアミノペプチダーゼ活性はいずれも認められなかった。

イオン、キレート剤および化学修飾剤の酵素活性におよぼす影響

Table III に両酵素に対する金属イオン、アニオンおよび化学修飾剤の影響を示す。CPase S_b は最終濃度 1 mM の HgCl₂ および DFP との 35°, 30 min および 120 min の反応によってほぼ完全に失活したが、CPase

Fig. 7. Disc Electrophoresis of Carboxypeptidase S_a and S_b

Migration was from top to bottom (cathode to anode)

gel: 7.0% polyacrylamide gel, pH 8.0

current: 4 mA/tube

time: CPase S_a, 60 min; CPase S_b, 150 min

staining: amido-black 10 B

sample: CPase S_a, 141 μg; CPase S_b, 210 μg

Fig. 8. Sedimentation Patterns of Carboxypeptidase S_a and S_b

Sedimentation was from right to left.
 protein concentration: 0.7%
 phase plate angle: CPase S_a , 60° ; CPase S_b , 65°
 rotor speed: CPase S_a , 51200 rpm; CPase S_b , 60000 rpm
 cell: 12 mm conventional cell
 Photographs were taken 9, 36, and 54 min after the rotor had attained maximum speed.

Fig. 9. Effect of pH on Activity of Carboxypeptidase S_a and S_b

Enzyme in 0.1M citrate buffer, pH 5.5, was dialyzed overnight against 0.1M citrate buffer of pH values between 3.5 and 8.0. Enzymatic activity was determined with Z-Glu-Phe as a substrate. Incubation was carried out at 50° for 30 min.

—●—: CPase S_a —○—: CPase S_b

Fig. 10. Effect of Temperature on Activity of Carboxypeptidase S_a and S_b

Enzymatic activity was determined with Z-Glu-Phe as a substrate. Incubation was carried out in 0.1M citrate buffer, pH 5.5, for 30 min at temperatures between 35 and 90° .

—●—: CPase S_a —○—: CPase S_b

S_a は $HgCl_2$, DFP との反応後もなおそれぞれ 57%, 74% の活性を保持していた。CPase S_b は PMSF によってもかなりの活性低下を示した。他のイオン、化学修飾剤は両酵素に対し顕明な影響をあたえなかった。

ペプチドおよびタンパク質の水解

両酵素による高分子基質水解の結果を Table IV にまとめた。CPase S_a の高分子基質の水解速度は低く、Z-

TABLE II. Substrate Specificity of Carboxypeptidase S_a and S_b

Substrate	Relative activity (%) ^{a)}	
	CPase S _a	CPase S _b
Z-Glu-Phe	100	100
Z-Glu-Tyr	81.3	47.7
Z-Phe-Tyr	25.0	96.8
Z-Phe-Pro	14.6	14.6
Z-Gly-Leu	8.3	17.0
Z-Gly-Phe	8.3	4.4
Z-Gly-Pro	6.3	1.1
Z-Pro-Pro	2.1	4.9
Z-Glu-Pro	1.9	3.4
Z-Pro-Phe	1.5	26.3
Bz-Gly-Lys	0.8	1.7
Bz-Gly-Arg	0.5	0.8

a) Expressed as percentages of the activities toward Z-Glu-Phe, which were 0.11 and 3.68 units/mg protein for CPase S_a and S_b, respectively.

TABLE III. Effects of Metal Ions, Anions, and Chemical Reagents on the Activity of Carboxypeptidase S_a and S_b

Ion or reagent	Relative activity (%) ^{a)}		Ion or reagent	Relative activity (%) ^{a)}	
	CPase S _a	CPase S _b		CPase S _a	CPase S _b
Control ^{b)}	100	100	I ⁻	96	109
Li ⁺	97	103	NO ₃ ⁻	103	101
Cu ⁺	100	100	SO ₄ ²⁻	88	102
Ca ²⁺	85	92	S ²⁻	88	110
Cd ²⁺	96	107	H ₂ PO ₄ ⁻	88	99
Co ²⁺	89	108	PCMB	82	94
Mg ²⁺	100	107	MIA	83	99
Mn ²⁺	102	108	NEM	108	101
Zn ²⁺	87	96	DFP	74	5
Hg ²⁺	57	4	PMSF	76	41
Fe ²⁺	87	101	Woodward's reagent K	80	93
Fe ³⁺	111	96	DTT	98	105
Al ³⁺	93	97	EDTA	88	92
Cl ⁻	102	112	o-Phenanthroline	93	103
Br ⁻	84	105			

CPase S_a (0.9 nmole) and CPase S_b (0.1 nmole) were preincubated with 10⁻³M metal ions (as chloride), anions (as sodium salt), or chemical reagents at 35° for 30 min in 0.2 ml of 0.1M citrate buffer, pH 5.5. Enzymatic activity was determined with Z-Glu-Phe as a substrate.

a) expressed as a percentage of the activity of control

b) In control, preincubation was carried out under the same conditions except for omission of ions and reagents.

Gly-Pro-Leu-Gly との 24 hr の反応で、グリシン、ロイシンおよび痕跡量のプロリンを遊離した。ウシ血漿アルブミン、ヒトヘモグロビンではそれぞれ C 末端のアラニン、ヒスチジンの痕跡量の遊離が認められるにとどまった。これに対し CPase S_b では Z-Gly-Pro-Leu-Gly との 4 hr までの反応で C 末端から順次グリシン、ロイシン、プロリンの遊離が認められた。ウシ血漿アルブミンでは 2 hr の反応で C 末端アラニンと痕跡量の 2 番目のロイシンが、またヒトヘモグロビンでは α 鎖 C 末端アルギニンと β 鎖 C 末端ヒスチジンが遊離した。

TABLE IV. Hydrolysis of Z-Gly-Pro-Leu-Gly, Bovine Plasma Albumin, and Human Hemoglobin by Carboxypeptidase S_a and S_b

Substrate	Amino acid	$\mu\text{mole}/\mu\text{mole}$ of substrate Incubation time (hr)				
		CPase S _b				CPase S _a 24
		0.5	1	2	4	
Z-Gly-Pro-Leu-Gly	Gly	0.176	0.352	0.517	0.681	0.055
	Leu	0.054	0.109	0.256	0.461	0.007
	Pro	0	0	trace	0.008	trace
Bovine plasma albumin	Ala	0	trace	0.069		trace
	Leu	0	0	trace		0
Human hemoglobin	His	0.393	0.548	0.623		trace
	Arg	0	trace	0.080		0

The substrates, Z-Gly-Pro-Leu-Gly (4 μmole), bovine plasma albumin (0.4 μmole), and human hemoglobin (0.2 μmole) were incubated separately with 100 μg (1 nmole) of CPase S_a or 40 μg (0.4 nmole) of CPase S_b at 35° in 0.3 ml of 0.1M citrate buffer, pH 5.5. At the indicated times, the enzymatic reactions were stopped by the addition of 1.7 ml of 0.2M citrate buffer, pH 2.2, or 0.1N HCl, and the concentrations of amino acids liberated were determined with an amino acid analyzer.

考 察

著者ら¹⁰⁾ はすでにナツミカンの外果皮から CPase C_N (分子量 93000), またウンシュウミカンの外果皮から 2 種の酵素 CPase C_u (分子量 96000), CPase C_b (分子量 112000) を分離した.¹⁵⁾ このほか高等植物の CPase としてはインゲンマメから分離された phaseolain,⁶⁾ オレンジ CPase C,^{4,5)} 発芽オオムギ CPase,⁷⁾ 棉実子葉 CPase⁸⁾ があり, 微生物からの CPase として CPase Y,¹⁶⁾ *Aspergillus acid* CPase¹⁷⁾ がある. これらはいずれも分子量 60000—170000 の範囲にあり, 本研究の CPase S_a, S_b を含め, 動物起源の膵 CPase A, B が比較的小きな分子量 (約 34000) をもつことと著しい対照をみせている.

CPase S_a および S_b はともに広い基質特異性をもち, 中性, 酸性および塩基性アミノ酸のみならずプロリンもペプチド鎖 C 末端から遊離する. これも従来分離された CPase^{4-11,15-17)} に共通する特性で, 膵 CPase A, B の基質特異性に制約がみられる点と大きく異なる.

CPase S_a は S_b に比し酵素活性がかなり低く, また Table II に示すように両酵素の Z-ジペプチドに対する相対活性にも若干の差が認められる. CPase S_b は Z-Pro-Phe を比較的速やかに水解する. また両酵素の水解速度は C 末端のみならず C 末端から 2 番目のアミノ酸残基によっても影響を受ける.

ナツミカンおよびウンシュウミカンからの CPase の最適 pH は 5.5 で, Z-Glu-Phe に対する CPase S_a および S_b の最適 pH もこの値と一致した. また通常植物および動物 CPase はペプチダーゼ活性のほかエステルラーゼ活性を併有しているが, CPase S_a および S_b ともに弱いエステルラーゼ活性をもつことが認められた. CPase S_a は S_b および他の植物 CPase のいずれよりも温度に対し安定性が高い. これは CPase S_a の活性中心およびその周辺の構造の安定性が他の酵素より大きいことによるものであろう. 両者の分子量からみて, CPase S_a が S_b の zymogen である可能性は少ないと考えられる. 界面活性剤あるいはトリプシン処理による CPase S_a の活性化の試みは成功しなかった.

両酵素は EDTA, o-phenanthroline により阻害を受けないので, 膵 CPase A および B と異なり金属酵素ではないと考えられる. また一般に DFP と反応するアミノ酸残基は触媒部位にある活性セリンであるが, 両酵素ともに DFP により阻害を受けることからセリン酵素と推定される. また両酵素は HgCl₂ によっても活性低下をきたす. HgCl₂ と反応するアミノ酸残基の官能基としてはシステインのチオール基, ヒスチジンのイミダゾール基, アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基などが知られているが, 両酵素ともチオール基の化

15) 久保田幸穂, 船越崇行, 下沖 修, 庄司省三, 生化学, **47**, 1115 (1975).

16) R. Hayashi, S. Moore, W.H. Stein, *J. Biol. Chem.*, **248**, 2296 (1973); *idem, ibid.*, **248**, 8366 (1973).

17) E. Ichishima, *Biochem. Biophys. Acta*, **258**, 274 (1972).

学修飾剤, PCMB, NEM により阻害されないので, チオール基が酵素活性に直接関与する可能性は少なく, 本研究の結果から HgCl_2 と反応するアミノ酸残基を決定することはできない. また両酵素ともカルボキシル基の修飾試薬 Woodward's reagent K によって著しい影響を受けなかった. CPase S_a は S_b に比較して DFP, HgCl_2 による阻害効果が小さい. これは活性中心のアミノ酸残基がペプチド鎖中に埋没しているか, あるいはマスクされているなどの立体的障害のために反応性が低下していることに起因すると推定される. DFP と同じく活性セリンを修飾する PMSF によって CPase S_a が S_b ほど阻害を受けないのも, 同じ原因によると考えられる. 他の植物 CPase はこれらの修飾剤によりほとんど完全に失活するので, CPase S_a は他の酵素とは若干異なる活性中心周辺の構造をもつと考えられる. CPase S_a , S_b は発芽に際しての貯蔵タンパクの加水分解に関与すると考えられるが, 酵素活性や安定性を異にする両酵素がどのような役割を分担しているのかは現在まだ明らかでない.

CPase S_a は高分子基質に対する活性が低い. これも上に記したような活性中心の特異的な構造によると考えられる. 両酵素は従来の脛 CPase A および B 活性を併有し, C 末端アミノ酸残基の種類にかかわらず Z-ジペプチドを加水分解することができる. また比較的活性の高い CPase S_b は高分子基質の C 末端から段階的にアミノ酸を遊離することが認められ, かつエンドペプチダーゼ活性を示さないので, ペプチドあるいはタンパク質の C 末端アミノ酸分析に応用しうるものと考えられる.