

プロテアーゼのインスリン様活性 (第7報)
 プロナーゼから得た N-サクシニル-L-
 トリアラニン *p*-ニトロアニリド水解酵素
 の活性部位

植木 寛, 永好 昭*, 生野利子*, 船越崇行*,
 庄庄省三*, 久保田幸穂*

薬学雑誌 (YAKUGAKU ZASSHI), 103 (5), 538-543 (1983)

Insulin-like Activity of Protease. VII. Active Site of
 an *N*-Succinyl-L-trialanine *p*-Nitroanilide-hydrolyzing
 Protease obtained from Pronase

Hiroshi Ueki, Akira Nagayoshi*, Toshiko Shono*, Takayuki Funakoshi*,
 Shozo Shoji*, and Yukiho Kubota*

ABSTRACT The active site of an *N*-succinyl-L-trialanine *p*-nitroanilide-hydrolyzing protease purified from pronase E was investigated. When the enzyme was treated with [³H] diisopropyl phosphofluoridate, an active serine residue of the enzyme was modified, resulting in almost complete loss of the enzymatic activity. The amino acid sequence around the active serine residue (*) was Gly-Asp-Ser*-Gly-Gly. When a histidine residue in the enzyme molecule was destroyed by photooxidation in the presence of methylene blue, its activity decreased up to 15% of the original level. In this treatment, no change was observed either in tyrosine and methionine contents or in ultraviolet absorption spectra. The enzyme was also inactivated by glycine methyl ester in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide but not by *p*-bromophenacyl bromide. These findings suggest the possibility that serine, histidine, and aspartic or glutamic acid may be involved in the catalytic site of the enzyme to form the charge relay system.

抄録 プロナーゼEから精製したN-サクシニル-L-トリアラニン *p*-ニトロアニリド水解酵素の活性部位について検討した。本酵素を [³H] ジイソプロピルホスホロリデートで処理すると活性セリン残基が修飾され、酵素活性はほぼ完全に消失した。活性セリン近傍のアミノ酸配列は、Gly-Asp-Ser*-Gly-Glyであった。酵素中のヒスチジン残基はメチレンブルー存在下の光酸化によって破壊され、酵素活性はもとの15%に減少した。この処理では、チロシンやメチオニン含量やUV吸収スペクトルに変化は認められなかった。本酵素はまた1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロ

ロピル)カルボジイミド存在下グリシンメチルエステルによって不活性化されたが、一方*p*-ブロモフェナシルブロミドによって影響をうけなかった。これらの結果は、セリン、ヒスチジン、アスパラギン酸またはグルタミン酸が、本酵素の触媒部位に含まれ、電荷リレー系を形成していることを示唆するものである。

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University 熊本大学薬学部