

# テラピア腸管アミノペプチダーゼの精製ならびに性状 —テラピアの消化酵素に関する研究-IX—

谷口(山田)亜樹子,<sup>1\*</sup> 高野 克己<sup>2</sup>

(2001年6月27日受付, 2001年12月3日受理)

<sup>1</sup>東京農業大学短期大学部醸造学科, <sup>2</sup>東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

## Purification and properties of aminopeptidase from *Tilapia* intestine —Digestive enzyme of *Tilapia*-IX—

AKIKO YAMADA TANIGUCHI<sup>1\*</sup> AND KATSUMI TAKANO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Brewing and Fermentation, Junior College of Tokyo University of Agriculture, Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo 156-8502, <sup>2</sup>Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo 156-8502, Japan

Aminopeptidases of the intestine of *Tilapia nilotica* were purified by ammonium sulfate precipitation, followed by trypsin inhibitor-Sepharose4B affinity chromatography, DEAE-cellulose ion-exchange chromatography and polyexchanger PBE 94 chromatofocusing.

Two different Aminopeptidases were obtained in the pure state and tentatively designated aminopeptidase I and II. Each of the two aminopeptidases was found to be a single band when examined by native polyacrylamide gel electrophoresis. The purifications of aminopeptidase I and II were 63- and 79-fold from the crude extract, respectively.

Aminopeptidase I and II had molecular weight of 240,000 and 300,000, respectively. Aminopeptidase I showed the highest activity at pH 7.0 and 45°C. Aminopeptidase II showed the highest activity at pH 6.5 and 50°C. Aminopeptidase I specifically was found to be able to hydrolyze Ala-pNA, while II was found to be able to hydrolyze Leu-pNA.

Two enzymes were strongly inhibited by DFP, TPCK, EDTA and *o*-phenanthroline. The activities of two enzymes inactivated by EDTA were regenerated by the addition of Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>.

キーワード：テラピア, 腸管, 消化酵素, アミノペプチダーゼ, 酵素の精製・性状

著者らは、養殖飼料の開発に必要な基礎的知見を得るため、テラピア *Tilapia nilotica* の消化管より各種消化酵素<sup>1-8)</sup>を単離し、それらの性状について検討を行っている。タンパク質分解酵素についてはすでに胃からペプシン様,<sup>2)</sup> 腸管からトリプシン様およびキモトリプシン様プロテアーゼ,<sup>6)</sup> さらに前報<sup>8)</sup>では腸管から3種のカルボキシペプチダーゼをそれぞれ分離、精製し、その性状について報告した。

本研究では、テラピア腸管中からアミノ酸生成に関与する酵素として、前報<sup>8)</sup>のカルボキシペプチダーゼ以外にアミノペプチダーゼ活性を検出したので、そのアミノペプチダーゼを分離、精製し、性状について検討を行う

ことを目的とした。

### 実験方法

**試料** 体長約30 cm, 体重約1 kgのテラピアから腸管を採取し、腸管の内容物を生理食塩水にて十分に除去した後、-80°Cに凍結保存し適宜実験に供した。

**粗酵素の調製** 試料20 gに冷アセトン(-20°C)を加え、ホモジナイズ(ワーリングブレンダー, 5,000 rpm, 5分間)し、ろ紙にて吸引、濾過して脱脂処理しアセトンパウダー1 gを調製した。これに0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0) 100 mLを加えホモジナイズ(ヒスコトロン, 5,000 rpm, 5分間)し、4°Cで3時間撹拌抽出

\* Tel : 81-3-5477-2392. Fax : 81-3-5477-2623. Email : akiko@nodai.ac.jp

後、遠心分離 ( $10,000 \times g$ , 15 分間,  $4^\circ\text{C}$ ) し、上澄液を抽出液とした。この抽出液を硫酸塩析 (0.5 飽和) して沈殿画分を分取し、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて溶解、透析し粗酵素液とした。

**酵素活性の測定** 基質には L-ロイシン *p*-ニトロアニリド (Leu-*p*NA) を用いた。10 mM Leu-*p*NA 溶液 (0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.0 に溶解) 0.5 mL に酵素液 0.5 mL を加え、 $40^\circ\text{C}$  にて 10 分間反応を行った後、30 % 酢酸溶液 1.0 mL 加え、410 nm の吸光度を測定した。なお、酵素活性は  $40^\circ\text{C}$ , 1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  の *p*-ニトロアニリンを遊離する力価を 1 単位とした。

**タンパク質の定量** タンパク質の定量は、Lowry 法の改良法<sup>9)</sup>にて行った。

**トリプシンインヒビター・セファロース 4B アフィニティークロマトグラフィー** 前報<sup>2)</sup>と同様に、臭化シアニン活性化セファロース 4B (ファルマシア社製) にトリプシンインヒビター (大豆由来, シグマ社製) をカップリングさせ、常法<sup>10)</sup>にてゲルを調製した。その調製したゲルを 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて平衡化させた後、カラム ( $1.5 \times 14 \text{ cm}$ ) に充填し、これに粗酵素液を添加した。溶出は、前述の緩衝液 (pH 7.0) 150 mL および 0.01 M 塩酸溶液 150 mL にて行い、溶出液は 5 mL ずつ分取し、280 nm におけるタンパク質の紫外外部吸収およびアミノペプチダーゼ活性を測定した。

**DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー** 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した DEAE-セルロースカラム ( $1.5 \times 18 \text{ cm}$ ) にアフィニティークロマトグラフィーにより得られた活性画分を前述の緩衝液にて透析後添加し、同緩衝液 100 mL を流下した後、0.1, 0.2 および 0.3 M 塩化ナトリウムを含む同緩衝液を各 100 mL 用いて溶出した。

**クロマトフォーカシング** ポリバッファー交換体 (PBE94, ファルマシア社製) を 25 mM イミダゾール-酢酸緩衝液 (pH 6.5) で緩衝化した後、カラム ( $1.2 \times 18 \text{ cm}$ ) に充填した。溶出はポリバッファー 74-塩酸溶液 (pH 4.0) 180 mL で行った。

**純度検定** ディスク電気泳動法<sup>11)</sup>により純度検定を行った。

**分子量の測定** 前報<sup>8)</sup>と同様にゲルろ過法<sup>12)</sup>および SDS-PAGE<sup>13)</sup>により測定した。なお、ゲルろ過法は 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したセファデックス G-200 カラム ( $1.5 \times 90 \text{ cm}$ ) に酵素液、分子量既知の標準タンパク質を添加し、同緩衝液にて溶出後、標準タンパク質との溶出位置の比較にて分子量を推定した。SDS-PAGE は試料 (0.1 mg) を SDS 処理した後、分離用ゲル (10% ポリアクリルアミド, pH 8.3) に添加し、一定電流 (8 mA/tube) にて泳動を行った。

**等電点の測定** 前報<sup>8)</sup>と同様に電気泳動装置 (ロトフ

ォア, 日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社製, pH 3-10) を使用して、等電点電気泳動 ( $4^\circ\text{C}$ , 300 V, 4 時間) を行った。

## 結果および考察

### 酵素の精製

粗酵素をトリプシンインヒビター・セファロース 4B カラムに供した結果、Fig. 1 に示したように、アミノペプチダーゼ活性は未吸着画分に溶出した。トリプシン様プロテアーゼは吸着画分に溶出される<sup>6)</sup>ことから、この操作によりアミノペプチダーゼとトリプシン様プロテアーゼを分離できた。

次にこの画分について、DEAE-セルロースクロマトグラフィーにて精製した結果、Fig. 2 に示したように、活性は主に 0.1 M および 0.2 M 塩化ナトリウム溶液画分の 2 画分に溶出された。各々の活性比率は 2:3 であり、各画分を I および II 画分とした。両画分を脱塩後、クロマトフォーカシングにて精製したところ、Fig. 3 に示したように、I および II 画分よりそれぞれ pH 5.9 および pH 5.7 付近に各々 1 つの活性画分が得られた。この 2 画分についてディスク電気泳動法による純度検定の結果、それぞれ単一なタンパク質バンドを示し高度に精製されていることが認められ、それぞれをアミノペプチダーゼ I および II とした (Fig. 4)。

以上のアミノペプチダーゼの精製結果を Table 1 に示した。アミノペプチダーゼ I および II は、抽出液に比べ活性は各々 69.5 倍および 67.1 倍に上昇し、活性回収

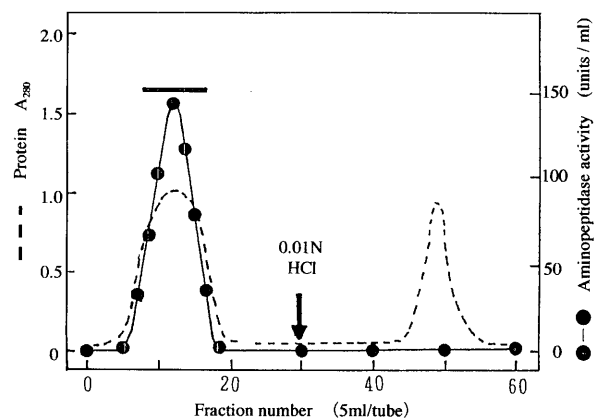


Fig. 1. Affinity chromatography of aminopeptidase from *Tilapia* intestine on a Trypsin inhibitor-Sepharose 4B column. Crude enzyme, after  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation, was applied on a Trypsin inhibitor-Sepharose 4B column ( $1.5 \times 14 \text{ cm}$ ) equilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 7.0). The enzyme was eluted with 20 mM phosphate buffer (pH 7.0). ---, protein (absorbance at 280 nm); —●—, aminopeptidase activity; —, pooled fraction.

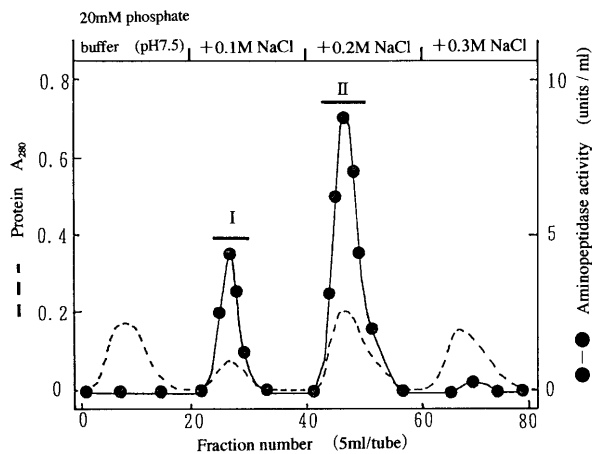


Fig. 2. Ion-exchange chromatography of aminopeptidase from *Tilapia* intestine on DEAE-cellulose column. The active fraction of trypsin inhibitor-Sepharose 4B column was applied on a DEAE-cellulose column (1.5 × 18 cm) equilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 7.5). The enzyme was eluted stepwisely with 400 mL of 0 to 0.3 M NaCl in the same buffer. ---, protein (absorbance at 280 nm); ●—, aminopeptidase activity; —, pooled fraction.

率はアミノペプチダーゼ I が 11%, II は 21% であった。

#### 精製酵素の性状

1. pH McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0–7.5), トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5–8.5) およびホウ酸緩衝液 (pH 8.5–10.5) の各緩衝液を用い, 最適 pH および pH 安定性を測定した (Fig. 5)。

アミノペプチダーゼ I および II の最適 pH は各々 pH 7.0 および pH 6.5 であった。イワシ内臓 (pH 7.0–7.5),<sup>14)</sup> ブタ小腸 (pH 7.0, pH 8.0),<sup>15)</sup> ウサギ腸管 (pH 7.0, pH 7.5),<sup>15)</sup> ヒト小腸 (pH 7.0),<sup>16)</sup> ラット小腸 (pH 8.0),<sup>17)</sup> 南極オキアミ (pH 8.4)<sup>18)</sup> の各アミノペプチダーゼの最適 pH は中性またはアルカリ性であるのに対し, 本酵素は中性またはやや酸性側であった。両酵素は pH 5.0 でも最大活性の約 60% を示したが, pH 9.0 では 40–30% と低かった。

また, 両酵素液を各 pH にて処理 (40°C, 30 分間) し, pH 安定性を調べたところ, アミノペプチダーゼ I は pH 6.5–9.0, アミノペプチダーゼ II は pH 6.5–8.5 で安定であった。アミノペプチダーゼ I は pH 10.5 における残存活性が約 70% を示し, アミノペプチダーゼ II に比べアルカリ性域での安定性が高く, 酸性域ではアミノペプチダーゼ II に比べやや安定性が低かった。両アミノペプチダーゼは南極オキアミ (pH 6–9.4),<sup>18)</sup> コイ筋肉 (pH 6.5–8.0)<sup>19)</sup> のアミノペプチダーゼと同様な pH 安定性を示したが, イワシ内臓アミノペプチダーゼ (pH 4.0–9.0)<sup>14)</sup> に比べその安定域はやや小さかった。

2. 温度 各温度における活性 (I : pH 7.0, II :

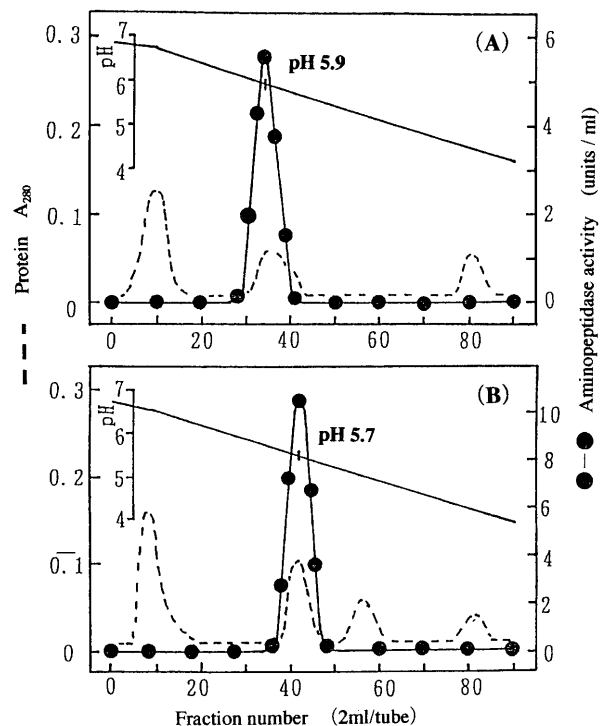


Fig. 3. Chromatofocusing of aminopeptidases from *Tilapia* intestine. The desalted enzymes of DEAE-cellulose active fraction (I and II) were applied on a poly-exchanger column (PBE94, 1.2 × 18 cm) equilibrated with 25 mM imidazole-acetic acid buffer (pH 6.5), and then the enzymes were eluted with polybuffer 74-HCl (pH 4.0), respectively. (A), active fraction I of DEAE-cellulose column; (B), active fraction II of DEAE-cellulose column. ---, protein (absorbance at 280 nm); ●—, aminopeptidase activity; —, pH.

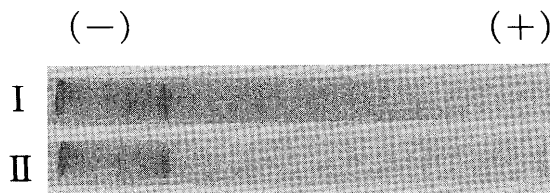


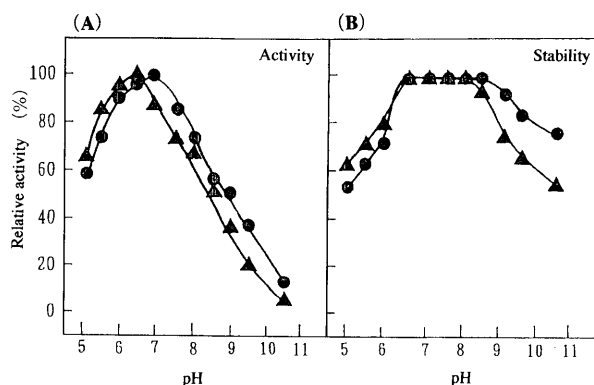
Fig. 4. Disc-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified aminopeptidases from *Tilapia* intestine. The purified enzymes I and II (0.1 mg) were applied to 10 % polyacrylamide gel (pH 8.3). The gel was stained for protein with Coomassie brilliant blue R-250.

pH 6.5) および各温度で 1 時間処理後の残存活性を測定 (I : pH 7.0, 40°C; II : pH 6.5, 40°C) し, 最適温度および温度安定性を求めた (Fig. 6)。アミノペプチダーゼ I および II の最適温度はそれぞれ 45°C および 50°C で, ブタ小腸 (40°C, 50°C)<sup>15)</sup> アミノペプチダーゼとほぼ同様であった。また, アミノペプチダーゼ I および II の活性はそれぞれ 45°C および 50°C 以下で安定であ

**Table 1.** Summary of purification process of aminopeptidases of *Tilapia* intestine

| Stage                                                           | Total protein (mg) | Total activity (units) | Specific activity (units/mg) | Purification (fold) | Yield (%) |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------|------------------------|------------------------------|---------------------|-----------|
| Crude extract <sup>*1</sup>                                     | 314.7              | 4872                   | 15.5                         | 1.0                 | 100       |
| 50% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitate | 110.2              | 3984                   | 36.2                         | 2.3                 | 82        |
| Trypsin inhibitor-sepharose 4B                                  | 82.4               | 3620                   | 43.9                         | 2.8                 | 74        |
| Aminopeptidase I                                                |                    |                        |                              |                     |           |
| DEAE-cellulose                                                  | 1.5                | 799                    | 532.6                        | 34.5                | 16        |
| Chromatofocusing                                                | 0.5                | 539                    | 1078.0                       | 69.5                | 11        |
| Aminopeptidase II                                               |                    |                        |                              |                     |           |
| DEAE-cellulose                                                  | 3.6                | 1541                   | 428.1                        | 27.6                | 32        |
| Chromatofocusing                                                | 1.0                | 1040                   | 1040.0                       | 67.1                | 21        |

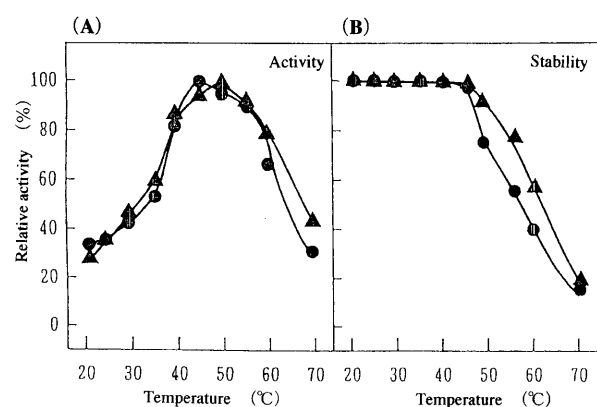
<sup>\*1</sup> Acetone-powder of tilapia intestine (20 g) was used.



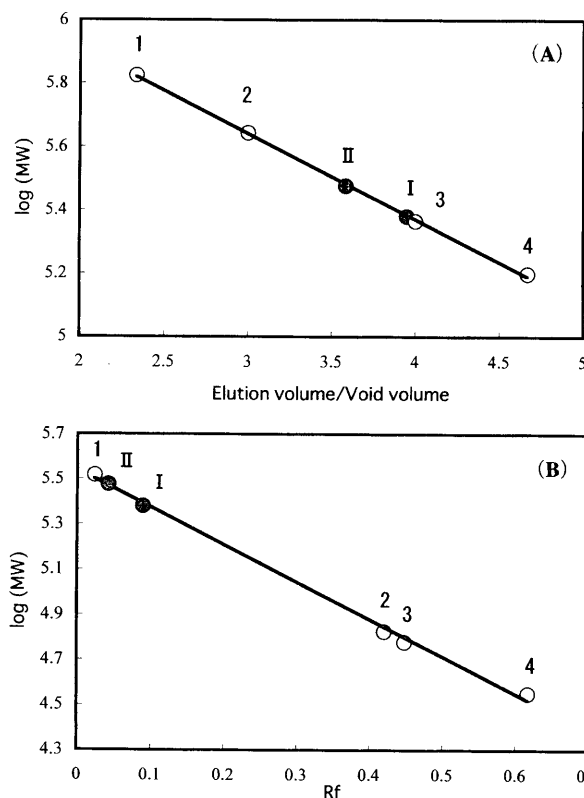
**Fig. 5.** Effects of pH on the activity and stability of the purified aminopeptidases from *Tilapia* intestine. Buffers used were 0.1 M McIlvaine buffer (pH 5.0–7.5), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5–8.5) and 0.1 M borate buffer (pH 8.5–10.5). (A), Optimum activity: the reaction was carried out for 10 min with pH alteration (at 40°C). (B), Stability against pH: the enzyme was preincubated at various pH at 40°C for 30 min and the remaining activity was determined (at 40°C for 10 min). ●, aminopeptidase I; ▲, aminopeptidase II.

り、60°CではアミノペプチダーゼIは40%、アミノペプチダーゼIIは50%の活性が残存し、70°Cでは両酵素の残存活性は約20%であった。

3. 分子量および等電点 セファデックス G-200 によるゲル濾過法および SDS-PAGE にて、分子量の測定を行った (Fig. 7)。アミノペプチダーゼ I は約 240,000、アミノペプチダーゼ II は約 300,000 と推定され、アミノペプチダーゼ I はブタ小腸アミノペプチダーゼ (245,000)<sup>15)</sup> と同程度の分子量であり、II はイワシ内蔵アミノペプチダーゼ (370,000, 320,000)<sup>14)</sup> よりやや小さかった。アミノペプチダーゼ I および II ともにゲル濾過と SDS-PAGE の測定値が一致したことから、一本鎖のポリペプチドと考えられる。アミノペプチダーゼは2量体または4量体が多いが、魚類の消化管からのアミノペプチダーゼについては今まで報告がみられず、単量体であることは本酵素の特性と考えられる。この点



**Fig. 6.** Effects of temperature on the activity and stability of the purified aminopeptidases from *Tilapia* intestine. (A), Optimum activity: the reaction was carried out for 10 min with temperature alteration (at I, pH 7.0; II, pH 6.5). (B), Stability against temperature: the enzyme was preincubated at various temperatures at pH 7.0 or pH 6.5 for 30 min and the remaining activity was determined (at 40°C for 10 min). ●, aminopeptidase I; ▲, aminopeptidase II.



**Fig. 7.** Estimation of molecular weight of the purified aminopeptidases from *Tilapia* intestine. (A), Gel filtration with a Sephadex G-200 column (1.5×90 cm) equilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 7.0). 1, thyroglobulin; 2, ferritin; 3, catalase; 4, aldolase. (B), SDS-PAGE. 8% gel; 1, thyroglobulin; 2, bovine serum albumin; 3, catalase; 4, lactate dehydrogenase; I, aminopeptidase I; II, aminopeptidase II.

**Table 2.** Effect of various reagents on the activity of aminopeptidases of *Tilapia* intestine

| Reagent (1 mM)           | Relative activity (%) |     |
|--------------------------|-----------------------|-----|
|                          | I                     | II  |
| None                     | 100                   | 100 |
| DFP*1                    | 8                     | 2   |
| TPCK*2                   | 15                    | 18  |
| <i>o</i> -Phenanthroline | 22                    | 0   |
| EDTA*3                   | 44                    | 26  |
| PCMB*4                   | 55                    | 55  |
| L-Cysteine               | 43                    | 50  |
| 2-Mercaptoethanol        | 74                    | 49  |
| TLCK*5                   | 71                    | 76  |
| EPNP*6                   | 60                    | 80  |
| CH <sub>2</sub> ICOOH    | 89                    | 93  |
| STI*7 (100 µg/mL)        | 97                    | 98  |
| COM*8 (100 µg/mL)        | 96                    | 98  |

The enzyme was preincubated with 1 mM of various reagents at 40 °C for 30 min, and the remaining activity was determined.

\*1 DFP: diisopropyl fluorophosphate

\*2 TPCK: *N*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl keton.

\*3 EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

\*4 PCMB: *p*-chloromercuribenzoic acid.

\*5 TLCK: *N*-tosyl-L-lysine chloromethyl keton.

\*6 EPNP: 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy) propane.

\*7 soybean trypsin inhibitor.

\*8 chicken ovomucoid.

については他の魚類についても今後研究を進める予定である。

等電点は、アミノペプチダーゼ I が *p*I5.7, II が *p*I5.5 であり、イワシ内蔵アミノペプチダーゼ (*p*I4.1, *p*I4.8)<sup>14)</sup> に比べアルカリ側であった。

4. 各種試薬の影響 酵素液に各種試薬を 1 mM になるように加え、40°C, 30 分間処理した後、残存活性を測定した。活性は試薬無添加の活性値を 100% とし、相対活性で示した (Table 2)。両アミノペプチダーゼとも *o*-フェナントロリンおよび EDTA によって残存活性が大きく低下し、他のアミノペプチダーゼと同様に金属酵素の性質を示した。アミノペプチダーゼ I および II は DFP により著しく阻害され、また、PCMB, L-システインによっても阻害されたことから、活性の発現にセリンならびにシステイン残基が関与していることが推察された。また、両酵素ともコイ筋肉<sup>20)</sup>およびボラ卵巣<sup>21)</sup>のアミノペプチダーゼと同様に TPCK によって阻害され、このことから本アミノペプチダーゼは、活性発現にヒスチジン残基も関与していると考えられた。また、2-メルカプトエタノールにより活性が約 70~50% 阻害され、ジスルフィド結合が活性発現に必要な構造の維持に関与することが示唆された。

アミノペプチダーゼ I および II は、EDTA, *o*-フェナ

**Table 3.** Effect of chelating agents on aminopeptidase activity of *Tilapia* intestine

| Reagent                  | conc. (mM) | Relative activity (%) |     |
|--------------------------|------------|-----------------------|-----|
|                          |            | I                     | II  |
| None                     |            | 100                   | 100 |
| EDTA                     | 1.0        | 44                    | 26  |
|                          | 1.5        | 16                    | 0   |
|                          | 2.0        | 0                     | 0   |
| <i>o</i> -Phenanthroline | 0.2        | 78                    | 14  |
|                          | 0.5        | 52                    | 0   |
|                          | 1.0        | 22                    | 0   |
|                          | 2.0        | 0                     | 0   |

The enzyme was preincubated with some concentration of EDTA and *o*-phenanthroline at 40°C for 30 min, and the remaining activity was determined.

ントロリンによる阻害の程度に差異がみられた。そこで両酵素を EDTA (1~2 mM) および *o*-フェナントロリン (0.2~2 mM) にて、40°C, 30 分間処理し、残存活性を測定した (Table 3)。その結果は EDTA, *o*-フェナントロリン無添加の活性値を 100 とし、相対活性で示した。EDTA によってアミノペプチダーゼ I は 2.0 mM で、アミノペプチダーゼ II は 1.5 mM で完全に阻害された。また、*o*-フェナントロリンではアミノペプチダーゼ I は 2.0 mM で、アミノペプチダーゼ II は 0.5 mM で完全に阻害された。アミノペプチダーゼ II は I に比べ両キレート剤の影響を受けやすかった。このことから、アミノペプチダーゼ II は I に比べ活性中心の金属とポリペプチド鎖の結合力が小さいものと推察される。なお、DFP, PCMB および EPNP によって、両アミノペプチダーゼの活性が阻害されたことから、セリン、システインおよびアスパラギン酸残基が、活性中心の金属とのキレート結合に関与しているものと考えられた。

5. 活性の賦活状態 Table 3 の結果を基にして、アミノペプチダーゼ I および II に EDTA を 2.0 mM および 1.5 mM となるように添加し失活させた後、各種金属を添加し活性回復に対する影響を調べた。EDTA 無添加の活性値を 100 とし、相対活性で示した (Table 4)。

両酵素とも活性は Zn<sup>2+</sup> によって 84~61%, Co<sup>2+</sup> では 79~50%, Mg<sup>2+</sup> では 60~52%, Cu<sup>2+</sup> では 44~20% 回復した。エゾバフンウニ<sup>22)</sup>のアミノペプチダーゼは Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> で、南極オキアミ<sup>18)</sup>、コイ筋肉<sup>20)</sup>およびイワシ内蔵<sup>14)</sup>のアミノペプチダーゼは Co<sup>2+</sup> で活性が回復され、本酵素と同様であった。なお、ラット小腸<sup>17)</sup>アミノペプチダーゼの活性中心は Zn<sup>2+</sup> であり、本アミノペプチダーゼも活性の回復状態から前報のカルボキシペプチダーゼと同様、活性中心には Zn<sup>2+</sup> をもつ可能性が考えられた。

**Table 4.** Activity restoration from inactivated aminopeptidases with EDTA by the addition of metal ions

| Reagent            | Relative activity (%) <sup>*2</sup> |     |
|--------------------|-------------------------------------|-----|
|                    | I                                   | II  |
| None               | 100                                 | 100 |
| EDTA <sup>*1</sup> | 0                                   | 0   |
| Zn <sup>2+</sup>   | 84                                  | 61  |
| Co <sup>2+</sup>   | 79                                  | 50  |
| Mg <sup>2+</sup>   | 60                                  | 52  |
| Cu <sup>2+</sup>   | 44                                  | 20  |
| Ca <sup>2+</sup>   | 33                                  | 0   |
| Ni <sup>2+</sup>   | 15                                  | 0   |
| Fe <sup>2+</sup>   | 0                                   | 0   |
| Cd <sup>2+</sup>   | 0                                   | 0   |
| Pb <sup>2+</sup>   | 0                                   | 0   |

<sup>\*1</sup> The concentration of EDTA was 2.0 mM of and 1.5 mM for II.

<sup>\*2</sup> The EDTA-treated enzyme was preincubated with 1 mM of various metal reagents at 40°C for 60 min, and the remaining activity was determined.

**Table 5.**  $K_m$  value and  $V_{max}/K_m$  of aminopeptidase activity of *Tilapia* intestine for some substrates

| Substrate           | $K_m$ (mM) |     | $V_{max}/K_m$ |       |
|---------------------|------------|-----|---------------|-------|
|                     | I          | II  | I             | II    |
| Leu- <i>p</i> NA    | 0.2        | 0.2 | 65.0          | 105.0 |
| Ala- <i>p</i> NA    | 0.1        | 0.2 | 190.0         | 95.5  |
| Arg- <i>p</i> NA    | 0.3        | 0.5 | 27.5          | 8.8   |
| Lys- <i>p</i> NA    | 0.4        | 0.9 | 11.7          | 2.3   |
| Gly- <i>p</i> NA    | 0.5        | 0.9 | 4.4           | 2.7   |
| Phe- <i>p</i> NA    | 1.4        | 1.2 | 1.5           | 1.8   |
| Pro- <i>p</i> NA    | 1.6        | 1.6 | 0.7           | 0.8   |
| Val- <i>p</i> NA    | 2.0        | 1.6 | 0.7           | 0.8   |
| Bz-Arg- <i>p</i> NA | —          | —   | —             | —     |
| Bz-Phe- <i>p</i> NA | —          | —   | —             | —     |

The calculation of  $K_m$  value and  $V_{max}/K_m$  was based on the method of Linweaver and Bruk. The reaction was carried out at 40°C for 10 min with various concentrations of substrate. *p*NA: *p*-nitroanilide.

6. 基質特異性 各種基質に対する両酵素の親和性について検討した (Table 5)。アミノペプチダーゼ I は Ala-*p*NA に対する  $K_m$  は 0.1 mM と最も高い親和性を示し、次いで Leu-*p*NA, Arg-*p*NA, Lys-*p*NA の順であった。アミノペプチダーゼ II は Leu-*p*NA, Ala-*p*NA に対し  $K_m$  が 0.2 mM で、他の基質に比べ高い親和性を示した。次に、両ペプチダーゼの各基質分解の  $V_{max}$  を算出し、 $V_{max}/K_m$  で比較検討した。アミノペプチダーゼ I は Ala-*p*NA を最も分解し、Leu-*p*NA に対する  $V_{max}/K_m$  は Ala-*p*NA の約 1/3 であった。アミノペプチダーゼ II は Leu-*p*NA を最も分解したが、Ala-*p*NA に対しても Leu-*p*NA とほぼ同様な  $V_{max}/K_m$  を

示し、アミノペプチダーゼ I および II の両基質に対する作用性に大きな違いがみられた。Arg-, Lys-, Gly-*p*NA に対する  $V_{max}/K_m$  はアミノペプチダーゼ II に比べ I の方が大きく、アミノペプチダーゼ II よりも I の方がこれらの基質に対する分解作用が大きかった。なお、Bz-Arg-*p*NA, Bz-phe-*p*NA では *p*NA の生成がみられなかったもので、両酵素はペプチドのアミノ末端よりアミノ酸残基を 1 残基ずつ遊離するアミノペプチダーゼであることが明らかとなった。

以上のことからテラピア腸管においては腸管プロテアーゼにより生成したタンパク質の分解物に対し、アミノペプチダーゼ I および II は前報<sup>8)</sup>にて報告したカルボキシペプチダーゼ I, II および III と協調的に作用し、ペプチドの低分子化とアミノ酸生成が進行するものと考えられた。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導いただいた東京農業大学名誉教授鴨居郁三先生ならびに試料の採取にご便宜を賜った東京コイクニ株式会社に謝意を表します。

## 文 献

- 1) 山田亜樹子, 高野克己, 鴨居郁三. テラピア胃アミラーゼの精製ならびに性状. 日水誌, 1996; **62**: 269-274.
- 2) 山田亜樹子, 高野克己, 鴨居郁三. テラピア胃プロテアーゼの精製ならびに性状. 日水誌, 1993; **59**: 1903-1908.
- 3) 谷口 (山田) 亜樹子, 高野克己, 鴨居郁三. テラピア胃リパーゼの精製ならびに性状. 日水誌, 2001; **67**: 96-101.
- 4) 山田亜樹子, 高野克己, 鴨居郁三. テラピア腸管アミラーゼの精製ならびに性状について. 日水誌, 1991; **57**: 1903-1909.
- 5) 山田亜樹子, 高野克己, 鴨居郁三. テラピア腸管  $\alpha$ -グルコシダーゼの精製ならびに性状. 日水誌, 1992; **58**: 2189-2195.
- 6) 山田亜樹子, 高野克己, 鴨居郁三. テラピア腸管プロテアーゼの精製ならびに性状について. 日水誌, 1991; **57**: 1551-1557.
- 7) 谷口 (山田) 亜樹子, 高野克己, 鴨居郁三. テラピア腸管リパーゼの精製ならびに性状. 日水誌, 2001; **67**: 78-84.
- 8) 谷口 (山田) 亜樹子, 高野克己. テラピア腸管カルボキシペプチダーゼの精製ならびに性状について. 日水誌, 2001; 印刷中.
- 9) Hatree EF. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 1972; **48**: 422-427.
- 10) 千畑一郎, 土佐哲也, 松尾雄志. 吸着体の調製と性質. 「実験と応用, アフィニティークロマトグラフィー」, 講談社サイエンティフィック, 東京. 1976; 30-109.
- 11) 永井 裕. ディスク電気泳動法. 蛋白質 核酸 酵素, 1966; **11**: 744-749.
- 12) Fischer L. ゲルクロマトグラフィー「生化学実験書 ゲルクロマトグラフィー」(永井 裕, 林 利彦訳), 東京化学同人, 東京. 1974; 59-147.

- 13) 林 健志, 大場義樹: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法. 蛋白質 核酸 酵素, 1972; **17**: 304-311.
- 14) Vo TV, Kusakabe I, Murakami K. Purification and some properties of two aminopeptidases from sardines. *Agric. Biol. Chem.*, 1983; **47**: 2453-2459.
- 15) Feracci H, Benajiba A, Gorvel JP, Doumeng CH, Maroux S. Enzymatic and immunological properties of the pro-tease form of aminopeptidases N and A from pig and rabbit intestinal brush border. *Biochem. Biophys. Acta*, 1981; **658**, 148-157.
- 16) McClellan JB Jr, Garner CW. Purification and properties of human intestine alanine aminopeptidase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1980; **613**, 160-167.
- 17) Young SK, Emmet JB, Nicholson JA. Rat intestinal brush border membrane peptidase. *J. Biol. Chem.*, 1976; **251**, 3206-3212.
- 18) Kimoto K, Murakami K. Purification and characterization of aminopeptidase from *Euphausia superba*. *Agric. Biol. Chem.*, 1984; **48**, 1819-1823.
- 19) 原 研治, 涼松 淳, 湯川幸一, 石原 忠. 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. 日本誌, 1987; **53**: 641-647.
- 20) Hara K, Sakai K, Ishihara T. Purification and some properties of aminopeptidase from Carp *Cyprinus carpio* ordinary muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1988; **54**: 393-396.
- 21) Tze KC, Takashi M, Shoji K. Purification and properties of an aminopeptidase from mullet, *Mugil cephalus*. *Agric. Biol. Chem.*, 1988; **52**: 235-242.
- 22) Toshimasa Y, Hideyoshi Y, Shin-ichi I. Purification and characterization of an aminopeptidase from sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent substrate specificity as a novel feature of the enzyme. *J. Biochem.*, 1990; **107**: 273-279.