

〔原著〕 松本歯学 13: 353~356, 1987

Key words: アミノペプチダーゼ P - 高速液体クロマトグラフィー - Gly-Pro-Hyp

Gly-Pro-Hyp を基質として用いるアミノペプチダーゼ P の 高速液体クロマトグラフィーによる活性測定法

原 田 実

松本歯科大学 口腔生化学教室 (主任 原田 実 教授)

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Aminopeptidase P Activity Using Gly-Pro-Hyp as the Substrate

MINORU HARADA

Department of Oral Biochemistry, Matsumoto Dental College

(Chief: Prof. M. Harada)

Summary

Aminopeptidase P (EC 3. 4. 11. 9) specifically hydrolyses the peptide bond between Xaa and Pro residues of Xaa-Pro-Yaa-peptides (Xaa and Yaa are nonspecific amino acids). A new method for the determination of aminopeptidase P activity using Gly-Pro-Hyp as the substrate was described. Enzymatically formed Pro-Hyp from the substrate in the assay mixture was chromatographically separated by high performance liquid chromatography (HPLC) and determined the absorbance of the peptide at 210 nm. Using this method the activities in rat serum and kidney microsomal fractions were determined.

はじめに

アミノペプチダーゼ P (EC 3.4.11.9) は 1968 年 Yaron と Mlynar¹⁾がはじめて大腸菌から精製した酵素で、下記の反応を触媒する。



(Xaa, Yaa は各種アミノ酸)

哺乳動物では 1970 年 Dehm と Nordwing²⁾がブタ腎臓より精製し、性質を検討した。その後、ブラジキニンのアミノ末端の Arg-Pro の結合を加水分解する代謝酵素の一種として本酵素をヒト肺か

ら精製し、 β -ラクタム型抗生剤の阻害を研究³⁾しているが、本酵素活性が代謝障害時にどんな変動を示すか報告はない。この理由の一つとして活性測定法 (ニンヒドリン発色法) に起因するのではないかと考える。

最近、Holtzman⁴⁾は蛍光基質 Lys(ϵ -Dnp)-Pro-Pro-NH-CH₂-CH₂-NH-2-aminobenzoyl を合成し、ヒト血清、ラット各種臓器の活性値を報告し、測定の簡易化を進めた。

筆者は Fischer F344 ラットがジペプチジルペプチダーゼ IV を欠損している報告⁵⁾に端を発し、Xaa-Pro-Yaa-ペプチドに対し加水分解の作用点を異にするアミノペプチダーゼ P の活性測定を計画した。そこで蛍光基質の入手を試みたが、不

(1987年11月19日受理)

可能であったため、基質 (Gly-Pro-Hyp) ならびに酵素作用の結果生成するペプチド (Pro-Hyp) の分離・定量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で検討した。

実験方法

1) カラムおよび装置

ペプチドの分離には Zorbax ODS (4.6 mm ϕ \times 15 cm) カラムを用いた。HPLC 装置は島津社製本体 LC-4A, 紫外外部吸収検出器 SPD-2AS, カラム恒温槽 CTO-2AS, データー処理用クロマトパック C-R3A を用いた。サンプルインジェクターはレオダイン社製 1725 に 20 μ l のループをつけて使用した。

2) 溶出液と溶離条件

Melander の報告⁶⁾を参照した。また、イオンペーカクロマトグラフィーによる分離効果を調べるため、オクタンスルホン酸ソーダの添加を検討した⁷⁾。その結果、溶出液として 1.0 mM 1-オクタン

スルホン酸ソーダを含む 0.1 M リン酸二水素カリウム, pH2.1 (pH の調整はリン酸) を使用した。ほかの条件は、流速 1.0 ml/min, カラム温度 50°C, ペプチドの検出・定量 210 nm における紫外外部吸収などである。

3) 活性測定用反応液と除タンパク処理

反応系

0.1 M	トリス-塩酸緩衝液, pH8.0	300 μ l
10 mM	Gly-Pro-Hyp	30 μ l
20 mM	MnCl ₂	50 μ l
	酵素液 (ラット腎ミクロソーム画分)	200~500 μ g

純水

総容量	500 μ l
反応温度と時間	37°C, 30分
反応停止	10% HClO ₄ 添加 400 μ l
除タンパク	3,000 rpm, 10分

上清液 10~20 μ l を HPLC で分析した。(但し濁度がある場合は、さらにミリポアフィルターで濾過した)。

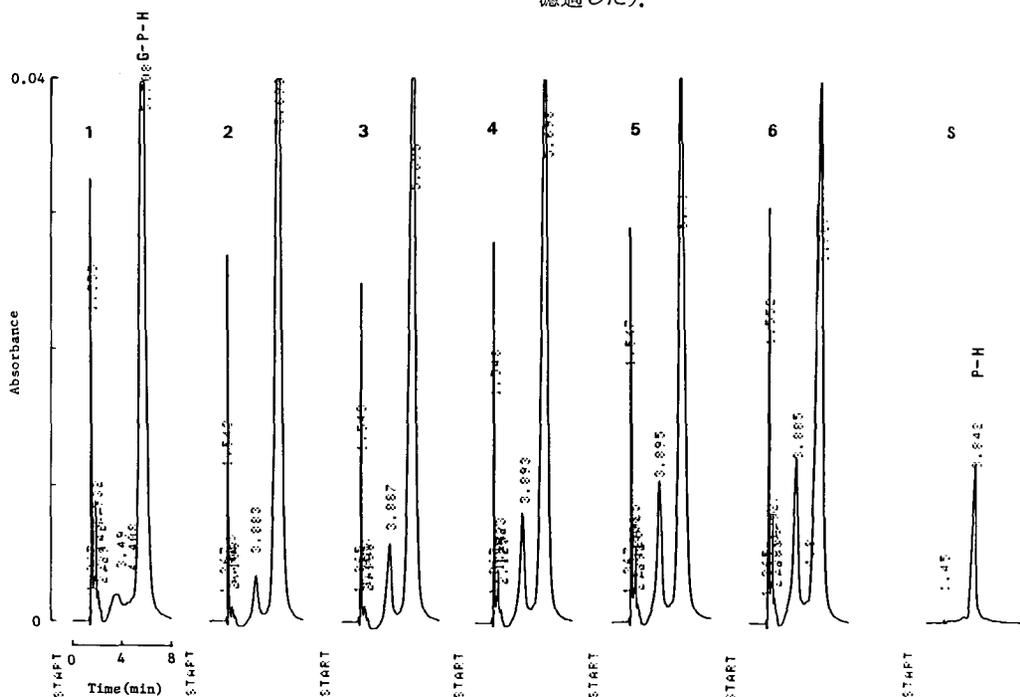


図1：反応上清液のクロマトパターン 番号はラット腎・ミクロソーム画分量の相違 (450 μ g [1 対照として反応後に添加], 90 μ g [2], 180 μ g [3], 270 μ g [4], 300 μ g [5], 450 μ g [6])

G-P-H : Gly-Pro-Hyp, 3.3 nmol 相当量。

P-H : 標準 Pro-Hyp, 1.0 nmol 相当量。

結果および考察

1) HPLCによる基質(Gly-Pro-Hyp)と生成物(Pro-Hyp)の分離ならびに定量性

酵素反応液の除タンパク上清画分についてのクロマトパターンを図1に示した。Gly-Pro-HypならびにPro-Hypの溶出時間はそれぞれ、5.7と3.8分で分離は良好であった。標準品のPro-Hyp(1.0 nmol/10 μ l)と溶出時間は一致した。溶出パターンの面積値をペプチド濃度にそれぞれ換算し、ラット・ミクロソーム画分のタンパク量当たりの分析値を求めた結果(図2)、両者は化学量論的に一致し、さらにタンパク濃度との比例性が証明できた。すなわち、Gly-Pro-HypはジペプチジルペプチダーゼIVの基質とはなり得ないため^{8,9)}、Gly-Proは生成せず、さらに測定条件下では、生成したPro-Hypはプロリナーゼ、あるいはジペプチダーゼによる加水分解を受けていない。ラットの腎・ミクロソーム画分について分析したアミノペプチターゼP活性を表1に示した。

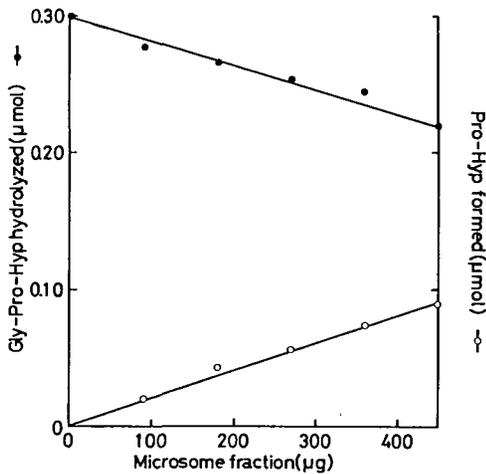


図2：アミノペプチターゼP活性とミクロソーム画分量の関係(反応液総量に換算)

蛍光基質を用いた Holtzman ら⁴⁾の腎臓の値は 4.6 nmol/10 min/mg と算出されている。

2) ラット血清中の活性測定

血清中の活性値はかなり低いため、反応系に100 μ lの血清を添加して、定量可能なピーク(吸光度0.04で測定)が検出できる程度であった。このため、血清をコロジオンバック(Schleicher & Schiill, Cut off 75,000)で濃縮し(定量的に2倍)、50と100 μ lを使用し定量を行なった(表1)。Holtzman ら⁴⁾が蛍光基質を使って求めた結果(0.3 nmol/10 min/mg)と比較するため、タンパク量当たりの比活性値を算出したところ、結果(0.099 nmol/min/mg)は約3倍高かった。感度の点では蛍光基質ははるかに優れ、10 μ lで活性測定が可能であると報告している。蛍光基質が入手可能ならば、活性測定はより容易となるため、本法の利用価値は低くならざるを得ない。しかし、コラーゲン由来のペプチド、生理活性ペプチドなどで、アミノ末端から2番目にプロリンを含有する天然ペプチドの生体内における分解過程を検索するためには有用な方法と考える。

3) 定量限界

吸光度が0.02の条件で50~100 pmol/10 μ lのペプチド定量が可能である。

おわりに

アミノペプチターゼPの活性測定法は poly-L-Pro, poly-(Gly-Pro-Pro), Gly-Pro-Hypなどを基質とし、酵素反応により生成するアミノ末端アミノ酸をニンヒドリンで発色させて行なっている。この場合、酵素試料として生体材料を使用すると、遊離アミノ酸を除く前処理が必要になる。本法ではその煩雑さが省ける。さらに、プロリンを含有するジペプチドを加水分解するプロリダーゼ、プロリナーゼの活性測定への応用も可能であるため、ペプチドの加水分解プロセスを検索する

表1：ラット(フィッシャー-CRJ:CD)中のアミノペプチターゼP活性値

	血清 (nmol/min/ml)	腎ミクロソーム画分 (nmol/min/mg)
	5.9±0.8	0.099±0.019
		11.9±1.7

(値は4検体の平均値±S.D.)

のに役立つ。

分離溶媒に関し貴重なご意見をいただいた島津製作所・東京分析センターの柳沢正幸氏に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Yaron, A. and Mlynar, D. (1968) Aminopeptidase-P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**: 658—663.
- 2) Dehm, P. and Nordwig, A. (1970) The cleavage of prolyl peptides by kidney peptidases. Partial purification of a "X-prolyl-aminopeptidase" from swine kidney microsomes. *Eur. J. Biochem.* **17**: 364—371.
- 3) Sidrowiz, W., Szechiński, J., Canizaro, P. C. and Béhal, F. (1984) Cleavage of the ARG¹-PRO² bond of bradykinin by a human lung peptidase: Isolation, characterization, and inhibition by several β -lactam antibiotics. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **175**: 503—509.
- 4) Holtzman, E. J., Rosenthal, T. and Yaron, A. Pillay, G., (1987) Aminopeptidase P activity in rat organs and human serum. *Anal. Biochem.* **162**: 476—484.
- 5) Watanabe, Y., Kojima, T. and Fujimoto, Y. (1987) Deficiency of membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase IV in a certain rat strain. *Experientia*, **43**: 400—401.
- 6) Melander, W. R., Jacobson, J. and Horvath, C. (1982) Effect of molecular structure and conformational change of proline-containing dipeptides in reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr.* **234**: 269—276.
- 7) Hancock, W. S., Bishop, C. A., Mayer, L. J. and Harding, D. R. K. (1978) High-pressure liquid chromatography of peptides and proteins. XI. The use of cationic reagents for the analysis of peptides by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **161**: 291—298.
- 8) Oya, H., Harada, M. and Nagatsu, T. (1974) Peptidase activity of glycylprolyl β -naphthylamidase from human submaxillary gland. *Arch oral Biol.* **19**: 489—491.
- 9) Kenny, A. J., Booth, A. G., George, S. G., Ingram, J., Kershaw, D., Wood, E. J. and Young, A. R. (1976) Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border serine peptidase. *Biochem. J.* **159**: 169—182.