

サバ幽門垂カルボキシペプチダーゼに関する研究

大 城 善 太 郎

Biochemical Studies on Carboxypeptidase Contained in the
Pyloric Coeca of Mackerel, *Scomber Japonicus*

Zentaro OOSHIRO

Abstract

It was, at the outset, demonstrated that the precipitate yielded abundantly on the dialysis of a saline extract of the pyloric coeca of mackerel, *Scomber japonicus*, showed an enzymatic activity which catalyses both the hydrolysis of chloroacetyl-L-tyrosine and the asymmetric hydrolysis of chloroacetyl-DL-phenylalanine. The active enzymatic principle was assumed to be a carboxypeptidase (CPase).

Zone electrophoresis indicated that a major constituent of the precipitate was responsible for the enzyme activity. The active principle was separated through a well arranged employment of the DEAE-cellulose column chromatography, and an ultracentrifugally homogenous CPase was isolated. The chromatogram obtained through this procedure was found to be quite different from that obtained from the bovine pancreatic CPase under the same experimental conditions.

By the purification procedure, the specific activity of the enzyme was increased as much as 4.3 times. A sedimentation constant (s_20) of 3.25×10^{-13} was obtained by the ultracentrifugation. The molecular weight was calculated to be 23,500, which was definitely smaller than that of the bovine pancreatic CPase, 34,000. This fact suggests that these two forms of CPase consist of different types of proteins.

Optimal pH and temperature for the hydrolysis of carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine were found to be 8.0 and 35-40°C respectively. Furthermore, the mackerel pyloric coeca CPase was ascertained to be a type of metal enzyme.

Effects of various metals on the activity of this enzyme were examined. No effect was brought about by calcium and magnesium. The activity was inhibited by manganese and zinc as much as 50 per cent, while it was five times activated by cobalt. On the other hand, the activity was arrested by the chelating agent EDTA. The enzyme inactivated in this way was reactivated by calcium, magnesium and, particularly, by cobalt, but not by zinc. The mackerel pyloric coeca CPase differs also in this respect from the bovine pancreatic CPases, although the substrate specificities of these two enzymes are identical.

Judging from the way of the asymmetric hydrolysis of chloroacetyl-DL-phenylalanine, chloroacetyl-DL-tyrosine, and chloroacetyl-DL-leucine, the pyloric coeca CPases is assumed to be a type of CPase-A, although it apparently differs from the bovine pancreatic CPase-A in the nature of the enzyme protein.

Finally, some physico-chemical properties were investigated on both the intact and the cobalt-treated pyloric coeca CPase. The kinetic constants, such as Michaelis constant K_m , V_{max} , activation energies E_A , and the various velocity constants, were determined in the case of the hydrolysis of carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine, and these kinetic constants of the two types of the enzyme were studied comparatively to elucidate the mechanism of the participation of cobalt ion in the activation of the

enzyme.

The activation energies, k_{-1}/k_1 , and k_2/k_1 decreased by treatment of the enzyme with cobalt ion, together with the corresponding, directly proportional diminution of K_m . Judging from these facts, it is postulated that a close combination of cobalt ion with the active center or the enzyme occurs quite readily to form a favorable structure of the active site and the stable ES-complex.

目 次

第1章 序 論	113
第2章 サバ幽門垂中のカルボキシペプチダーゼ (CPase) の存在確認	115
第1節 酵素濃度の測定法	115
第2節 酵素活性の測定法	115
第3節 小 括	118
第3章 サバ幽門垂 CPase の分離及び精製	118
第1節 酵素の抽出並びに精製	119
第2節 Zone electrophoresis による酵素の精製度の吟味	120
第3節 蛋白質の精製と均一性に関する考察	121
第4節 DEAE-セルローズカラムによるサバ幽門垂 CPase の精製	121
第5節 最強活性区分 (Fraction 1) の再クロマトグラフィー	123
第6節 サバ幽門垂 CPase と牛膵臓 CPase A の比較	123
第7節 小 括	123
第4章 超遠心沈降法によるサバ幽門垂 CPase の均一性の検討並びに分子量の決定	124
第1節 沈降速度法による沈降定数の算出法	124
第2節 沈降平衡法による分子量の算出法	125
第3節 沈降測定結果	125
第4節 小 括	127
第5章 酵素の精製過程における酵素 N 量及び全活性の回収率並びに比活性の変動	127
第6章 サバ幽門垂 CPase の酵素化学的性質	127
第1節 酵素作用の温度依存性	128
第2節 酵素作用の pH 依存性	128
第3節 酵素活性に及ぼす金属イオンの影響	128
第4節 酵素-基質反応系における Co^{++} の関与様式	129
第5節 Co^{++} -CPase 複合体形成に対する温度の影響	131
第6節 Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) 処理による失活と Co^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} 及び Zn^{++} による活性回復	131
第7節 サバ幽門垂 CPase の基質特異性	133
第8節 アミノ酸の光学分割	137
第9節 小 括	138
第7章 サバ幽門垂 CPase の Co イオンによる活性化機構に関する反応速度論的解析	139
第1節 Michaelis 定数 (K_m) の決定法	139
第2節 酵素反応を解析するための酵素と基質の親和性に関する諸定数の算出法	140
第3節 見かけの活性化エネルギーの算出法	141
第4節 反応速度論的解析結果	141
第5節 小括並びに考察	145

第8章 総	括	146
文	献	148

第1章 序 論

水産動物・水産植物を問わず凡そ生物の体内で営まれる生化学的反應はすべて有機触媒である酵素に支配されており、従つて生体内で起る酵素酵素反應こそ生物の生命現象の主体であると言ふことが出来る。然も既に古く、PASTEUR 及び BERNARD によつて指摘されたように生物細胞内で行われる基本的な生化学的反應は高等動物から下等な微生物に至るまで同じ反應であり、同じ酵素によつて触媒されている。然るに一方酵素の接觸作用は同じであつてもその存在する場所によつてその特異性には多少の差違が認められている。これは同一酵素であつてもその生合成の環境の相違によつて酵素蛋白質の活性中心以外の構造に差違があることに起因するものと考えられる。このような見地に立つて水産動物の消化酵素を見るとその研究は極めて興味あるものとなる。即ち水産動物は殆んど全部冷血動物で然も比較的低温な水中に棲息するものであるから、その活動と食餌の消化のために特異性並びに作用力において特殊な酵素が存在しうる可能性がありこの点甚だ興味ある処である。

然るに現在迄試料の入手難・取扱いの不便さ、研究者の少ないこと等のためか他の生物界における酵素の研究に比し未開拓な分野が多い。

水産物中の酵素の性質を知ることは、之等の動物の生理状態を明確ならしめ^{1),2),3),4),5)}、他の生物との関係を知り^{6),7),8),9),10),11)}、水産物の増殖上必要な基礎知見^{12),13),14)}が得られると共に、水産物の加工処理上にも有力な根拠^{15),16),17),18)}が与えられ、更にその活用が考慮¹⁹⁾されると共に酵素化学の進歩にも寄与するものと信ずる。

魚類の酵素は魚種によつてその消化系に違ひがあるため特に消化酵素の種類と作用力には大きな差違が認められる。しかし特別に陸産脊椎動物と異なる点を挙げると、口腔にアミラーゼを含む唾液の分泌が見られないことと胃のないコイ科の魚類はペプシンを分泌しないことであろう。又カツオ・マグロ・サバ・イワシ・ブリ等には幽門垂と言う特殊の器官が胃と腸の間に盲嚢となつて発達してこの部分に強力なトリプシン^{20),21),22),23),24),25),26),27),28),29)}とアミラーゼ^{30),31),32)}が検出されている。

しかし乍ら以上述べて来た水産動物に関する諸研究は何れも純粹分離したものについて行われたものではなく、単にその基質に対する作用や、至適 pH, 至適温度等から推料してトリプシン或いはアミラーゼ等と呼んでいるに過ぎない。従つて個々の実験方法の相違する場合にその結果に差違の生ずることは当然であろうと思われる。

水産学の立場から直接役に立つのはあるいはこのような数多の酵素の混合よりなる系そのものの性質に関する知見であるかも知れないが、これは極めて複雑多岐な結果を示すのでこれのみを安易に求めようとするれば整理不可能な成果の蓄積に終る危険があり従つて水産物の酵素研究の進展は望めないと思ふものである。

魚類酵素の精度に関する研究は甚だ少く、始めて結晶状に分離されたのは NORRIS^{33),34)}による鮭及びマグロの胃のペプシンである。又最近斗ヶ沢ら^{35),36),37)}がマグロの幽門垂からプロテアーゼを結晶状に分離し、斉藤ら³⁸⁾が鯨及びイルカの胃からペプシンを分離することに成功しているに過ぎない。

著者は水産動物中特に酵素学的にも興味のあるサバ幽門垂を研究材料とし、それに含まれるプロテアーゼにつき種々検討してカルボキシペプチダーゼAが存在することを見出し、更にその分離精製を行いつその酵素化学的性質を明らかにした。

カルボキシペプチダーゼ (以下 CPase と略記する) は WALDSCHMIDT-LEITZ ら^{39),40)} によって牛膵臓中に含まれていることが発見され、1937年に ANSON⁴¹⁾ によって初めて結晶状に得られた典型的なエクソペプチダーゼであって、之がカルボキシル基を有するが遊離アミノ基を有しないポリペプチッドに作用してカルボキシル末端アミノ酸を水解遊離させ得ることが認められた。しかして C-末端残基が芳香族アミノ酸である場合に特に作用する特異性をもっている。それ故にこの CPase は N-アシル-DL-アミノ酸就中フェニールアラニン、チロシン、トリプトファン、ロイシン等の光学分割に用いられている⁴²⁾。高度に精製純化された標品は C-末端残基がプロリン、アルギニン^{43),44)}、リジン⁴³⁾の基質に対しては全く作用しないことが明らかにされている。即ち最近 FOLK^{43),45)}は CPase の精製過程における諸区分並に粗結晶中にアルギニン・リジン・オルニチン等の塩基性アミノ酸を C-末端にもつ合成基質に作用する酵素の存在することを発見しその活性が ANSON によって得られた従来の CPase とは全く別種類の酵素であることを指摘してこの酵素を basic-CPase 又は CPase-B と呼び従来の CPase を A として区別するようになった。この CPase-B の発見によって更に特異性の異なった CPase-C, -D, …… の存在が想定されるようになって来た。

TIETZE⁴⁶⁾はこの両 CPase を巧みに利用してリゾチームの Modification を行いその活性と関連づけて興味ある事実を報告している。このような CPase の厳密な特異性は蛋白質又はポリペプチッドの構造決定にも応用⁴⁷⁾されている。

CPase は更に又他の酵素蛋白質の有する生物活性の原因がその蛋白質のいかなる構造に起因しているかと言う究明法にも応用され種々興味ある結果が得られている。即ち酵素分子中の活性中心以外の蛋白部分はその活性発現に果す役割を解明する方法として所謂 Limited Ppoteolysis を行いその際に活性が如何なる影響を受けるかと言う吟味法にも之が利用^{48),49),50)}されている。CPase は当初 Mg^{++} を補欠分子簇とする Metal Peptidase^{51),52)} であると信じられていたが、最近になって VALLEE ら^{53),54)}による精密な燐光分析の測定の結果により酵素蛋白質 1 モル当り Zn 1 モルを含むことが示され、更に VALLEE ら⁵⁵⁾は CPase 中の Zn の役割につき研究を行い Zn が酵素の活性発現に必須なものであることを明らかにした。又 FOLK ら⁵⁶⁾は CPase を Co^{++} と Preincubate して酵素蛋白中の Zn を Co で置換させると活性が 2 倍に増加することを観察している。更に又 COLEMAN ら⁵⁷⁾は各種の金属イオンで酵素を処理して得た Metallo-CPase につき、RUPLEY ら⁵⁸⁾は Metal free-CPase の物理化学的性質について研究している。

著者は上記の如く酵素学的に特徴のある CPase がマサバ幽門垂中に存在することを確認し、之を分離精製し、その基質特異性から之が CPase A であることを明らかにし、更に Co^{++} によりその活性が 5 倍に増加することを FOLK らとは独立に証明⁵⁹⁾した。又クロマトグラフィーにより分離した純品についてその物理化学的な性質を比較生化学的立場から考察した。

本文に入るに先だち、本研究に対し御懇篤なる御指導を賜わった九州大学船津 勝教授に謹んで感謝の意を捧げる。御鞭撻を賜わった九州大学富山哲夫教授並びに大島康義教授に

深甚の謝意を表す。更に本研究の緒を与えていただいた大阪大学赤堀四郎教授に深甚の謝意を表す。又本研究の遂行に御便宜を賜った本学越智通秋教授に感謝の意を表す。

尚研究遂行上種々御助言をいただいた九州大学農学部生物化学教室船津軍喜氏、徳安清親氏並びに山本竜人氏に深謝の意を表す。

更に超遠心沈降測定に際し御援助を賜った大阪大学蛋白質研究所垣内欣二氏に感謝の意を表す。

第2章 サバ幽門垂中の CPase の存在確認

魚類より純粋に分離精製された酵素^{33),34),35),36),37),38)}は極めて少ない。

著者は水産物利用の基礎的研究の一環として、サバ・マグロ・カツオの幽門垂よりプロテアーゼを抽出しその酵素化学的性質を明らかにしようとして酵素の分画精製を行なった際に CPase に類似の酵素の存在することを見出した。即ちマサバ幽門垂に2倍容の10%食塩水を加えてホモジナイズし、之を遠心分離して得た上澄液につき硫酸分画を行い0.35~0.75 飽和で沈殿する区分をとり之に少量の水を加えて溶解し流水透析を行うと透析の進行と共に多量の沈殿を生じ、この沈殿蛋白質が5%食塩水に極めて容易に溶解することに注目し、そのプロテアーゼ活性を諸種の合成基質を用いて検討した。その結果この蛋白質は Chloroacetyl-L-tyrosine に作用してそれと等モルの L-チロシンを遊離させ、更に Chloroacetyl-DL-phenylalanine を不斉加水分解することを見出した。更にこの蛋白質は後述するごとく Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine に作用して迅速に L-フェニールアラニンを遊離させるが、Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanineamide に対しては殆んど全く作用しないことを認め、又 Carbobenzoxy-glycyl-L-leucine に作用して L-ロイシンを水解遊離させるが Glycyl-L-leucine には全く作用しないことが認められた。これ等の実験事実から上述沈殿蛋白質はプロテアーゼの一種であり、その基質特異性が HOFMANN ら⁶⁰⁾、STAHMANN ら⁶¹⁾、NEURATH ら⁶²⁾ によって報告されている牛膝臓 CPase の特異性に酷似していること及び水に難溶の所謂 Euglobulin の性質を有すること並びに魚類幽門垂が高等動物の膝臓とほぼ同様の生理的機能を有することなどの諸点から著者はこの沈殿蛋白質-酵素をサバ幽門垂 CPase として取扱うこととした。

第1節 酵素濃度の測定法

酵素濃度は比較的微量を取扱う関係から、DU型 Beckman 分光光度計を用い 278 m μ における吸光度を測定することによって定量した。即ち別にマイクロキールダール法によって求めた酵素液のN量と 278 m μ において測定した吸光度との関係を示す Fig. 1 を予め作成し之を用いて酵素濃度を定量した。

第2節 酵素活性の測定法

I. 試 薬

A. 基質溶液

Carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine 1.424 g を 0.02 M トリス緩衝液 (pH 8.0) 約 95 ml に溶解するとその pH は 7.5~7.6 となるから之に 0.2 M トリスアミノメタン溶液を

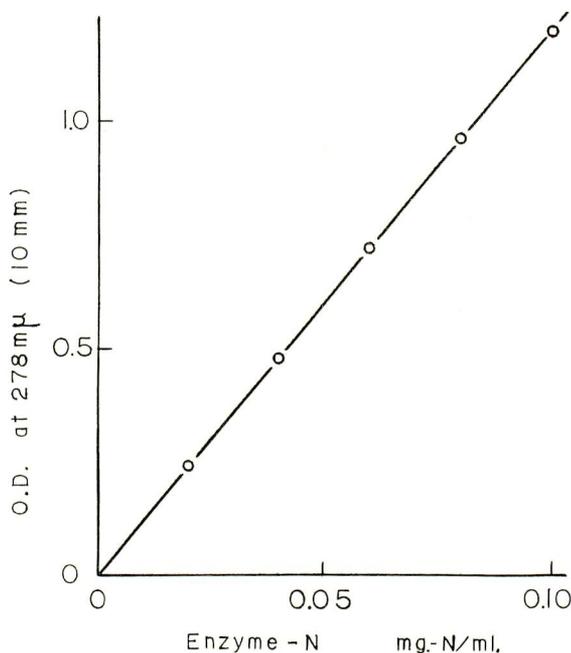


Fig. 1. Calibration curve for mackerel CPase-protein obtained through the ultraviolet absorption spectrum method.

加えガラス電極 pH メーターを用いて pH 8.0 調整し更に蒸留水を加えて 100 ml とする。こうすれば 0.04 M の Carbobenzoxymethyl-L-phenylalanine 溶液が得られる。

B. 酵素溶液

酵素を 1 M 食塩溶液に溶解する。DEAE-Cellulose Column で精製した酵素では 1 ml. 中 $5\sim 10\times 10^{-4}$ mg. を含むように酵素溶液を調製した。

II. 酵素反応操作

供試酵素液 1 ml. を 37°C. に 5 分間予温しておき、別に予温しておいた 0.04 M 基質溶液 1 ml. をすばやく加えてよく混和して反応させ、一定時間後 0.44 M トリクロール酢酸 (TCA) 溶液 1 ml. を加えて反応を停止した。

III. 反応によって遊離したアミノ酸 (L-フェニールアラニン) のニンヒドリン比色定量

上記反応停止液中の遊離 L-フェニールアラニン量をニンヒドリン比色法によって定量した。方法は YEMM, COCKING⁶³⁾ 法に従ったが、反応液が TCA によって酸性を呈するためその pH の調整を必要とするが、この操作を簡略化するため MOORE ら⁶⁴⁾ の用いた 4 N 酢酸緩衝液 (pH 5.5) を添加する方法を用いた。試薬及び比色操作は下記の如くである。

A. 試薬

4 N 酢酸緩衝液 (pH 5.5): 200 ml. の蒸留水に 272 g. の酢酸ソーダ ($\text{NaOAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) を加えて温浴上で完全に溶解する迄攪拌し、室温に冷却した後 50 ml. の氷酢酸を加え、更に全容 500 ml. になるように蒸留水を加えた。このようにして調製した緩衝原液の pH は 5.51 ± 0.03 であったが之を 5 倍に希釈するとその pH はほぼ 5.1 に低下した。原液は 4°C の冷蔵庫中で防腐剤を加えずに貯蔵し供試した。

シアン化カリウム溶液：0.01 M KCN 5 ml. をメチルセロソルブで 250 ml. に希釈した。

ニンヒドリン溶液：ニンヒドリン 2.5 g をメチルセロソルブ 50 ml に溶解した。

シアン化カリウム—ニンヒドリン溶液：上記のニンヒドリン溶液 50 ml. とシアン化カリウム溶液 250 ml とを混合したものをを用いた。この混合液は赤色を呈するが時間の経過と共に淡黄色となりブランク値も低くなる。使用は混合の翌日から 10日間位が適当である。

希釈用溶媒：60% (V/V) エタノール—水。

B. 比色操作

前記反応液 1 ml を硬質試験管にとり、之に 4 N 酢酸緩衝液 0.5 ml を加え次にシアン化カリウム—ニンヒドリン溶液 1.2 ml を加えてよく混合した後薬包紙でカバーしたコルク栓をして沸騰水中で 15 分間加熱発色せしめ、5 分間流水中で冷却し 60% エタノール 3 ml. を加えて 570 m μ で比色した。得られた吸光度より酵素作用によって基質から遊離した L-フェニールアラニン量を標準曲線 Fig. 2 より求めた。

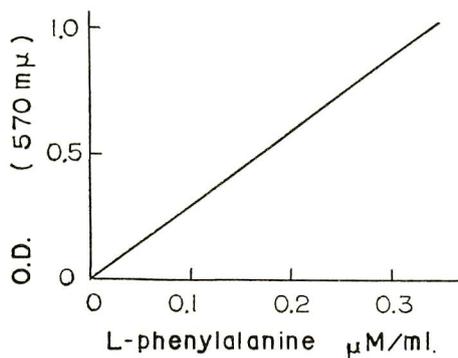


Fig. 2. The relationship between the amount of L-phenylalanine and the light-absorbance of the developed ninhydrin color.

L-phenylalanine was estimated through the colorimetric ninhydrin method of YEMM-COOKING.

IV. 酵素活性の単位算出法

0.04 M Carbobenzoxyglycyl-L-Phenylalanine 1 ml と酵素溶液 1 ml を加えて 37°C で 10 分間反応させた後 0.44 M TCA 1 ml を加えて酵素反応を停止せしめ、反応によって遊離した L-フェニールアラニンを比色定量して活性単位を測定するのであるが、便宜上 1 mg の酵素蛋白-N が 1 分間に遊離せしめる L-フェニールアラニンの μ mole 数を以てその酵素の単位とした。従って前記のニンヒドリン呈色の標準曲線を用いて吸光度 (O.D.) から直ちに試料酵素液 1 ml 中の単位を知るための検量線を Fig. 3 の如く作図して之を用いた。

例えば反応液の吸光度が 1.0 であるとすれば供試酵素による L-フェニールアラニンの遊離量は 0.34 μ mole/ml. となる。反応液は酵素液、基質液及び TCA 溶液を夫々等容混合したものであり反応時間が 10 分であるからその酵素活性の単位は $0.34 \times 3 \times 1/10 = 0.102$ unit/ml-enzyme soln. となる。従って別に供試酵素溶液濃度を定量すれば、酵素蛋白質 mg-N 当りの単位を算出することが出来る。

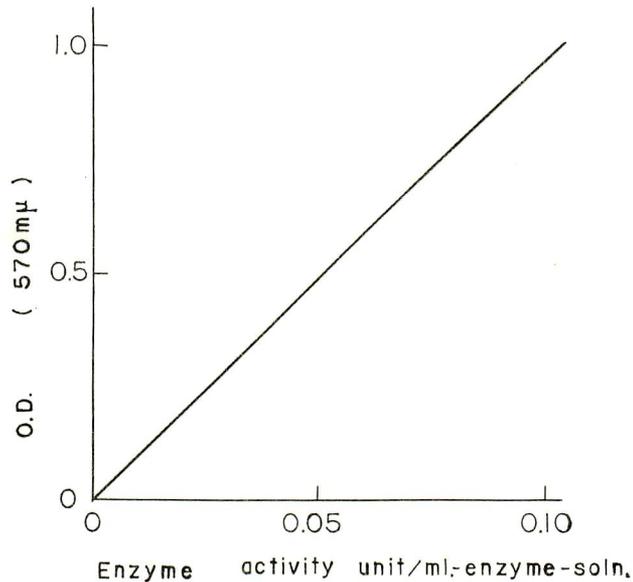


Fig. 3. The relationship between the unit of mackerel CPase activity and the light-absorbance of the developed ninhydrin color of L-phenylalanine liberated from carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine by mackerel CPase.

For the assay of unit of CPase activity, L-phenylalanine was estimated by colorimetric ninhydrin method of YEMM-COCKING.

第3節 小 括

マサバ幽門垂を食塩水で抽出し、その抽出液を流水に対し透析すると比較的多量の蛋白質の沈殿を生じ、この沈殿蛋白質は5%食塩水に極めて容易に溶解することを認めた。しかし更にこの沈殿蛋白質はChloroacetyl-L-tyrosineに作用してL-チロシンを遊離させ又Chloroacetyl-DL-phenylalanineを不斉水解してL-フェニールアラニンに遊離せしめる酵素活性を有することを認めた。更にこの酵素の基質としてはカルボキシル基が遊離状態に存在しアミノ基が遊離の状態でないことが必要であることを明らかにし得たので著者はこの酵素をサバ幽門垂 CPase Aとして取扱うこととした。

次に酵素の性質を調べるための基本となる酵素の濃度及活性の測定法を設定した。即ち酵素濃度はDU型Beckman分光光度計を用い278 mμにおける吸光度を測定することによって定量し、酵素活性はpH 8.0の0.04 M Carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine溶液を基質として酵素作用によって遊離されたL-フェニールアラニンをニンヒドリン呈色法により測定した。比色法はYEMM-COCKINGの方法に準拠したが、pHの調節を簡略にするため緩衝液はMOOREの提案した4N酢酸緩衝液を用いた。酵素活性の単位は1 mgの酵素蛋白-Nが1分間に遊離させるL-フェニールアラニンのμmole数を以て表現した。

第3章 サバ幽門垂 CPase の分離及び精製

酵素を分離精製することは生体内における生化学的諸反応の機序を解明する上に極めて

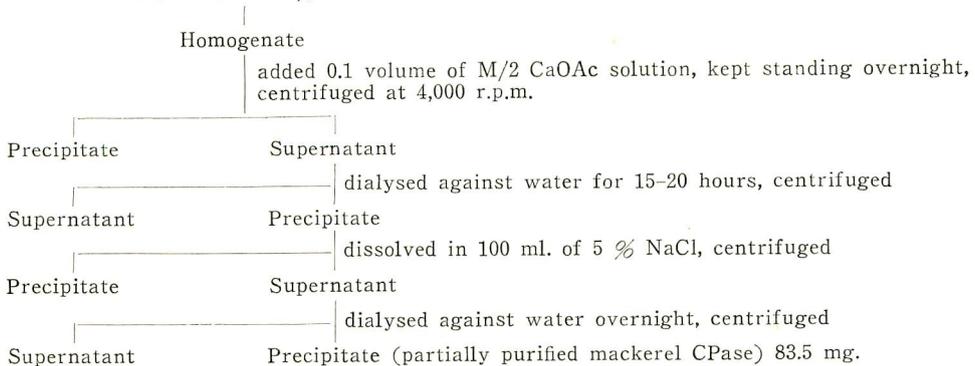
重要な意義をもっている。即ち生物体の組織切片乃至はそのホモジネート或いは種々の適当な溶媒による抽出液などを用いても酵素の示す生体内の機能についての知見は得られるが、之等の研究結果からその生体内における生化学的反応機構を明確に把握するためには之等の混合系から夫々の反応に与る酵素を分離精製して個々の酵素の示す反応機序を明らかにする必要がある。一方酵素蛋白質の物理化学的性質を検討するためにも酵素を単一の物質として取扱うことの出来る段階まで精製することが要求されている。以上のような見解からサバ幽門垂 CPase の分離精製を行った。

第1節 酵素の抽出並に精製

酵素を分離、精製するために先づ幽門垂組織から溶解抽出する方法につき検討した。牛の膵臓から CPase を抽出する方法としては ANSON^{(41), (65)} によって確立され NEURATH^{ら^{(66), (67)}}, SMITH^{ら⁽⁶⁸⁾} によって改良された方法があるが、サバ幽門垂 CPase の抽出にもこれ等の方法を適用し得るか否かを先づ検討した。しかし乍ら凍結幽門垂の融解汁液を用いる従来の方法は極めて低収率であることがわかったので、あらためて 5% 食塩水による抽出につき種々検討した。サバ幽門垂 CPase は水には溶けないが 3~5% 食塩水には極めて容易に溶解するからこの性質を利用して次の如く抽出した。即ちサバ幽門垂にその 2 倍容の 10% 食塩溶液を加えてホモジナイズして酵素を抽出する。この抽出液は遠心しても清澄な上清が得られないから之に 0.5 M 酢酸カルシウム溶液を加え抽出液中に溶存するりん酸と反応せしめてコロイド状のりん酸カルシウムとなすと抽出液中の混濁成分は之に吸着されるから一夜放置後 3500~4000 r.p.m. で 10 分間遠沈すると上澄液として透明な粗酵素液が得られる。次にこの粗酵素原液をセロファン袋に入れて出来るだけ低温な場所で流水透析を行う。一夜透析すると食塩等の塩類が殆んど除去されるから CPase を含めて蛋白質が沈殿して来る。この操作で他の蛋白質と可成よく分離され或る程度精製することが出来た。次に透析液を遠心分離して沈殿物を集め之に少量の 5% 食塩溶液を加えて蛋白質を溶解し、不溶物を遠心除去した後再び前と同様に透析処理して沈殿した酵素を集めた。以上の精製操作を Table 1 にまとめた。

Table 1. Scheme of extraction and separation of CPase from the pyloric coeca of mackerel.

2 Kg. of mackerel pyloric coeca was homogenized with 4 l. of 10% NaCl.



第2節 Zone-electrophoresis による酵素の精製度の吟味

前述の如く分離精製した CPase の精製程度につき検討した。蛋白質の単一性の問題を論ずる一方法として Zone electrophoresis が比較的安全でしかも適確な結果を与えることはすでによく知られているから、著者もこの方法を適用して次の如く操作して前記のサバ幽門垂 CPase 標品の精製度を検討した。即ち Fig. 4 のような垂直カラムを用い支持体としてはバレイシヨ 澱粉とセライト (Hyflosupercel) を 5:1 に混合したものを使った。

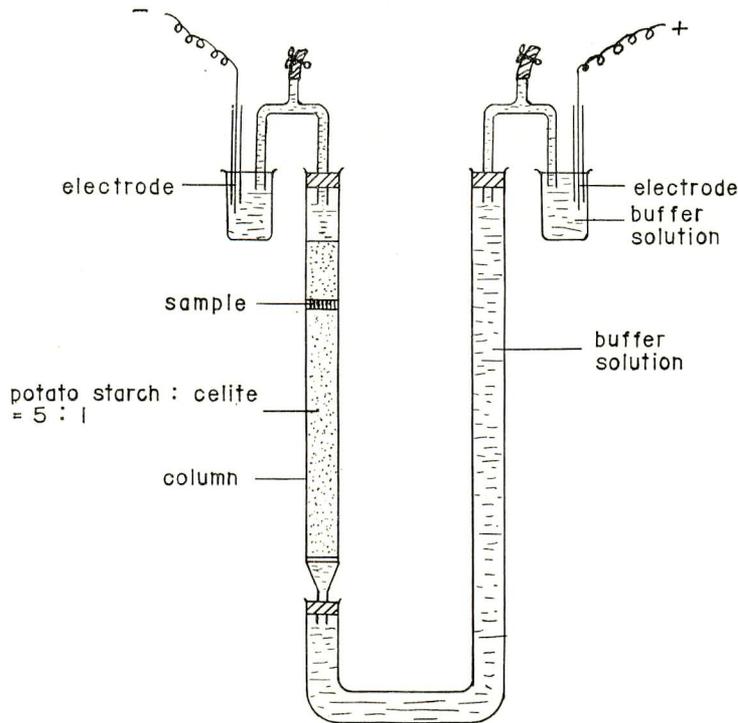


Fig. 4. Apparatus for vertical zone electrophoresis of mackerel CPase preparation.

上記澱粉—セライト混合物を先づ水道水、次いで蒸留水でよく洗い、最後に 0.1 N Na_2CO_3 - NaHCO_3 緩衝液 (pH 10.08) で洗って緩衝化し、カラム (1×60 cm) につめ 50 cm の高さとする。次にカラム上の緩衝液を吸い上げ、予め緩衝液の 5 ml に溶解した試料酵素 10 mg をピペットで滴加した。後試料の吸着帯が乱れない様に極めて徐々に澱粉—セライト混合物を 3 cm の厚さになるようにした。次いで緩衝液を加え更に電極槽にも同一緩衝液を注入して水平面を調節した後通電泳動させた。泳動条件は 300 V, 14 mA, 15 時間通電とした。泳動終了後カラムを装置から外し同一緩衝液を満たした分液漏斗をつけてフラクシオンコレクターにかけ、普通の溶出クロマトグラフィーと同じ要領で溶出させ、溶出液を分別捕集した。得られた各溶出液の一部につき夫々の活性度及び蛋白質量を測定⁶⁹⁾した。その結果は Fig. 5 に示すごとく活性の Peak と蛋白質のそれは殆んど一致するが尚 2 つの蛋白質成分が混在することが認められ、従って供試酵素は未だ均一ではなく更に精製の必要が認められた。なお Main Peak の比活性は 58.5 unit であった。

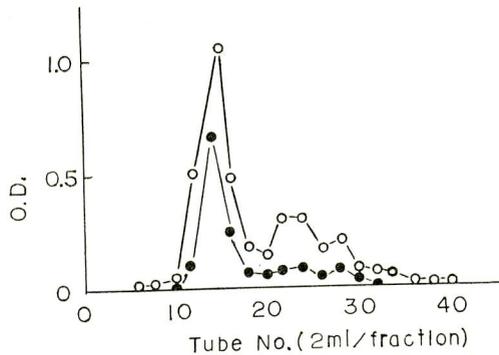


Fig. 5. Vertical zone electrophoresis of partially purified mackerel CPase in Table 1.

Column: 1×60 cm; starch: celite=5:1.

Electrophoretic and eluting solvent: 0.1 M Carbonate buffer (pH 10.08).

Electrophoretic condition: 300 V, 14 mA, 15 hrs.

●—●—●: CPase activity. (O. D. at 570 m μ) —○—○—: Protein. (O. D. at 660 m μ)

第3節 蛋白質の精製と均一性に関する考察

一般に蛋白質の均一性は種々の方法によって検討した上で初めて確認すべきものであり、絶対的に均一と認めうるか否かは非常に難しい問題である。又ある物質が結晶化することは低分子有機化合物の場合には一応その物質が純粋である証拠とされているが、蛋白質のような高分子物質の場合においては、その結晶化は必ずしもその蛋白質の均一性を表わすものではない。例えば牛乳から得られる β -ラクトグロブリンは結晶状に得られ従来最も均一な蛋白質の一つと考えられていたのであるが、Liら⁷⁰⁾の研究によって之がいくつかの蛋白質成分からなっていることが明らかにされている。又数回再結し電気泳動的に均一なりボスクレアーゼもクロマトグラフ的には不均一であることがHirsら⁷¹⁾によって示された。更にTALLAN⁷²⁾はリゾチームの結晶標品につきAmberlite 1RC-50 (XE-64)によるクロマトグラフィーを試みて之が蛋白質成分の混合物であることを明らかにしている。蛋白質の精製法には種々あるがイオン交換クロマトグラフィーは上記の事実からも明らかなように蛋白質の純化やその純度の検定に大きく役立っている。著者は蛋白質の分離精製に種々優れた性能を示すセルローズイオン交換体^{73),74)}を用いて前節 (Table 1) で得られた粗マサバ幽門垂 CPase の純化を試みた。後述する如く本酵素分子中には活性に関する金属を含むことが予備実験で認められたので、精製中における失活を防止する目的から特にアニオン交換体である DEAE-セルローズを用いた。

第4節 DEAE-セルローズカラムによるサバ幽門垂 CPase の精製

I. カラムの調製

DEAE-セルローズ (米国 Brown 社製) を 1 N 苛性ソーダ、蒸留水、1 N 塩酸、更に蒸留水の順で洗滌処理して活性化した後、0.02 M トリス緩衝液 (pH 9.0) で十分に緩衝化して 1.55×20 cm のカラムを調製した。

II. 酵素試料の調製

Table 1 に記載した方法で分離した粗 CPase に 1 M 食塩-0.02 M トリス緩衝液 (pH 9.0) 10 ml を加えて之をよく溶解し遠心分離して不溶物を除いて得た試料液を Visking セ

ロファンチューブに入れ、0.02 M トリス緩衝液 21 中にてマグネチックスターラーにより攪拌し乍ら透析して NaCl を除去すると共に Bufferize した。外液は 12 時間経過後に更新し再び透析をつづけ 24 時間後不溶物を遠沈除去しその上清を酵素試料とした。

III. 溶 媒

種々検討した結果次の溶媒が最適と思われた。

溶媒 I : 0.02 M トリス 緩衝液 (pH 9.0)

II : 0.02 M トリス 緩衝液 (pH 9.0) - 0.1 M 食塩溶液

III : 0.02 M トリス 緩衝液 (pH 9.0) - 1.0 M 食塩溶液

之等の溶媒を順次とりかえて溶離せしめた。

IV. カラムの操作

カラム操作は 19°C の恒温室で行なった。Bufferize した酵素試料液 30 ml (0.44 mg-N/ml) をカラムに注入吸着せしめ、先づ溶媒 I で溶出する溶出速度は 1 ml/min とした。溶媒 I で蛋白質の溶出が完了したことを認めた上で次の溶媒 II と取り換え、更に同様にして溶媒 III をも流下した。その結果は Fig. 6 に示すごとくである。

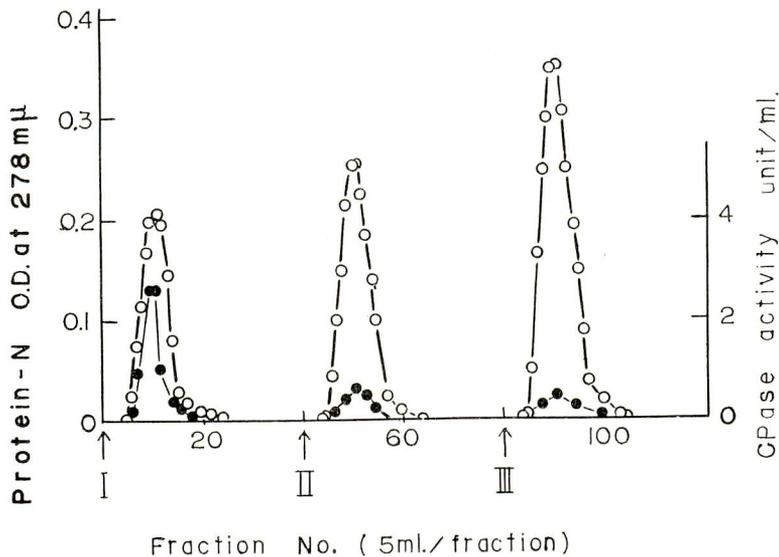


Fig. 6. The chromatographic purification of partially purified mackerel CPase in Table 1 on DEAE-cellulose.

Stepwise elutions were carried out with 0.02 M Tris buffer (I), 0.02 M Tris-0.1 M NaCl buffer (II) and 0.02 M Tris-1.0 M NaCl buffer solution (III) (pH 9.0) successively.

The total recoveries of protein and the eluted activity were 90.6% and 100.2% respectively.

Column: 1.55×20 cm. —○— Protein-N. —●— CPase activity.

溶媒 I による溶出区分 (Fraction 1) に強い CPase 活性が認められた。又溶媒 II 及び III で溶出した区分 (Fraction 2 及び 3) にも僅か乍ら活性が認められた。従って CPase は溶媒 I で溶出して来る区分に含まれていると考えられた。しかして全蛋白質 N の回収率

は 90.6 %，全活性の回収率は 100.2 % であった。

Fraction 1 の蛋白-N 量及び活性の供試酵素試料のそれに対する割合は蛋白回収率 15.0 %，活性回収率 60.3 % であった。

第5節 最強活性区分 (Fraction 1) の再クロマトグラフィー

前節において得られた最強活性区分 (Fraction 1) につき，溶媒 I を用いて Rechromatography を行ないその結果を Fig. 7 に示した。溶出像から見ればこの成分は均一であると考えられる。

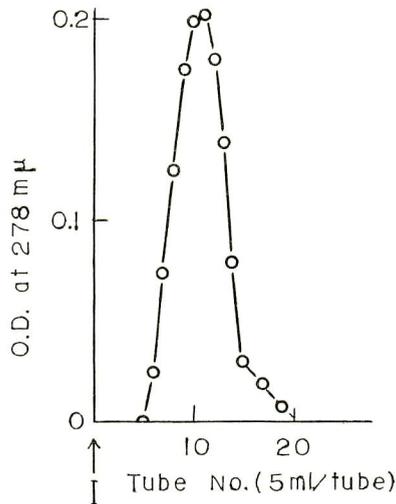


Fig. 7. Rechromatography of the fraction 1 in Fig. 6.
Column: 1.55×21 cm. Solvent: 0.02 M Tris buffer solution (pH 9.0).

第6節 サバ幽門垂 CPase と牛膵臓 CPase A の比較

サバ幽門垂 CPase と牛膵臓 CPase-A の DEAE-セルロースカラムにおけるクロマトグラムから両者の比較検討を行った。即ち NEURATH 法によって 3 回再結した牛 CPase-A を用い前述の方法と同様に 0.02 M トリス緩衝液で Bufferize した後カラムにかけ，前記同様溶媒 I で溶出した後溶媒 II と取り換えて溶出を行なった。その結果を Fig. 8 に示す，溶出像から明らかなように 3 回再結した牛 CPase A でも僅か乍ら溶媒 I で溶出して来る CPase 活性を有しない蛋白質が混在するが，CPase 活性を有する区分は溶媒 II によって始めて溶出されて来た。この点でマサバ幽門垂 CPase と牛膵臓 CPase-A とは蛋白質として明らかに相異なるものであることが示された。

第7節 小 括

酵素化学的性質を明らかにし又酵素蛋白質の物理化学的性質を検討するための基礎となる酵素の抽出精製を試みた。牛の膵臓から CPase-A を抽出する最も一般的な凍結試料の融解汁液より抽出する方法はサバ幽門垂の場合には収量が極めて悪く適当ではなかったの次で次の如く処理した。即ちサバ幽門垂に 2 倍容の 10 % 食塩溶液を加えて得たホモジネートに酢酸カルシウムを加えて混濁成分を除き遠心して上澄液を得た。この酵素抽出液を流水透析すると CPase を含む蛋白質が沈殿し抽出液中の他の蛋白質と分離され或る程度精製

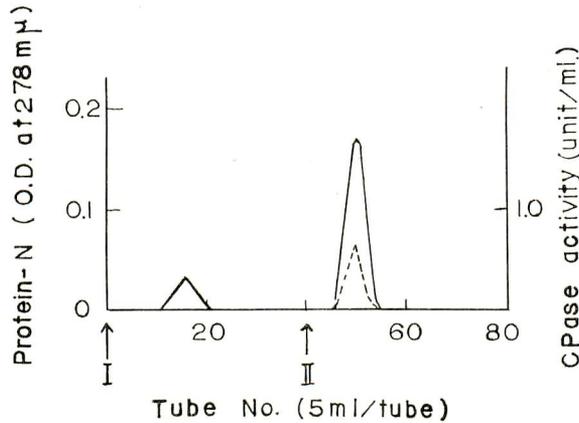


Fig. 8. Chromatographic behavior of three-times-recrystallized bovine pancreatic carboxypeptidase A on DEAE-cellulose.

Isolation of crystalline carboxypeptidase A from bovine pancreatic juice was carried out through NEURATH modified method.

Experimental conditions were the same as those shown in Fig. 6.

— : Protein-N. ---- : CPase activity.

することが出来た。このようにして得られた粗酵素をバレイショ 澱粉—セライト混合物を支持体とした縦型カラムを使い、Zone electrophoresis を行ったが、少なくとも3種以上の蛋白質成分が混在することが認められた。よって更に DEAE—セルローズカラムによる精製を試みた結果、クロマトグラフ的に均一と考えられる CPase 区分を得ることが出来た。又比較のため牛膝藏 CPase をサバ幽門垂 CPase の精製の場合と全く同様な条件下でクロマトグラフィーを試み、両者の溶出像が全く異なっていることから、両者は蛋白質として異なるものであると考えられた。

第4章 超遠心沈降法によるサバ幽門垂 CPase の均一性の検討並びに分子量の決定

酵素の精製の程度を検討するには超遠心沈降法、電気泳動法、溶解度法、クロマトグラフィー等種々の方法が提案⁷⁰⁾されている。

本研究では沈降速度法によりサバ幽門垂 CPase の均一性を検討し、均一成分であることを確認した上でその沈降定数を算出し、併せて沈降平衡法によって分子量を求めた。

第1節 沈降速度法による沈降定数の算出法^{71),73)}

沈降定数 s は単位力場での沈降速度であるから、回転軸からの距離を x 、時間を t 、回転の角速度を ω とすれば

$$s = \frac{dx}{dt} / \omega^2 x \dots\dots\dots(4-1)$$

であらわされる。

実際には沈降定数を測定するには特定の粒子に着目できないから、界面の時間 t_1 における位置 x_1 と時間 t_2 における位置 x_2 を測定すると、式(4-1)を積分して

$$s = \frac{\ln(x_2/x_1)}{\omega^2(t_2-t_1)} \dots\dots\dots(4-2)$$

によって求めることが出来る。

(4-2) 式は次のように書き直すことが出来

$$s = \frac{2.303(\log x_2 - \log x_1)}{\omega^2(t_2 - t_1)} \dots\dots\dots(4-3)$$

として沈降定数を求めることが出来る。

第2節 沈降平衡法による分子量の算出法

遠心力のあまり大きくない場では遠心力によって沈降するのと、生じた濃度差によつて拡散のために逆に 広がるのが平衡状態になって粒子の分布が定常状態になる。このような沈降平衡の場では一般に次式が成立つことが ARCHIBALD⁷⁹⁾によって提唱されている。

$$M = \frac{RT}{(1 - V\rho)\omega^2} \cdot \frac{dc/dx}{xc} \dots\dots\dots(4-4)$$

但し M : 分子量, R : ガス定数, T : 絶対温度, V : 偏比容, ρ : 密度, ω : 角速度,
 c : 溶質の濃度, x : 回転中心よりの距離

c と dc/dx を実験によって下記の如く求めて, (4-4) 式から M を算出することが出来る。

$$c = c_0 - \frac{1}{x_m^2} \int_{x_m}^{x_p} x^2 (dc/dx) dx \dots\dots\dots(4-5)$$

但し x_m : 回転中心より meniscus に到る距離
 x_p : 回転中心より plateau に到る距離
 c_0 : 初濃度

實際上 $x = x_m$ と見做し得るから

$$c \doteq c_0 - \int_{x_m}^{x_p} (dc/dx) dx \dots\dots\dots(4-6)$$

により近似的に c を計算した。

又 c_0 は

$$c_0 = \int_{x_m}^{x_b} (dc/dx) dx \dots\dots\dots(4-7)$$

によって求めることが出来る。

但し x_b : 回転中心より bottom に到る距離

第3節 沈降測定結果

I. 沈降定数 (st)

測定条件

セルの厚さ: 1.2 cm

測定温度: 25.7°C

回転速度: 59,700 r.p.m. (995 r.p.s.)

溶 媒: 0.02 M トリス緩衝液 - 0.1 M 食塩溶液 (pH 9.0)

上記の条件で超遠心沈降を行い、Fig. 9 に示す如き沈降像を得た。

沈降像は図に示すように対称的な単一界面を示し分子量に関しては均一成分からなることが明らかとなった。そこでこの均一成分の沈降定数 st を求めることにした。即ち各時間において撮影した沈降図を夫々引伸ばして硬質印画紙に焼付け第2節に述べたように各時間における界面の位置 (x_1, x_2) を実測してそれを真の長さに補正した後 (4-3) 式に従って st を算出した (試料 1)。尚これと略同じ条件において同様に超遠心を行いその結果を同様

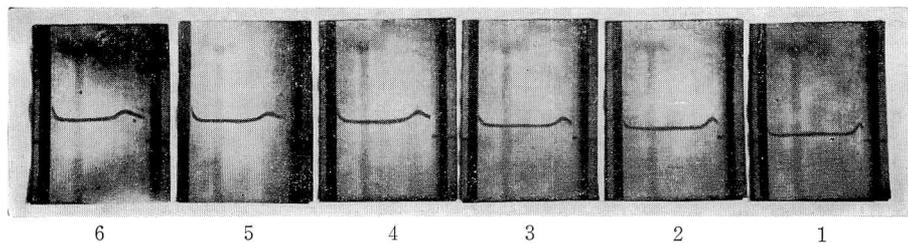


Fig. 9. Ultracentrifugal pattern of the purified mackerel CPase (fraction 1 in Fig. 6) in 0.02 M Tris-0.1 M NaCl buffer (pH 9.0) at 59,700 r.p.m. and 25.7°C.

With 10 minutes intervals between exposures (photograph 1 was taken 10 minutes after the rotation became constant).

Table 2. Determination of sedimentation constant St of mackerel pyloric coeca CPase by the sedimentation-velocity ultracentrifugation method.

Plate No. in Fig. 9	Sample 1		Sample 2*	
	1	5	1	5
t (minutes)	5	45	5	45
x (cm.)	5.909	6.094	5.916	6.096
$\log x$	0.7716	0.7849	0.7729	0.7850
$\omega^2 \times 10^{-7}$	3.90		3.83	
$St \times 10^{13}$	3.27		8.23	
St (mean value)	3.25 $\times 10^{-13}$			

* Data of sample 2 were obtained under the similar conditions as in Fig. 9.

To calculate the sedimentation constant of the sample, the following equation is used.

$$S = \frac{\ln(x_2/x_1)}{\omega^2(t_2-t_1)} \sim \frac{2.303(\log x_2 - \log x_1)}{\omega^2(t_2-t_1)}$$

where x_1 is the boundary position at time t_1 , x_2 is at time t_2 , and ω is the angular velocity.

に処理して st を算出した (試料 2). 之等の結果を Table 2 に示す.

この表に示すようにサバ幽門垂 CPase の沈降定数 st は 3.25×10^{-13} であった.

II. 分子量

測定条件

セルの厚さ: 1.2 cm

測定温度: 25.0°C

回転速度: 330.7 r.p.s. (19,842 r.p.m.)

溶媒: 0.02 M トリス緩衝液 - 0.1 M 食塩溶液 (pH 9.0)

上記の条件で沈降平衡を成立させる事によってサバ幽門垂 CPase の分子量 (M) を算出した.

r.p.s.: 330.7, ω^2 : 4.31×10^6 , R : 8.31×10^7 , T : $273.2 + 25.0$, V : 0.750, ρ : 1.02

初濃度 c_0 は合成界面セルを用いその拡散曲線から測定した結果 15.17 となった. (但し引伸倍率 39.6).

以上の数値を用いて計算した結果サバ幽門垂 CPase の分子量は 23,500 であることが,

判明した。

哺乳動物の膵臓 CPase A の分子量は 34,000^{80),80),82)} と測定されているが、これに比較するとサバ幽門垂 CPase は遥かに小さい分子量を与えた。この点は procarboxypeptidase (pro-CPase) からの活性化における分解度と関係をもち、興味ある問題として今後研究すべき課題と考える。

第4節 小 括

サバ幽門垂より抽出し DEAE-セルローズカラムによって精製した CPase A につき超遠心沈測定を行なった。その沈降像から超遠心的には均一であることが推定され従って試料酵素は可成り精製されたものと考えられる。このものの沈降定数 *st* は 3.25×10^{-18} であり又 ARCHIBALD 法によって求めた分子量は 23,500 であった。

第5章 酵素の精製過程における酵素 N 量及び全活性の回収率並びに比活性の変動

第3章及び第4章において述べたようにサバ幽門垂 CPase はそのイオン交換クロマトグラム並びに超遠心像から見ると殆んど均一成分と認められた。

精製過程における酵素 N 量及び全活性の回収率並びに酵素活性単位の変動を調べそれ等の結果を Table 3 にまとめた。

Table 3. Summary of purification procedure for mackerel pyloric coeca CPase.

Preparation	Yield		Recovery		Specific activity units/mg.-N/min.
	Total protein-N mg.	Total activity units	Protein %	Activity %	
1. Partially purified CPase in Table 1.	13.3	780	100	100	58.5
2. Fraction 1 obtained on DEAE-cellulose column chromatography in Fig. 6	2.0	508	15.0	65.3	254.0

Table 3 に示すごとく、2 kg. のサバ幽門垂より透析沈殿法によって 13.3 mg-N 相当の粗酵素が得られた。このものの比活性は 58.5 unit であった。之を更に DE-AE-セルローズカラムにより精製すると試料粗酵素蛋白質の 15.0 % 相当の CPase 区分 (Fraction 1-tube No. 6~No. 15) 2.0 mg-N が得られた。しかしてこの区分の活性回収率は 63.5 % を示し比活性は 245 unit であった。

第6章 サバ幽門垂 CPase の酵素化学的性質

酵素そのものの一般的な性質は蛋白質のそれと全く同一であるが、この蛋白質としての特性は所謂生物活性即ち酵素の触媒作用の面にも幾多あらわれてくる。先にも述べたように生物体内で行われる基本的な生化学反応は生物の種類にかかわらず同じ反応であり同じ酵素によって触媒されていることは興味深いことであるが、同一の触媒作用を示してもそれ等の起源によってその特異性には多少の差異があることも指摘されており、その原因が蛋白

質構造の相違ひいてはその物理化学的性質の相違に帰せられている。水産生物は特殊な生活環境に棲息しているからその酵素も亦陸上哺乳動物の酵素に比し若干の相違が推察される。このような見地に立ってサバ幽門垂 CPase の性質につき種々検討を行なった。

第1節 酵素作用の温度依存性

精製酵素につき 0.04 M Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine (pH 8.0) を基質として各温度における活性を測定することによって酵素作用の温度依存性を検討した。即ち各温度に予温しておいた基質溶質 1 ml. に同じく予温しておいた酵素溶液 (1 M 食塩溶液—0.0004 mg.-N/ml) 1 ml. を加えて 10 分間反応させ、0.44 M TCA 溶液 1 ml. を加えて酵素反応を停止せしめる。この反応液 1 ml につきニンヒドリン呈色を行い、その吸光度を以て活性を表わし、作用の温度依存性を検討した。その結果を Fig. 10 に示す。之から本酵素の作用至適温度は 35~40°C であることが明らかとなった。

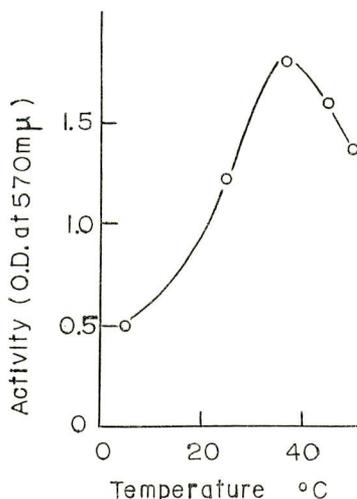


Fig. 10. A temperature-activity curve of mackerel CPase.

CPase activity was assayed by incubating a mixture of 1 ml. of 0.04 M carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine in 0.02 M tris buffer (pH 8.0) and 1 ml. of enzyme solution (0.0004 mg.-N/ml.) at various temperatures for 10 minutes. The liberated L-phenylalanine was measured by colorimetric ninhydrin method of YEMM-COCKING.

第2節 酵素作用の pH 依存性

いろいろな pH の 0.1 M 酢酸塩、りん酸塩、トリス及び炭酸塩緩衝液に溶解して得た 0.04 M Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine 溶液を基質として 37°C において酵素活性を測定しその pH 依存性を調べた。それ等の結果を Fig. 11に示した。所謂至適 pH は 8.0 附近と考えられた。

第3節 酵素活性に及ぼす金属イオンの影響

Mn⁺⁺, Mg⁺⁺, Co⁺⁺ 及び Zn⁺⁺ などのような金属イオンの添加によってある種のペプチダーゼが活性化することは既によく知られている処である。SMITH⁸⁴⁾ はアミノペプチダーゼや他のペプチダーゼの多くのものが金属イオンによって特異的に活性化される所謂

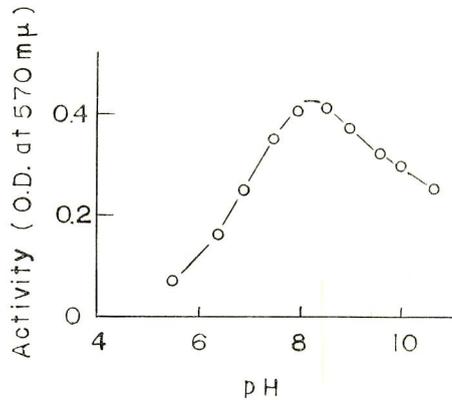


Fig. 11. A pH-activity curve of mackerel CPase.

CPase activity was assayed by incubating a mixture of 1 ml. of 0.04 M carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine in 0.1 M acetate, phosphate, Tris and carbonate buffer solution and 1 ml. of enzyme solution (0.0004 mg.-N/ml.) at 37°C for 10 minutes. The liberated L-phenylalanine was measured by colorimetric ninhydrin method of YEMM-COOKING.

金属酵素であると云う興味ある推定をした。しかして SMITH は金属活性のペプチダーゼに於いては酵素-基質複合体 (ES-Complex) の形成に際し金属イオンが結合の橋渡しの役目を司るものであると述べている。

著者はマサバ幽門垂から得られた CPase に Co^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} 及び Mn^{++} (何れも塩化物) を加えて Preincubate した後酵素活性を測定し、酵素活性に及ぼす之等金属イオンの影響を比較検討した。その結果を Table 4 に示す。

Table 4. The effect of divalent metal ions on the activity of mackerel CPase.

Metal ions	Relative activity (%)
control (without metal ion)	100
Co^{++}	525.0
Ca^{++}	99.5
Mg^{++}	97.5
Mn^{++}	45.6
Zn^{++}	56.7

The enzyme activity of mackerel CPase was estimated after being preincubated with 0.005 M various metal ions for 30 minutes at 25°C.

The final concentration of metal ions in each enzyme-substrate reaction mixture was 0.001 M.

この表から明かなように Mg^{++} , Ca^{++} は酵素活性に対し殆んど影響を示さないが、 Mn^{++} , Zn^{++} は何れも酵素活性を 50% 前後阻害することが認められた。一方 Co^{++} を添加したのでは無添加に比し著しく活性の増加することが認められた。

第4節 酵素-基質反応系における Co^{++} の関与様式

サバ幽門垂 CPase の活性増大に対する Co^{++} の関与の様式を考究することは酵素化学的

見地からも興味あることである。金属イオンの酵素活性に関与する仕方には種々あるものと考えられている。例えばグリシルグリシンジペプチダーゼ(Glycylglycinedipeptidase)による Glycylglycine の水解反応の際に Co^{++} の存在で著しく反応が促進⁸⁵⁾ されることが認められているが、この場合は Co^{++} が Glycylglycine と Complex を作りその結果グリシルグリシンジペプチダーゼの attack を受け易くなると云う解釈に立っている。他方ロイシンアミノペプチダーゼ (Leucineaminopeptidase) のように Mn^{++} 又は Mg^{++} が酵素蛋白と結合し Complex を形成して活性化^{86),87)} するような関与の仕方もある。

そこで著者はサバ幽門垂 CPase の Co^{++} による活性増加様式を明らかにするための検討を行った。即ち酵素と CoCl_2 を混合して一定時間 Preincubate した後に基質 (Carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine) と反応させた場合 (Co^{++} -CPase 系) と、基質に CoCl_2 を加えて同様一定時間放置後酵素を作用させた場合 (Co^{++} -Substrate 系) の基質水解反応物の測定値を求め、酵素-基質反応系における Co^{++} の関与の様式を調べた。その結果を Fig. 12 に示す。

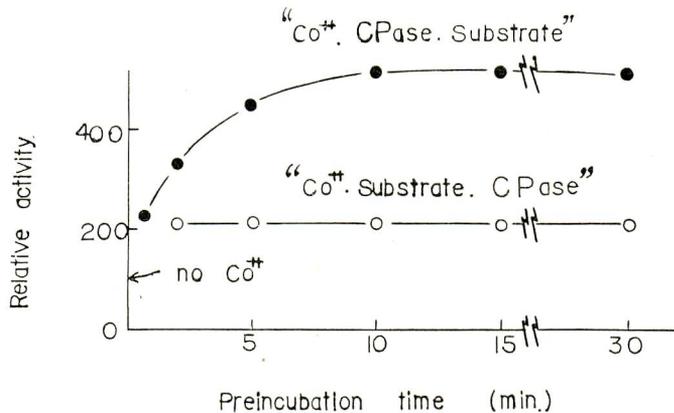


Fig. 12. Participation of cobalt ion in the enzyme-substrate reaction.

Relative activities are compared with the value of 100 for intact CPase in the absence of cobalt ion.

“ Co^{++} -CPase-Substrate” (solid circle): The mixture of 1 ml. of 0.01 M CoCl_2 solution and 1 ml. of CPase solution (0.0004 mg.-N/ml) was preincubated at 25°C. And then 1 ml. of 0.04 M carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine in 0.02 M Tris buffer (pH 8.0) was added and the mixture was incubated at 37°C for 10 minutes.

“ Co^{++} -Substrate-CPase” (open circle): The mixture of 1 ml. of 0.01 M CoCl_2 solution and 1 ml. of 0.04 M carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine in 0.02 M Tris buffer (pH 8.0) was preincubated at 25°C. And then, 1 ml. of CPase solution (0.0004 mg.-N/ml.) was added and the mixture was incubated at 37°C for 10 minutes.

Fig. 12 から明らかなように Co^{++} -Substrate 系は Preincubation による活性の変化は認められなかった。しかし乍ら Co^{++} -CPase 系では経時的に著しい活性の増加が見られ、25°C においてほぼ 15 分間で活性が最高値を示しそれ以上長く処理しても活性の増加は認められなかった。以上のことから Co^{++} による酵素活性の増大は Co^{++} -CPase (複合体) を形成することに因るものであると考えられた。 Co^{++} -Substrate 系でも Co^{++} 無添加の場合に比べて約 2 倍の活性が認められるが之は酵素反応 (10 分間反応) 中に Co^{++} -

CPase を形成することによるものと考えられる。このことは Co^{++} -Substrate 系において Preincubation の時間の長短にかかわらず一定値を示すことから理解された。

第5節 Co^{++} -CPase 複合体形成に対する温度の影響

Co^{++} による酵素の活性化は比較的緩かに行われ、前実験の結果から室温 (25°C) では略 10 分で Full active になることが認められた。そこで更に Co^{++} -CPase (complex) 形成機構を明らかにする目的から Preincubation の温度の影響を調べた。即ち 6, 18.5, 29, 37, 50°C において酵素溶液 (0.1 M ベロナール緩衝液, pH 8.0) と 0.01 M 塩化コバルト溶液を等容づゝ加えて何れも 15 分間 Preincubate して Co^{++} による活性化を行い、直ちに水道水で冷却した後 37°C 恒温水槽中に 5 分間静置予温し、之に 37°C に予温しておいた 0.02 M Chloroacetyl-L-phenylalanine 溶液を加えて 10 分間反応せしめ、活性をニンヒドリン呈色法で測定した。得られた活性から Co^{++} による酵素の前処理温度が活性に及ぼす影響を調べた。その結果を Table 5 に示した。

Table 5. The effect of preincubation-temperature on the increase in the activity of mackerel CPase induced by cobalt ion.

Preincubation temperature (°C)	Activity (0. D. at 570 mu)
6	0.578
18.5	0.758
29	0.717
37	0.702
50	0.695
without Co^{++}	0.225

Preincubation was carried out by incubating a mixture of equal volumes of enzyme solution of 0.1 M veronal buffer (pH 8.0) and 0.01 M CoCl_2 for 15 minutes.

これで明らかなように前処理温度が 18.5~50°C の場合には温度の高い程酵素活性の増加率が低かった。このことから Co^{++} -CPase 形成には出来るだけ温和な条件を与えることが必要であると考えられた。一方 6°C では 18.5°C に比較して可成り低い値を示しているが、恐らく 6°C では 15 分間 Co^{++} と処理しても Co^{++} -CPase の形成が完成されず従って活性も亦最高に到らなかったものと考えられる。

第6節 Ethylenediaminetetracetate (EDTA) 処理による失活と Co^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} 及び Zn^{++} による活性回復

サバ幽門垂 CPase を Co^{++} と処理するとその酵素活性がほぼ 5 倍に増加する事実からこの酵素が分子内に金属イオンを含むものであると想定した。一般にこのような金属酵素はキレート試剤である EDTA で処理すると分子内の金属が取り除かれるから容易に失活するものである。

そこで先づサバ幽門垂 CPase の分子中に金属を含むか否かを確かめるため EDTA で処理して活性の変化を調べた。即ち酵素液 (0.4 mg-N/ml) に等容の 0.1 M EDTA 溶液を加え 0°C (氷水中) に保持して一定時間経過後之を透析して過剰の EDTA を除き残存活

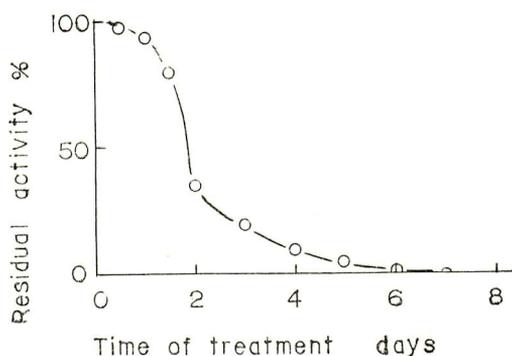


Fig. 13. Cessation of enzyme activity of mackerel CPase incubated with EDTA at 0°C.

The incubated mixture consisted of equal volumes of enzyme solution (0.4 mg.-N/ml.) and 0.1 M EDTA solution. In the assay of the CPase activity, the EDTA-treated enzyme preparation was dialysed against water to remove the excess free EDTA.

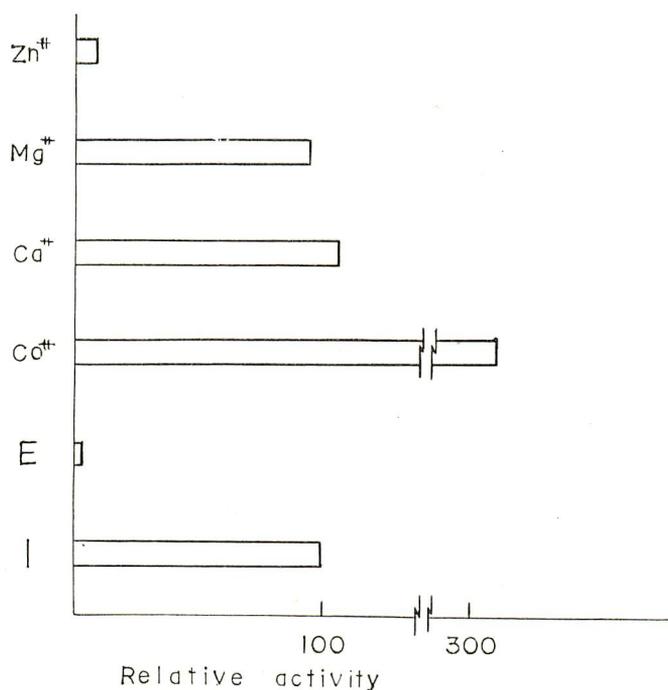


Fig. 14. Reactivation of the EDTA-treated inactive mackerel CPases by the effect of various divalent metal ions.

The CPase activity was measured after preincubation with 10^{-2} M metal ions.

I: intact enzyme; E; treated with EDTA; Co⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Zn⁺⁺: Pretreated with EDTA for 5 days and treated with the respective kinds of metal ions.

性を測定して酵素活性を測定して酵素活性に及ぼす EDTA の影響をしらべた。その結果は Fig. 13 の如く EDTA 処理により徐々に活性が低下し、1日で5%、2日間で65%、5日間で殆んど完全に失活した。このことからこの酵素には活性に必要な金属が含まれて

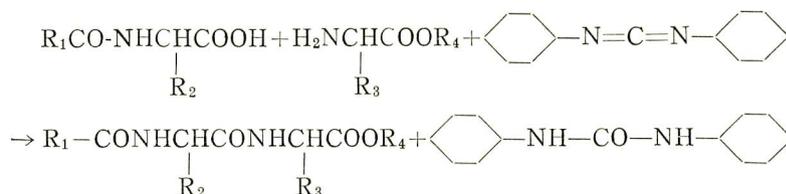
いることが推定された。

次にこのようにして失活させた酵素に金属イオンを添加してその活性が回復されるか否かを検討した。即ち予め EDTA で処理した後透析して過剰の EDTA を除去した活性のない酵素液にこれと等容の Mg^{++} , Ca^{++} , Co^{++} 及び Zn^{++} (何れも塩化物) の各 0.01 M 溶液を加えて 12 時間 6~8°C に保持し、その混合液中の酵素活性を測定して活性回復に対する金属イオンの効果を調べた。その結果は Fig. 14 に示すごとく、 Co^{++} は intact な酵素の活性の 3.7 倍、 Mg^{++} は 0.95 倍、 Ca^{++} は 1.1 倍となり明らかに活性回復が認められた。しかし乍ら Zn^{++} は効果が認められなかった。このように二種以上の金属イオンが酵素活性に関与し得る事実は甚だ興味のあるところである。

第 7 節 サバ幽門垂 CPase の基質特異性

I. Carbobenzyglycyl-L-phenylalanine の合成

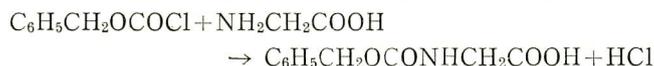
CPase A の典型的な基質である Carbobenzyglycyl-L-phenylalanine の合成を次の如く行なった。SHEEHAN^{89), 90)} は 1955 年に縮合剤としてジシクロヘキシルカルボジイミド (Dicyclohexylcarbodiimide) をアシルアミノ酸及びアミノ酸エステルのテトラヒドロフラン (Tetrahydrofuran) 溶液に加えて好収率でアシルペプチドエステルを合成することに成功している。



この方法はアミノ酸の何れか一方の基を活性化する必要もなく、又反応生成物のうち尿素誘導体は有機溶媒に不溶 (水にも難溶) のために簡単に除去し得るから目的のアシルペプチドのみが容易に結晶状に得られると云う長所をもっている。大川⁹⁰⁾はこの方法により O-benzyl-DL-Serine を使用して二、三のペプチド合成を行い 80~90% の良好な収率であったと報告し、本法が極めて特徴のある且つ将来性のある良法であることを認めている。

著者は本法を用いて Carbobenzyglycyl-L-phenylalanine を合成した。

A. カルボベンゾキシグリシン (Carbobenzyglycine) の合成



1. 所要試薬

グリシン, カルボベンゾキシクロライド, 苛性ソーダ

グリシンは田辺製薬より入手した。カルボベンゾキシクロライドはホスゲンの発生装置がなかったので市販 (東京化成 K.K.) のトルエン溶液 (30% 溶液) を求めトルエンを除去して用いた。

2. 合成操作

300 ml 容ナスフラスコにグリシン 13.2 g (0.176 モル) を採り、之に 4 N 苛性ソーダ溶液 45 ml を加え溶解して氷水中で充分冷却 (0~2°C), 次に別に 0°C に予冷した 4 N 苛性ソーダ 9 ml, 次いでカルボベンゾキシクロライド 6 ml を順次加えてセロファンでカバーしたゴム栓で密栓して激しく振り混ぜた後す早く氷水中につけて冷却する。約 10 分後前

記操作同様同量の苛性ソーダ及びカルボベンゾキシクロライドを加えて強振し氷水中にて反応せしめる。この操作を後3回(計5回)繰返して反応を完結せしめる。60分後反応液(pH 6.7)を6N塩酸でpH 4.5~4.0にするとカルボベンゾキシグリシンが結晶して来るから之を一夜冷蔵庫中に静置し濾別する。

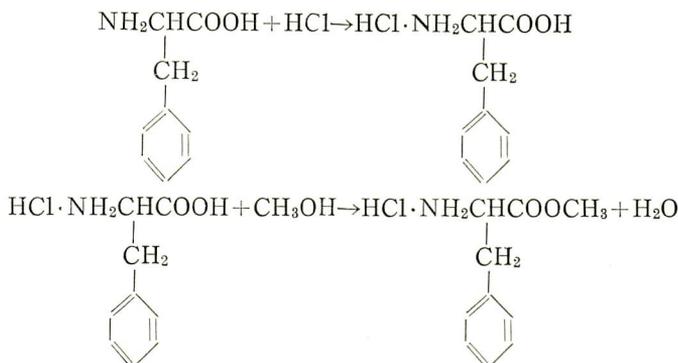
3. 再結晶

前記の粗結晶にクロロホルム 100 ml 加えて加温溶解せしめ、之を放冷すると結晶が得られる。m.p. 120°C.

4. 収量

32.0 g で収率 86.7 % であった。

B. L-フェニールアラニンメチルエステル塩酸塩(L-phenylalaninemethylester·HCl)の合成



1. 所要試薬

メチルアルコール(無水), L-フェニールアラニン

2. 合成操作

L-フェニールアラニン 40 g を無水メタノール 50 ml に懸濁し、之を氷-食塩の寒剤で冷却する。之に乾燥塩酸ガスを通じて飽和せしめる(12時間通気)、後エステル化を完結せしめるため約5時間逆流冷却器をつけて煮沸する。反応後減圧下でメタノール及び塩酸ガスを留去して濃縮すると結晶化の兆が見られるから之を放冷するとL-フェニールアラニンメチルエステル塩酸塩の針状結晶が折出する。

3. 再結晶

前記の粗結晶に 50 ml の酢酸エチルを加えて加温溶解し放冷して再結晶化せしめた。

4. 収量

43.0 g で収率 82.4 % であった。

5. L-フェニールアラニンメチルエステル塩酸塩より遊離エステルの調製

一般にアミノ酸の遊離エステルは相当するジケトピラジン又はポリマーに変化し易いので塩酸塩の形で保存し、ペプチドの合成時に次の如く処理して遊離エステルとした。即ちL-フェニールアラニンメチルエステル塩酸塩に乾燥アンモニアガスを飽和させたクロロホルム溶液を加えると塩化アンモンが生成して沈殿するから之を濾別する。後濾液を減圧してクロロホルムを留去すると油状のエステルが得られる(収率 70.0%)。

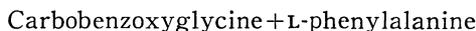
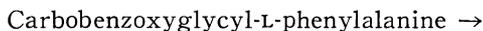
C. カルボベンゾキシグリシル-L-フェニールアラニン(Carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine)の合成

カルボベンゾキシグリシン 0.03 M 7.1 g, L-フェニールアラニンメチルエステル 0.05 M 10.5 g, ジシクロヘキシルカルボジイミド 0.04 M 8.25 g を夫々ジオキサン 30 ml, 15 ml, 10 ml に溶解しその順に加えてよく混合すると5分で明らかに反応が認められ尿素誘導体が析出し始める。之を室温に一夜放置し、後氷酢酸 0.5 ml を加えて更に1時間放置してから不溶物を濾別する。得られた濾液(ジオキサン溶液)を蒸させた後酢酸エチルを加えてペプチドエステルを溶解する。この酢酸エチル溶液を分液漏斗に移し、蒸留水, 1 N 塩酸, 4% 重炭酸ソーダ溶液, 更に蒸留水の順でよく洗滌して末反応の L-フェニールアラニンメチルエステル及びカルボベンゾキシグリシンを除去する。この酢酸エチル溶液を減圧して酢酸エチルを留去すると油状のカルボベンゾキシグリシル-L-フェニールアラニンメチルエステルが得られる。之にメタノール 50 ml を加えてエステルを溶解してから 2 N 炭酸ソーダ溶液 50 ml を加えてよく混和し、室温で1時間放置してエステルを鹼化する。後減圧蒸留して大部分のメタノールを留去して 6 N 塩酸を加えて pH を 5.0 に調節するとカルボベンゾキシグリシル-L-フェニールアラニンの結晶が析出する。この粗結晶を再び酢酸エチルで加温溶解して熱時濾過し、濾液を室温で徐々に冷却すると結晶化する。m.p. 125~126°C. 尚収率は 75.0% であった。

II. サバ幽門垂 CPase による Carbobenzyglycyl-L-phenylalanine の水解機構

CPase A の典型的基質である Carbobenzyglycyl-L-phenylalanine に対するサバ幽門垂 CPase の作用機構をペーパークロマトグラフィーを用いて分解生成物を同定することにより検討した。即ち Casobenzyglycyl-L-phenylalanine の 6 N 塩酸加水分解物と酵素分解物を東洋濾紙 No. 51 を用い、n-ブタノール・氷酢酸・水 (4:1:1) を展開溶媒として上昇法により 15 cm 展開した後、溶媒を完全に風乾除去して 2.5% ニンヒドリン-水飽和ブタノール溶液を噴霧して加熱発色せしめた。同時に展開したグリシン及び L-フェニールアラニンの spot と比較同定した。Fig. 15 はその結果を示す。図より明らかなように 6 N 塩酸加水分解区分では Rf 値よりグリシン並びに L-フェニールアラニンが生成していることが認められたが、酵素分解区分ではニンヒドリン呈色値が作用時間5時間で最高値に達して、更に12時間あるいは24時間作用させても L-フェニールアラニンの spot のみが検出され、グリシンの spot は全く認められなかった。又当然のことではあるが Carbobenzyglycyl-L-phenylalanine はニンヒドリンにより呈色せず従って用いたこの基質は遊離のグリシン又は L-フェニールアラニンを含まない純品であることも併せて証明された。

以上の実験事実からこの酵素は Carbobenzyglycyl-L-phenylalanine に作用して



の如くカルボキシル末端アミノ酸のみを加水分解し L-フェニールアラニンを遊離せしめるが Carbobenzyglycine に対しては全く作用しないことが明らかとなりその点では牛脾臓 CPase に類似の性質を示した。

III. 基質特異性

CPase に関連する基質を 0.1 M ベロナール緩衝液 (pH 8.0) に溶解して 0.04 M 濃度として用いた。即ち 0.04 M 基質溶液 1 ml に酵素溶液 (0.00165 mg-N/ml) 1 ml を加えて 10 分間反応せしめ 0.44 MTCA 溶液 1 ml を加えて反応を停止して酵素作用により遊

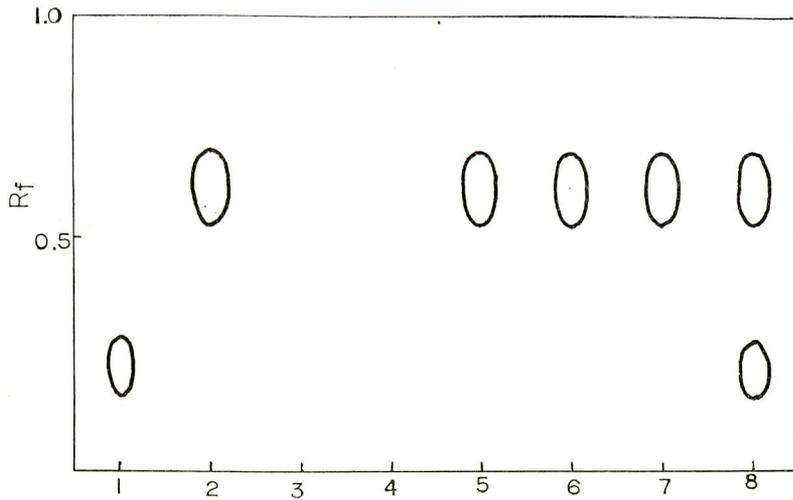


Fig. 15. Paper chromatogram of the reaction-products resulting from the incubation of carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine with mackerel CPase.

- 1: Glycine.
- 2: L-Phenylalanine.
- 3: Mackerel CPase control.
- 4: Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine.
- 5: Reaction products after 5 hours of incubation with mackerel CPase at 37°C.
- 6: Reaction products after 12 hours of incubation with mackerel CPase at 37°C.
- 7: Reaction products after 24 hours of incubation with mackerel CPase at 37°C.
- 8: Hydrolyzate of carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine with 6N HCl at 110°C for 20 hours.

Solvent system: BuOH: AcOH: H₂O=4:1:1.

Detection: 2.5% ninhydrin in n-BuOH saturated with water was sprayed.

Table 6. The action of mackerel CPase on various types of substrates (37°C).

Substrate	Relative rate
Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine	10,000
Chloroacetyl-L-phenylalanine	4,470
Chloroacetyl-DL-phenylalanine	4,470
Chloroacetyl-L-tyrosine	3,820
Carbobenzoxy-glycyl-L-leucine	5,600
Chloroacetyl-glycyl-L-leucine	2,200
Acetyl-DL-tryptophan	102
Chloroacetyl-DL-methionine	134
Acetyl-DL-methionine	0.5
Chloroacetyl-L-glutamic acid	7.9
ϵ -Benzoyl- α -acetyl-DL-lysine	1.5
Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanineamide	0
Glycyl-L-leucine	0
Glycyl-glycine	0

The relative rates were compared with the standard value of 10,000 for Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine.

離したアミノ酸をニンヒドリン発色法により定量した。発色値はすべてロイシン当量として算出し比較した。基質の加水分解度は便宜上 Carbobenzoxylglycyl-L-phenylalanine の場合を 10,000 とした相対値で表わした。但し加水分解され難い基質は特に反応時間を適宜延長して分解度を測定した後単位時間に換算して表示した。結果は Table 6 に示す通りである。

こゝで特に注意すべき事はサバ幽門垂 CPase が芳香族アミノ酸及びロイシンのアシル誘導体をよく水解することであろう。又同一アミノ酸でもアシル基の相異により酵素による水解作用に著しい差違があることが認められた。例えば Chloroacetyl-DL-methionine は Acetyl-DL-methionine の凡そ 250 倍もの速さで不斉水解された。又 Carbobenzoxylglycyl-L-phenylalanine を速かに加水分解するが Carbobenzoxylglycyl-L-phenylalanineamide には全く作用しないことも明らかとなった。更に Carbobenzoxylglycyl-L-leucine を比較的速かに水解するが Glycyl-L-leucine には全く作用しないことも認められた。之等の実験事実からこの酵素の基質としてはカルボキシル基が遊離状に存在しアミノ基は遊離の状態でないことが必要で典型的な CPase の特異性を示すことが再確認された。

第 8 節 アミノ酸の光学分割

アミノ酸の光学分割における酵素法の優れている点はすでによく知られており、NEUBERG⁹¹⁾、GREENSTEIN ら⁹²⁾の研究がある。

著者は前述のようにサバ幽門垂 CPase が Chloroacetyl-L-tyrosine に作用してそれと等モルの L-チロシンを遊離させることを確認したが、更に本酵素の Chloroacetyl-DL-phenylalanine に対する作用を明らかにする目的から次のような検討を行なった。即ち 0.1 M Chloroacetyl-DL-phenylalanine 溶液 (pH 8.0) 1 ml に酵素液 (0.017 mg-N/ml) 1 ml を加えて 37°C で反応させその分解度を確めた。

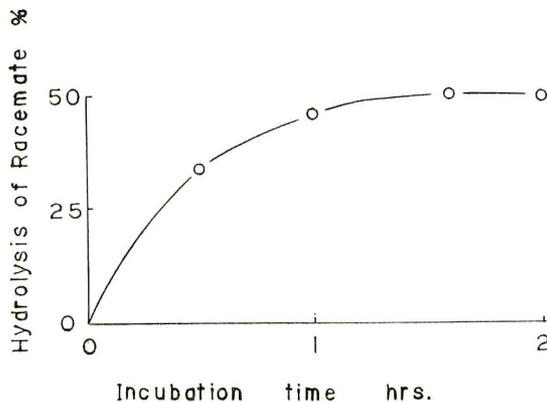
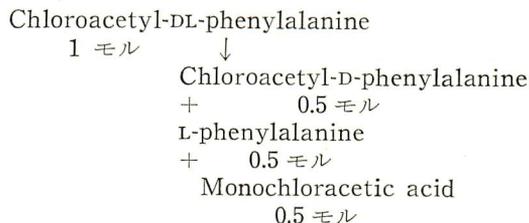


Fig. 16. Asymmetric hydrolysis of chloroacetyl-DL-phenylalanine by mackerel CPase.

The reaction was made at pH 8.0 and 37°C. The reaction mixture was composed of equal volumes of 0.1 M chloroacetyl-DL-phenylalanine in 0.1 M veronal buffer and enzyme solution (0.017 mg.-N/ml.).

その結果は Fig. 16 の通りであり、約 60 分で不斉水解が行われ分解量はその後増加しなかった。このことから本酵素は Chloroacetyl-DL-phenylalanine に作用して



の如く 1 モルの Chloroacetyl-DL-phenylalanine より 0.5 モルの L-フェニールアラニン を遊離させるものであることを認めた。尚この際遊離したフェニールアラニンが L-系であることは別に行なった実験で本酵素が Chloroacetyl-L-phenylalanine に作用して之を完全に水解してそれと等モルの L-フェニールアラニンを生成することから断定した。それ故に前述の基質特異性からも類推してサバ幽門垂 CPase は合成 (DL) アミノ酸のうち特に L-フェニールアラニン, チロシン, トリプトファン, ロイシン等より夫々に対応する光学的活性な L-アミノ酸を得るのに役立つものと思う。

第9節 小 括

DEAE-セルローズカラムを用いて製精し超遠心的には均一と認められた酵素にきつその酵素化学的性質を調べた。

I. pH 8.0 において酵素作用の温度依存性を検討し 35~40°C に作用の至適温度があることを認めた。

II. 37°C で酵素作用の pH 依存性を調べ至適 pH が 8.0 附近に存在することを確めた。

III. 酵素活性に及ぼす金属イオンの影響につき検討した。Ca⁺⁺ 及び Mg⁺⁺ は殆んど影響を与えないが、Mn⁺⁺ 及び Zn⁺⁺ は何れも活性を 50% 前後阻害することが認められた。一方 Co⁺⁺ を添加したものは著しく活性が増加し無添加の夫の 5 倍強を示した。

IV. このように Co⁺⁺ 添加によって酵素活性の増加することにつき種々検討した結果、Co⁺⁺ と酵素とを Preincubate すると時間と共に活性が増加し 15 分で最高値に達しその後は増加しないことがわかった。それ故この際の活性の増大は Co⁺⁺-CPase (複合体) を形成することに因るものであると考えられる。

V. Co⁺⁺-CPase の形成に対する温度の影響を調べた結果、18.5°C~50°C では温度の高い程酵素活性は幾分低かった。それ故 Co⁺⁺-CPase 形成には出来るだけ温和な条件を与える必要があると考えられた。

VI. 0°C で EDTA 処理すると、変性することなしにゆっくりと失活させることが出来た。このようにして得られた活性のない酵素液から EDTA を透析処理して除いてから、酵素溶液と等容の Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Zn⁺⁺, Co⁺⁺ (何れも塩化物) の各 0.01 M 溶液を加えて 6~8°C にて 12 時間保存して後活性を測定して之等金属イオンによる酵素の活性回復効果を検討した。Co⁺⁺ は intact な酵素の活性の 3.7 倍, Mg⁺⁺ は 0.95 倍, Ca⁺⁺ は 1.1 倍となり明らかに活性を回復することが認められた。Zn⁺⁺ は復活効果を示さなかったがこの点は従来 of 牛膀胱 CPase と異なっている。

VII. 次にサバ幽門垂 CPase の基質特異性につき検討した。先づ Carbobenzoyl-glycyl-L-phenylalanine を基質とする時は L-フェニールアラニンを遊離するが Carbobenzoylglycine に対しては全く作用しないことをペーパークロマトグラフィーにより確

認し、次いで各種の合成基質について求めた酵素の基質分解度を Carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine に対して比較した。しかしてこの酵素は芳香族アミノ酸、ロイシンのアシル誘導体をよく水解した。又 Carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine を速かに加水分解するが Carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanineamide には殆んど全く作用せず、他方 Carbobenzoxyglycyl-L-leucine を比較的速やかに水解するが Glycyl-L-leucine には全く作用しなかった。以上のことからこの酵素の基質としてはカルボキシル基が遊離状に存在しアミノ基は遊離していないことが必要で、典型的な CPase の特異性と同一ような性質を示すことが確認された。

VIII. 尚この酵素は Chloroacetyl-DL-phenylalanine から L-フェニールアラニンのみを分割離脱させ、従ってアミノ酸の光学的分割にも利用出来ることを確かめた。

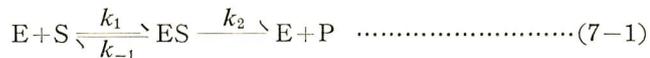
第7章 サバ幽門垂 CPase の Co イオンによる活性化機構に関する反応速度論的解析

酵素反応機作の解明のための方法論としての反応速度論的検討は、酵素反応の速度に及ぼす種々の因子の影響の知見から定量的な取扱いを経てその反応機作を推定するもので酵素の研究上極めて重要な事項である。

サバ幽門垂 CPase はそれ自身活性を有するが、之に Co^{++} を加えて Pircubate すると活性が著しく増加することは既に述べた通りである。こゝにこの酵素の活性化における Co^{++} の役割を明らかにするため反応速度論的検討を行ない、得られた諸定数から Co^{++} による活性化機構の解明を試みた。

第1節 Michaelis 定数 (K_m) の決定法

酵素反応速度と基質濃度との関係を定量的に取扱ったのは MICHAELIS と MENTEN⁹³⁾ であり、続いて VANSLYKE と CULLEN⁹⁴⁾ によって検討された。同氏等によると、一般に酵素 E と基質 S とが一旦 ES なる酵素-基質複合体を経て生成物 P となり酵素が遊離再成するとされている。即ち



なる模式が与えられる。こゝに k は夫々の過程の速度定数である。

上の模式に従って反応の定常状態 ($d[ES]/dt=0$ なる状態) においては基質濃度が $[S]$ なるときの反応速度 v とするとき質量作用の法則に従って

$$v = \frac{k_2[E][S]}{K_m + [S]} \quad \dots\dots\dots(7-2)$$

なる関係式が導かれる。

(7-2) 式は Michaelis-Menten-Briggs-Haldane^{93),95)} の式といひ、 K_m を Michaelis 定数と言う。 K_m は $(k_{-1}+k_2)/k_1$ なる内容のものがあるが、 $k_{-1} \gg k_2$ なるときに限り $K_m = k_{-1}/k_1$ となり ES の解離定数 (K_s) に一致する。 $[S]$ が充分大きく酵素がすべて ES の形になっているとき反応速度は最大となり、最大速度を V とするとき

$$V = k_2[E] \quad \dots\dots\dots(7-3)$$

で与えられ、反応速度 v と基質濃度 $[S]$ との関係は次の (7-4) 式で表わされる。

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S]} \quad \dots\dots\dots(7-4)$$

すなわち

$$K_m = [S] \left(\frac{V}{v} - 1 \right) \dots\dots\dots (7-5)$$

となる。\$K_m\$ と \$V\$ は一定であり、この方程式は直交双曲線を表わし実験的に観察される二面的曲線の形である。従って之から \$K_m\$ 及び \$V\$ を求めることは煩雑であり困難であるから、次の如く(7-5)式を変形して \$v\$ と \$[S]\$ の関係をプロットすることによって求めた。(7-5)式を変形すると

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V} \dots\dots\dots (7-6)$$

となり、\$1/v\$ を \$1/[S]\$ に対してプロット (Lineweaver-Burk Plot⁹⁶⁾) すると直線が得られ、直線の勾配は \$K_m/V\$ に相当し両軸上の截片がそれぞれ \$1/V\$ 及び \$-1/K_m\$ に相当するので之から \$K_m\$ と \$V\$ とを求めた。

又 (7-5) 式を次のように変形することも出来る。

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{1}{V} [S] \dots\dots\dots (7-7)$$

これより \$[S]/v\$ を \$[S]\$ に対してプロット (Hofstee plot⁹⁷⁾) すると同じく直線が得られ、直線の勾配は \$1/V\$ で両軸上の截片は \$K_m/V\$ 及び \$-K_m\$ に相当するので之から \$K_m\$ と \$V\$ とを求めた。

更に又 (7-5) 式を次のように変形することも出来る。

$$v = V - K_m \frac{v}{[S]} \dots\dots\dots (7-8)$$

之より \$v\$ を \$v/[S]\$ に対してプロット (Augustinsson plot^{98,99)}) すると同様直線が得られ、直線の勾配は \$-K_m\$ となり両軸の截片は夫々 \$V\$ 及び \$V/K_m\$ に相当するので之から \$K_m\$ と \$V\$ を求めた。

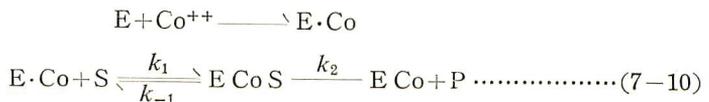
第2節 酵素反応を解析するための酵素と基質の親和性に関する諸定数の算出法^{100,101,102)}

酵素反応は Michaelis の模式 (7-1) で説明出来る。しかして Michaelis 複合体 (ES-complex) には熱力学的にみて活性化された状態が含まれていないが、実際には反応の進行には complex の活性化が必要である。即ち酵素Eと基質Sの結合によって ES-complex が形成される過程において中間活性複合体 (transitory activated complex) ES* を経ることが必要で次に示す模式を考える必要がある。



このような酵素反応過程において各段階の間に中間活性状態が存在することは想像されるところであるが之等についての具体的な定数を算定することは極めて困難である。

著者はサバ幽門垂 CPase について \$Co^{++}\$-CPase が如何なる反応定数を示し、又これがどのような意義を有するかを \$Co^{++}\$ を添加しない CPase の反応定数と比較することにより知るのが目的であるから、次のように反応が進むものとして \$k\$ 値を算出した。即ち



(7-10) 式についての解離定数 (\$K_s = k_{-1}/k_1\$) は

$$K_s = [S] \left(\frac{V}{v} - 1 \right) \dots\dots\dots(7-11)$$

より算出でき、全反応速度定数 k は

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]_t} \dots\dots\dots(7-12)$$

より求められる。

こゝに t = 反応時間 (min), $[S]_0 = S$ の初濃度
 $[P]_t$ = 時間 t における反応生成物の濃度

である。

又夫々の過程の速度定数は、 $V = k_2[E]$(7-3) を変形して

$$k_2 = \frac{V}{[E]} \dots\dots\dots(7-13)$$

より k_2 を、 $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_s + \frac{k_2}{k_1}$ を変形して

$$k_1 = \frac{k_2}{K_m - K_s} \dots\dots\dots(7-14)$$

より k_1 を、又 $K_s = k_{-1}/k_1$ を変形して

$$k_{-1} = K_s \cdot k_1 \dots\dots\dots(7-15)$$

より k_{-1} を夫々求めた。

第3節 見かけの活性化エネルギーの算出法^{103),104),105),106)}

サバ幽門垂 CPase の Co^{++} による活性化機構を明らかにする目的から、CPase と Co^{++} -CPase の活性化エネルギーを次の如くして求めた。

酵素反応は一般に温度によって著しく影響を受け、ある温度までは温度の上昇と共に反応速度が増大するがそれ以上に温度をあげると逆に反応の速度が低下する。之は酵素蛋白質が熱変性を受けて不活性化されるためであり、この失活は反応至適温度に達する前に既に始まっていると考えられる。このような反応速度定数 k の絶対温度 T による変化は

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_A}{RT^2} \dots\dots\dots(7-16)$$

で表わしうることを **ARRHENIUS**¹⁰⁷⁾ によって示された。 $d \ln k / dT$ は $1/k (dk/dT)$ で之は速度定数の温度係数を示している。

こゝでは E_A は常に正值 (吸熱) であって、この E_A は Arrhenius の活性化エネルギー (見かけの活性化エネルギー) と呼ばれる。(7-16) 式を積分して

$$\ln k = -\frac{E_A}{RT} + \ln A \dots\dots\dots(7-17)$$

が得られる。こゝで $\ln A$ は積分定数である。之から

$$\log k = -\frac{E_A}{2.303RT} + \log A \dots\dots\dots(7-18)$$

を導き、 $\log k$ (作図上 $\log V$ に代えてもよい) を縦軸に、 $\frac{1}{T}$ を横軸にプロットする (Arrhenius plot) と直線となり、この直線の勾配は $-E_A/2.303R$ であるから、之から E_A (Cal/mole) を求めることが出来る。

第4節 反応速度論的解析結果

I. K_m 及び V の決定

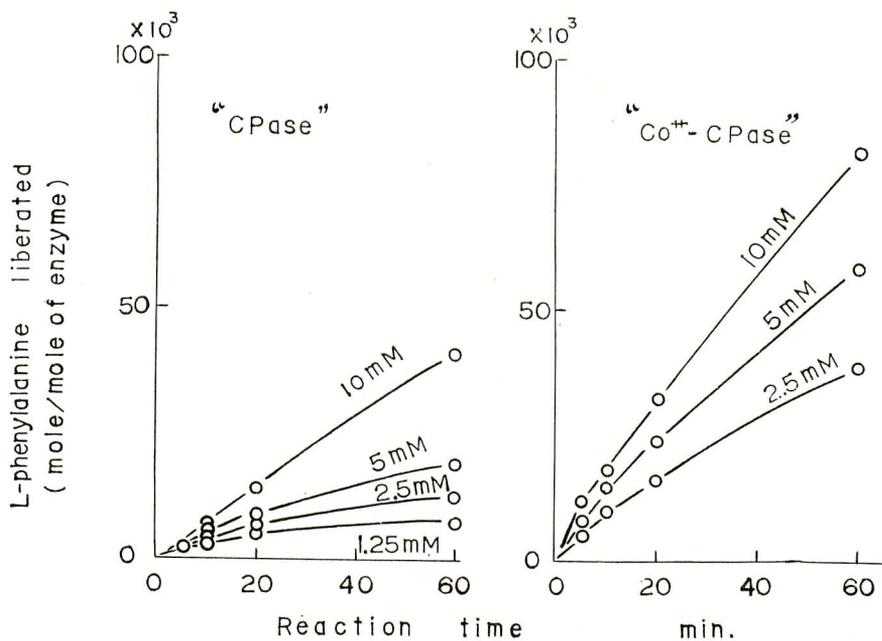


Fig. 17. The production of L-phenylalanine by mackerel CPase as a function of the reaction time in various initial concentrations of carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine.

The reactions were performed at 37°C, pH 8.0.

“CPase”: intact mackerel CPase. “Co⁺⁺-CPase”: cobalt-activated mackerel CPase.

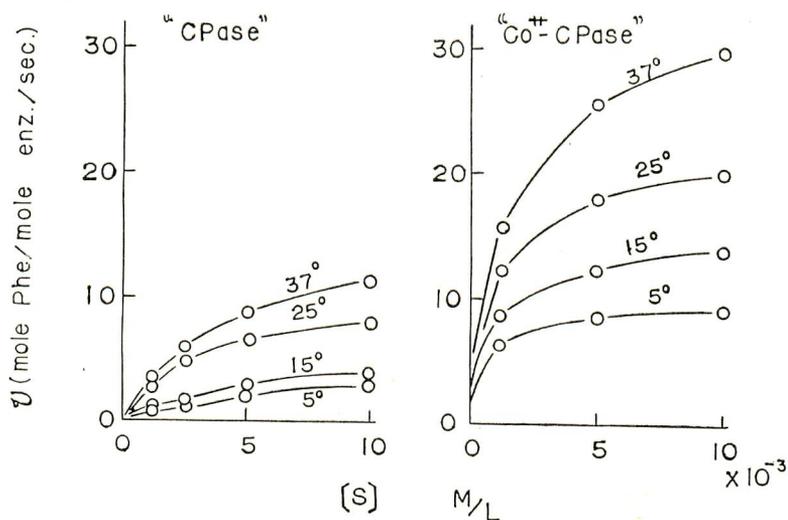


Fig. 18. The reaction velocity of mackerel CPase as a function of the substrate concentrations in the case of the hydrolysis of carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine at various temperatures.

“CPase”: intact mackerel CPase. “Co⁺⁺-CPase”: cobalt-activated mackerel CPase.

pH 8.0 の種々濃度の Carbobenzoxy-L-phenylalanine 溶液を基質として 5°, 15°, 25°, 37°C の各温度においてサバ幽門垂 CPase (以下 “CPase” と記す) と Co⁺⁺ と Preincubate して Full active にしたサバ幽門垂 CPase (以下 Co⁺⁺-CPase” と記す) を作用させた。

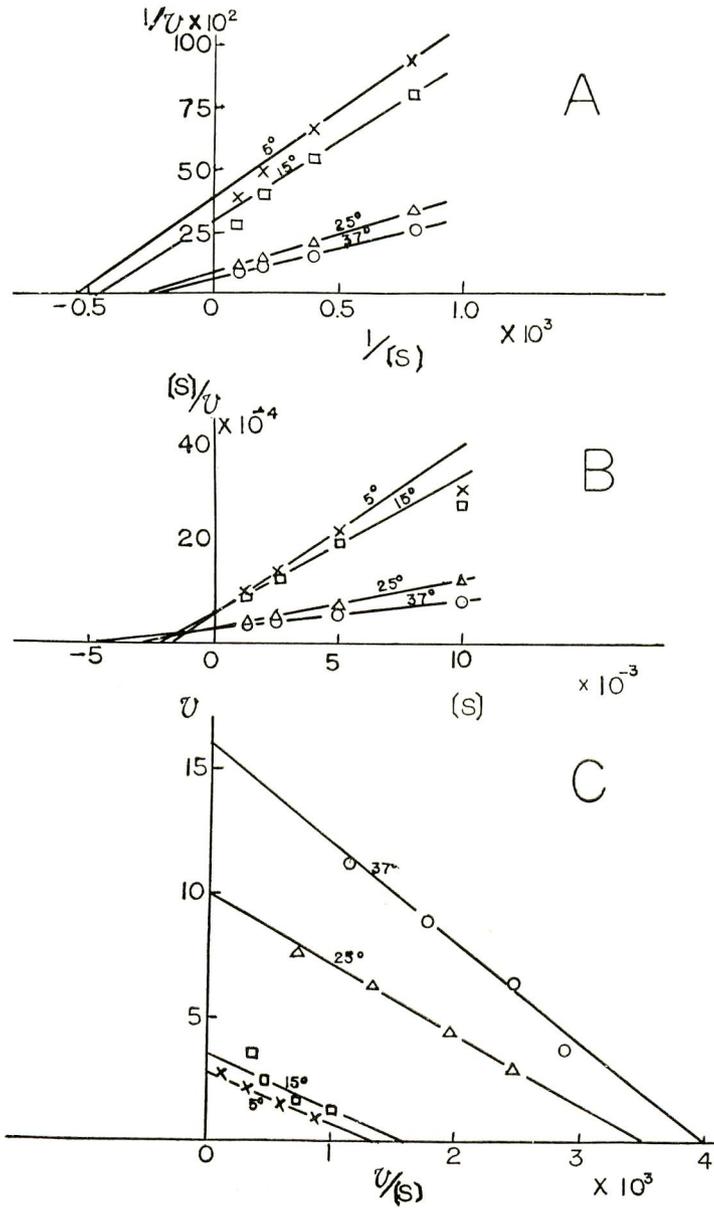


Fig. 19-a. Determinations of K_m and V values in the hydrolysis of carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine by mackerel CPase.

A: Lineweaver-Burk plot. B: Hofstee plot. C: Augustinsson plot.

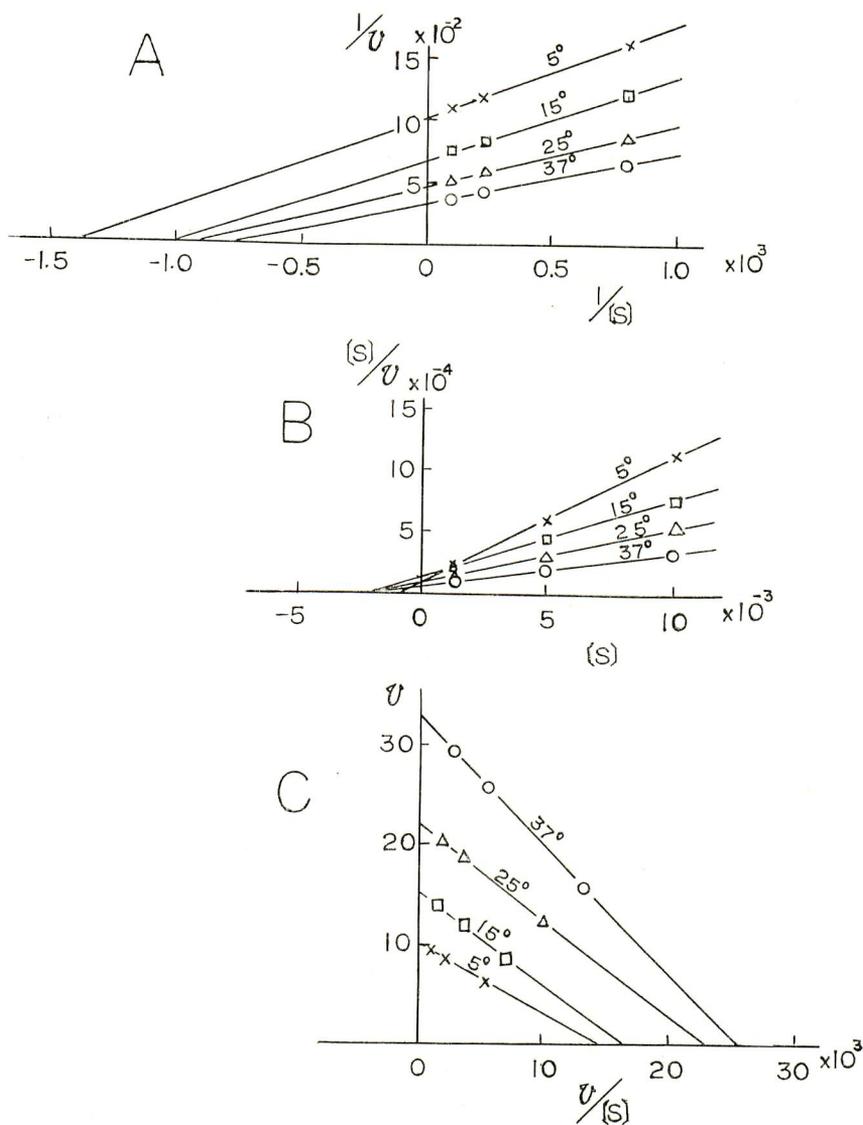


Fig. 19-b. Determinations of K_m and V values with carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine of cobalt-activated mackerel CPase.

A: Lineweaver-Burk plot. B: Hofstee plot. C: Augustinsson plot.

37°C における分解反応の経時変化を Fig. 17 に示す. 又各温度における反応初速度 v と基質濃度 $[S]$ との関係を示す.

又同じように 3 種のプロットを Fig. 19 a, b に示す如く行なって “CPase” 及び “Co⁺⁺-CPase” による反応の K_m 及び V を求めた.

その結果を Table 7 に示す.

II. 反応速度及び酵素と基質との親和性に間する諸定数の決定

各温度における “CPase” 及び “Co⁺⁺-CPase” につき夫々の k_1 , k_{-1} , k_2 及び K_s 並

Table 7. K_m and V values of mackerel CPase measured on the hydrolysis of Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine at various temperatures.

Temperature (°C)	"CPase"		"Co ⁺⁺ -CPase"	
	$K_m \times 10^3$ (mole/l.)	V (mole of Phe./mole enz./sec.)	$K_m \times 10^3$ (mole/l.)	V (mole of Phe./mole enz./sec.)
5	1.85	2.57	0.72	10.09
15	2.11	4.95	0.97	15.05
25	2.85	10.09	1.01	21.82
37	4.19	16.18	1.38	32.48

"CPase": intact mackerel CPase. "Co⁺⁺-CPase": cobalt-activated mackerel CPase.

Table 8. The summary of kinetic constants in the hydrolysis of carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine by mackerel CPase (intact and cobalt-activated) at various temperatures (pH 8.0).

	Temperature °C	$k_1 \times 10^{-10}$ (mole/l.) ⁻¹ (1/sec.)	$k^{-1} \times 10^{-7}$ (1/sec.)	$k_2 \times 10^{-5}$ (1/sec.)	$K_s \times 10^3$ (mole/l.)	$K_A \times 10^{-3}$ (mole/l.)
"CPase"	5	0.06	0.08	2.84	1.37	0.73
	15	0.19	0.36	5.47	1.83	0.55
	25	0.59	1.56	11.17	2.66	0.38
	37	1.02	4.11	17.92	4.01	0.25
"Co ⁺⁺ -CPase"	5	5.1	3.10	55.82	0.61	1.64
	15	13.9	12.61	83.14	0.91	1.10
	25	40.2	39.43	120.55	0.98	1.02
	37	89.8	122.1	179.45	1.36	0.73

"CPase": intact mackerel CPase. "Co⁺⁺-CPase": cobalt activated mackerel CPase.

びに K_A の値を算定した結果を Table 8 に示す。

III. 見かけの活性化エネルギー E_A の決定 (Arrhenius plot)

Table 7 に示した "CPase" 及び "Co⁺⁺-CPase" による各温度における Carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine の加水分解反応の V を用い, $\log V$ と $1/T$ に関し Arrhenius plot を行なった結果を Fig. 20 に示す. 図に示すように反応温度 5~37°C の範囲内では直線が得られ, その勾配より "CPase" の $E_A=10.87$ K Cal/mole, "Co⁺⁺-CPase" の $E_A=6.34$ K Cal/mole が求められた. これでは明らかなように "Co⁺⁺-CPase" の E_A は "CPase" の 1/2 程度である.

第5節 小括並びに考察

サバ幽門垂 CPase が Co⁺⁺ によって活性化され基質の分解作用を促進することは前述の通りであるが, その際における反応機序を解明するため精製酵素を用いて反応速度論的に検討した. 即ち酵素-基質反応の一般的な模式



において Co⁺⁺ がどのように反応系に関与して来るかを求めるため Michaelis 定数 K_m , 反応最大速度 V , 反応速度定数 k_1 , k_{-1} , k_2 及び ES-complex の解離定数 K_s , ES complex

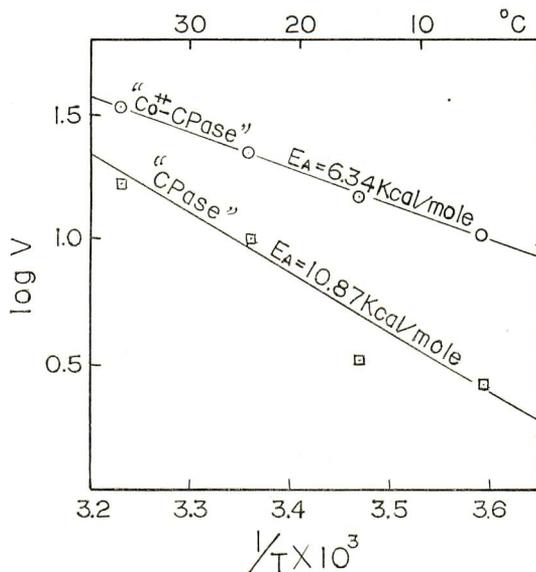


Fig. 20. Arrhenius diagrams of mackerel CPase drawn on the hydrolysis of carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine.

"CPase": intact mackerel CPase. "Co⁺⁺-CPase": cobalt-activated mackerel CPase.

の親和定数 K_A 並びに Arrhenius の活性化エネルギー E_A を測定し、それ等の数値間に次の関係があることを認めた。即ち K_m に関しては "Co⁺⁺-CPase" が "CPase" の約 1/3 である。しかし V は例えば 37°C において "CPase" が 16.18, "Co⁺⁺-CPase" が 32.48 で "Co⁺⁺-CPase" が遙かに大きい。次に ES Complex 形成の速度定数 k_1 は反応温度の如何によらず "Co⁺⁺-CPase" は "CPase" の 90 倍を示していた。しかし反面 ES complex から E+S へ解離する反応定数 k_{-1} もまた大きいがこの場合は 30 倍前後である。

これ等の事実は "Co⁺⁺CPase" に於いては ES complex 形成の平衡が ES complex 側に移行していることを示すものである。次に k_2 も "Co⁺⁺-CPase" の場合は "CPase" の 10~15 倍であり ES から P への分解が速やかに起ることを示している。以上の事実は反応が容易に起るため、活性化エネルギーが "Co⁺⁺-CPase" で小さいという事実と一致している。

K_m が "Co⁺⁺-CPase" において小さい理由として次の事が考えられる。即ち Co⁺⁺ は CPase と結合して ES-complex の生成を促進し、 K_A が大きいから比較的安定な ES complex が速かに形成されることになる。 K_s が "CPase" の約 1/3 で小さく、 k_1/k_2 も亦小さいことが "CPase" に比し "Co⁺⁺-CPase" が小さい $K_m \{ (k_{-1} + k_2) / k_1 \}$ 値を支える原因となる。以上のことから Co⁺⁺ は触媒反応が最も容易に進行するために必要な酵素の活性中心の構造を形成するのに役立つ、その結果 ES-complex 形成及び ES complex から Product への移行を促進するものと考えられる。

第8章 総括

生体内で営まれる生化学的反應はすべて有機触媒である酵素によって支配されていて、生

体細胞内での基本的な生化学反応は高等動物から下等な微生物に至るまで同じ反応であり同じ酵素によって触媒されている。

しかし乍ら酵素の触媒作用が同じであってもその存在する場所、起源によってそれぞれの特異性には多少の差異があることも指摘されており、その原因が蛋白質構造の相違ひいてはその物理化学的性質の相違に帰せられている。水産物は特殊な生活環境に棲息しているからその酵素も亦陸上高等動物に比し或る程度相違することが推定される。

著者はこのような比較生化学的見地に立って魚類の酵素—サバ幽門垂 CPase—に関する研究を行ない次の諸点を明らかにした。

I. サバ幽門垂を 10% 食塩水で抽出し、之を流水透析すると比較的多量の蛋白質が沈殿してくるがこの蛋白質は 5% 食塩溶液に容易に溶解した。よって之について合成基質を用いて主としてプロテアーゼ活性につき種々検討したところ Chloroacetyl-L-tyrosine に作用して L-チロシンを遊離生成し、又 Chloroacetyl-DL-phenylalanine を不斉水解して L-フェニールアラニンのみを生成する酵素活性を認めた。尚後述するような基質特異性を有することからこの沈殿蛋白中には CPase を含むことを確認し、之をサバ幽門垂 CPase として取扱った。

II. サバ幽門垂 CPase の酵素化学的性質を明らかにすると共に酵素蛋白質の物理化学的性質を検討するためにその精製を試めた。先づサバ幽門垂組織より 10% 食塩水で抽出し之を流水透析すると CPase を含む蛋白質等が沈殿として得られる。この操作のみでも他の共存する蛋白質と分離され従って或る程度精製される。幽門垂 2 kg から 83.5 mg の粗酵素が得られた。この粗酵素標品につき澱粉—セライト混合物を支持体とした縦型カラムを用いて Zone electrophoresis を行ったが、尚他の蛋白質成分の混在が認められた。次にこの粗酵素につき分子中の金属が除去されないようにアニオン交換体 DEAE セルローズと 0.02 M トリス緩衝液を用いてクロマトグラフィーを行い活性の強い区分を得た。この区分につき再クロマトグラフィーを行なった結果この成分は均一であると考えられた。この際試料粗酵素の比活性は 58.5 unit, カラムで精製した区分の夫は 254 unit を示した。尚サバ CPase のクロマトグラフィーと関連して牛膵臓 CPase のクロマトグラフィーも同時に検討した結果 Fig. 8 に示すように溶出像を異にし従って両者は蛋白質として明らかに異なるものである事が判明した。

こうして得られた精製 CPase 区分につき超遠心測定を試みたがその沈降像からも単一成分のように考えられた。

尚この精製酵素の沈降速度法によって算出された沈降定数 st は 3.25×10^{-13} であり又沈降平衡法によって算出された分子量は 23,500 であった。牛膵臓 CPase の分子量 34,000 に比べると遙かに小さい値を与えた。

III. DEAE—セルローズを用いて精製し超遠心的には均一と認められた酵素試料につきその酵素化学的諸性質を調べた。

酵素作用の至適温度は 35~40°C にあり又至適 pH は 8.0 附近に存在した。

酵素活性に及ぼす金属イオンの影響につき検討した結果、 Ca^{++} , Mg^{++} は殆んど影響を与えないが、 Mn^{++} , Zn^{++} は何れも活性を 50% 前後阻害することがわかった。特に Co^{++} は著しく酵素活性を増大せしめ無添加の夫の 5 倍強を示した。

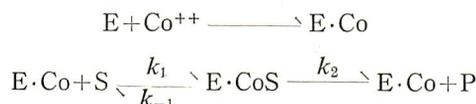
しかして Co^{++} による酵素活性の増加は“ Co^{++} -CPase”複合体を形成することに因る

ものであることを確認した。“Co⁺⁺-CPase”の形成は Preincubate する温度により異なり、18.5~50°C では温度の高い程生じた酵素(“Co⁺⁺-CPase”)の活性は低下する傾向が見られた。従って“Co⁺⁺-CPase”の形成には出来るだけ温和な条件を与える必要があることを認めた。

酵素を 0°C において EDTA で処理すると変性することなしに徐々に失活させることが出来る。こうして得られた活性のない酵素液から EDTA を透析して除去したものに Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Zn⁺⁺ 及び Co⁺⁺ を加えて 6~8°C で一夜放置すると酵素活性が回復され、Co⁺⁺ では intact な酵素活性の 3.7 倍, Mg⁺⁺ は 0.95 倍 Ca⁺⁺ は 1.1 倍に復活した。Zn⁺⁺ は活性回復効果を示さなかったがこの点は従来の牛豚臓 CPase と異なっている。

次にこの酵素の基質特異性につき検討した結果、芳香族アミノ酸及びロイシンのアシル誘導体をよく水解することが認められた。又 Carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine は速やかに加水分解するが Carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanineamide には全く作用せず、他方 Carbobenzoxyglycyl-L-leucine を比較的速やかに水解するが Glycyl-L-leucine には全く作用しなかった。従ってこの酵素の基質としてはカルボキシル基が遊離状に存在しアミノ基は遊離の状態でないことが必要で典型的な CPase A 特異性と同一性質を示すことが再確認された。尚この酵素は Chloroacetyl-DL-phenylalanine から L-フェニルアラニンのみを分割離脱させるアミノ酸の光学分割にも利用出来ることを確めた。

IV. サバ幽門垂 CPase が Co⁺⁺ と Preincubate することにより著しく活性化することの機作を解明するため反応速度論的な検討を行なった。即ち酵素-基質反応の一般的な模式



において Co⁺⁺ がどのように反応系に関与して来るかを明らかにするため、Michaelis 定数 K_m , 最大反応速度 V , 反応速度定数 k_1 , k_{-1} , k_2 及び ES complex の解離定数 K_s ($=k_{-1}/k_1$), ES complex の親和定数 $K_A(1/K_s)$ 並に Arrhenius の活性化エネルギー E_A を測定し、之等数値間の関係から Co⁺⁺ による酵素の活性化機構を次の如く推論した。即ち Co⁺⁺-CPase に於いて K_m が小さいこと及び V が大きく活性化エネルギーが小さいことから考えると、Co⁺⁺ は CPase と結合して Co⁺⁺-CPase となり、この Co⁺⁺-CPase が基質と結合して所謂 ES complex を形成するが、この際の平衡は ES complex 側にづれ容易に従って速やかに ES complex が形成され同時に ES から P への分解も促進されるのである。これ等の因子は大きな V を支える原因となると考えられる。以上のことから Co⁺⁺ は CPase に直接結合して触媒作用に最適な活性中心構造を形成して、安定な ES complex の形成を容易にするため活性化エネルギーは低下し、分解物の生成を促進することによって触媒反応全体の速度を増加するものであると考えられた。

参 考 文 献

- 1) 福田博業 (1958): 日水誌, **23**, 547.
- 2) 福田博業 (1958): 日水誌, **23**, 551.
- 3) 福田博業 (1958): 日水誌, **23**, 631.
- 4) 福田博業 (1958): 日水誌, **23**, 637.

- 5) 福田博業 (1958) : 日水誌, **24**, 24.
- 6) 藤井 実 (1955) : 農水講研報, **4**, 179.
- 7) 藤井 実 (1955) : 農水講研報, **4**, 183.
- 8) 藤井 実 (1955) : 農水講研報, **5**, 103.
- 9) 藤井 実 (1957) : 農水講研報, **6**, 323.
- 10) 藤井 実 (1957) : 農水講研報, **7**, 25.
- 11) 藤井 実 (1957) : 農水講研報, **7**, 27.
- 12) 北御門学・立野信光 (1960) : 日水誌, **26**, 679.
- 13) 北御門学・立野信光 (1960) : 日水誌, **26**, 685.
- 14) 北御門学・立野信光 (1960) : 日水誌, **26**, 691.
- 15) 高橋 喬 (1959) : 日水誌, **26**, 500.
- 16) 高橋 喬 (1959) : 日水誌, **26**, 504.
- 17) 大城善太郎・出口重遠 (1959) : 鹿大水産紀要, **7**, 181.
- 18) 大城善太郎・是枝 登 (1960) : 鹿大水産紀要, **8**, 56.
- 19) STER, J. A. and E. E. LOCKHART, (1953) : *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **10**, 590.
- 20) 大谷武夫・島田 清 (1923) : 水講, **19** (1).
- 21) 大谷武夫・畑中主計 (1927) : 水講, **22**, 352.
- 22) 町田佐一・増永一雄 (1933) : 日農化, **9**, 431.
- 23) 服部健三・塚元久雄 (1936) : 日本衛生学会誌, **8**, 1.
- 24) 山本 忠 (1938) : 養殖会誌, **8**, 5.
- 25) 柏田研一 (1953) : 日水誌, **18**, 151.
- 26) 柏田研一 (1955) : 日水誌, **21**, 494.
- 27) 柏田研一 (1955) : 日水誌, **21**, 498.
- 28) 柏田研一 (1958) : 日水誌, **23**, 656.
- 29) JOHNSTON, W. W. (1941) : *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **5**, 217.
- 30) 大谷武夫・島田 清 (1926) : 水講, **22**, 28.
- 31) 石田寿老 (1935) : 動物学雑誌, **47**, 717.
- 32) 谷 正二 (1940) : 日水誌, **9**, 121.
- 33) NORRIS, E. R. and D. E. ELAM (1940) : *J. Biol. Chem.*, **138**, 443.
- 34) NORRIS, E. R. and J. C. MATHIES (1953) : *J. Biol. Chem.*, **204**, 673.
- 35) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三 (1959) : 日水誌, **25**, 122; **25**, 409.
- 36) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・石川雅司 (1959) : 日水誌, **25**, 470.
- 37) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・栗谷川正光・田中秀雄 (1961) : 日水誌, **27**, 348.
- 38) 斎藤恒行・石原義雄 (1956) : 日農化, **30**, 426.
- 39) WALDSCHMIDT-LEITZ, E., W. GRASSMANN, and H. SCHLATER (1927) : *Ber.*, **60**, 1906.
- 40) WALDSCHMIDT-LEITZ, E. and A. PURR (1929) : *Ber.*, **62**, 2217.
- 41) ANSON, M. L. (1937) : *J. Gen. Physiol.*, **20**, 663.
- 42) GILBERT, J. B., V. E. PRICE, and J. P. GREENSTEIN (1949) : *J. Biol. Chem.*, **180**, 473.
- 43) FOLK, J. E. (1956) : *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 3541.
- 44) ANDO, T., T. TOBITA and M. YAMASAKI (1958) : *J. Biochem. (Japan)*, **45**, 285.
- 45) FOLK, J. E. and J. A. GLANDER (1958) : *J. Biol. Chem.*, **231**, 379, 393.
- 46) TIETZ, F. (1960) : *Arch. Biochem. Biophys.*, **87**, 73.
- 47) 水島三一郎・赤堀四郎 (1954) : “蛋白質化学” **2**, 171 (共立出版, 東京).
- 48) HARRIS, J. I., C. H. LI, P. G. CONDLIFFE and N. G. PON. (1954) : *J. Biol. Chem.*, **209**, 133.
- 49) ANFINSEN, C. B. and R. R. REDFIELD (1956) : *Advances in Prot. Chem.*, **11**, 1.
- 50) KALNITSRY, G. E. and E. E. ANDERSON (1960) : *Biochim. Biophys. Acta*, **37**, 389.
- 51) SMITH, E. L. (1948) : *J. Biol. Chem.*, **175**, 39.
- 52) SMITH, E. L. (1951) : *Advances in Enzymol.*, **12**, 191.
- 53) VALLEE, B. L. and H. NEURATH (1954) : *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 5006.
- 54) VALLEE, B. L. and H. NEURATH (1955) : *J. Biol. Chem.*, **217**, 253.
- 55) VALLEE, B. L., J. A. RUPLEY, T. L. COOMBS and H. NEURATH (1960) : *J. Biol. Chem.*, **235**, 64.
- 56) FOLK, J. E. and J. A. GLADNER (1960) : *J. Biol. Chem.*, **235**, 60.

- 57) COLEMAN, J. E. and B. L. VALLEE (1960): *J. Biol. Chem.*, **235**, 390.
- 58) RUPLEY, J. A. and H. NEURATH (1960): *J. Biol. Chem.*, **235**, 609.
- 59) 大城善太郎・赤堀四郎 (1957): 第30回日本生化学会総会(京都)講演.
- 60) HOFMANN, K. and M. BERGMANN (1940): *J. Biol. Chem.*, **134**, 225.
- 61) STAHMANN, M. A., J. S. FRUTON, and M. BERGMANN (1946): *J. Biol. Chem.*, **164**, 753.
- 62) NEURATH, H. and G. W. SCHWERT (1950): *Chem. Rev.*, **46**, 69.
- 63) YEMM, E. W. and E. C. COOKING (1955): *Analyst*, **80**, 209; (1954): *Biochem. J.*, 58 Xii.
- 64) MOORE, S. and W. H. STEIN (1954): *J. Biol. Chem.*, **211**, 907.
- 65) ANSON, M. L. (1935): *Science*, **81**, 467.
- 66) PUTNAM, F. W. and H. NEURATH (1946): *J. Biol. Chem.*, **166**, 603.
- 67) NEURATH, H., E. ELKINS, and S. KAUFMAN (1947): *J. Biol. Chem.*, **170**, 221.
- 68) SMITH, E. L., D. M. BROWN, and H. T. HANSON (1949): *J. Biol. Chem.*, **180**, 331.
- 69) LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL (1951): *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
- 70) LI, C. H. (1946): *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2746.
- 71) HIRS, C. H. W., W. H. STEIN and S. MOORE (1951): *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1893.
- 72) TALLAN, H. H. and W. H. STEIN (1953): *J. Biol. Chem.*, **200**, 507.
- 73) SOBER, H. A., F. L. GUTTER, M. M. WYCKOFF, and E. A. PETERSON (1956): *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 756.
- 74) KELLER, P. J., E. COHEN, and H. NEURATH (1958): *J. Biol. Chem.*, **230**, 905.
- 75) PETERSON, E. A. and H. A. SOBER (1956): *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 751.
- 76) NIELANDS, J. B. and P. K. STUMPF, (1955): "Outlines of Enzyme Chemistry", 34. (John Wiley and Sons Inc., New York).
- 77) SVEDBERG, T. and K. O. PEDERSEN (1940): "The Ultracentrifuge" (Clarendon Press, Oxford).
- 78) CECIL, R. and A. G. OGSTON (1948): *Biochem. J.*, **43**, 592.
- 79) ARCHIBALD, W. J. (1947): *J. phys. & Colloid chem.*, **51**, 1204.
- 80) PUTNAM, F. W. and H. NEURATH (1946): *J. Biol. Chem.*, **166**, 603.
- 81) SMITH, E. L., D. M. BROWN, and H. T. HANSON (1949): *J. Biol. Chem.*, **180**, 33.
- 82) SMITH, E. L. and A. STOCKELL (1954): *J. Biol. Chem.*, **207**, 501.
- 83) NEURATH, H. (1960): "The Enzymes", **4**, 11. (ed. P. D. BOYER, H. LARDY, K. MYRBÄCK) (New York & London).
- 84) SMITH, E. L. (1949): *Federation Proc.*, **8**, 581.
- 85) SMITH, E. L. (1948): *J. Biol. Chem.*, **176**, 21.
- 86) SMITH, E. L. (1951): "Adances in Enzymol.," **12**, 191.
- 87) SMITH, E. L. and D. H. SPACKMANN (1955): *J. Biol. Chem.*, **212**, 271.
- 88) SHEEHAN, J. C. and G. P. HESS (1955): *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1067.
- 89) SHEEHAN, J. C., M. GOODMAN, and G. P. HESS (1956): *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1367.
- 90) OKAWA, K. (1956): *Bull. Chem. Soc. Japan*, **29**, 486.
- 91) NEUBERG, C. and K. LINHARDT (1924): *Biochem. Z.*, **147**, 372.
- 92) PRICE, V. E. and J. P. GREENSTEIN (1948): *J. Biol. Chem.*, **175**, 969.
- 93) MICHAELIS, L. and M. L. MENTEN (1913): *Biochem. Z.*, **49**, 333.
- 94) VANSLYKE, D. D. and G. E. CULLEN (1914): *J. Biol. Chem.*, **19**, 141.
- 95) BRIGGS, G. E. and J. B. S. HALDANE (1925): *Biochem. J.*, **19**, 383.
- 96) LINEWEAVER, H. and D. BURK (1934): *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658.
- 97) HOFSTEE, B. H. (1952): *Science*, **116**, 329.
- 98) AUGUSTINSSON, K. B. (1948): *Acta Physiol. Scand.*, **15** Suppl. 52, (1949): *Arch. Biochem.*, **23**, 111.
- 99) AUGUSTINSSON, K. B. (1951): "The Enzymes" (J. B. SUMMER and K. MYRBÄCK eds.), **1**, 443. (Academic press, New York).
- 100) ALBERTY, R. A. (1959): "The Enzymes" (P. D. BOYER, H. LARDY, K. MYRBÄCK eds.), **1**, 143 (Academic Press New York).
- 101) DIXON, M. and E. C. WEBB (1958): "Enzymes", 155 (Longmans, Green and Co., London).

- 102) LAIDLER, K. J. (1957): "The Chemical Kinetics of Enzyme Action", 38. (Oxford University Press).
- 103) 高宮 篤 (1952): "酵素" (坂口謹一郎・朝井勇宣編), 23 (朝倉書店, 東京).
- 104) 高宮 篤 (1957): "酵素研究法" (赤堀四郎編), 242 (朝倉書店, 東京).
- 105) DIXON, M. and E. C. WEBB (1958): "Enzymes", 150. (Longmans, Green and Co., London).
- 106) 伊勢村寿三・中馬一雄 (1960): "生化学講座" (片桐英郎外 13名編) **1**, 265, (共立出版, 東京).
- 107) ARRHENIUS, S. (1889): *Z. Physik, Chem.*, **4**, 226, (1937): *Trans. Faraday Soc.*, **33**, 72.