

Neurospora sp. の生産するプロテアーゼ インヒビターの諸性質

大谷 元・鶴田文三郎

信州大学農学部 畜産製造学教室

生物の生命活動に関与する酵素の触媒作用は物理的環境、或いは化学的作用などにより調節されていることは周知の通りである。生体内のプロテアーゼインヒビターも或る条件下でプロテアーゼ活性を特異的に阻害しつつ1生化学反応の1過程に関与している重要な物質である。

近年、微生物の培養液よりプロテアーゼインヒビターを抽出、精製し、これを用いて代謝調節機構を人為的に作り、醗酵生産物の蓄積¹⁾、或いは病気の解析、治療²⁾を行なう試みがなされ、その有用性が認められている。したがって、多種多様な特異性をもつプロテアーゼインヒビターの単離が望まれている。

著者らは先に、土壌より分離同定した *Bacillus cereus* に属する菌株が、トリプシンおよびパepsinを阻害する低分子性インヒビターを生産すること、およびそのインヒビターの特性などについて報告した³⁾。本報告はその後、子囊菌、担子菌を対象にして、プロテアーゼインヒビター生産菌のスクリーニング、属の決定、インヒビターの生産条件、およびその産生インヒビターの諸性質について検討を行なった結果である。

実験方法

菌株の分離と属の決定：

木材断片より、ポテト・グルコース寒天培地を用いて常法に従い単離後⁴⁾、各種培養条件下における形態的特性より属を決定した⁵⁾。

トリプシンインヒビター生産菌株のスクリーニングおよび至適培養法の検討：

各分離菌株1白金耳をMA培地（グルコース2.0%、ペプトン1.5%、酵母エキス0.5%、 KH_2PO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、pH 7.0）10mlを含む試験管（1.6×16cm）に接種し、30°Cで7日間振盪培養後（120r. p. m）、その培養濾液を用いて、前報³⁾同様にトリプシンインヒビター生産性の有無を検討した。また、至適培養法の検討に際しては、MA培地100mlを500ml容振盪フラスコに入れたものに接種し、先づ30°Cで24時間振盪培養した。続いて、その培養液1mlを用いて、炭素源、窒素源、金属塩、初発pHおよび培養温度を異にした各種培養条件下で10日間振盪培養し、その間1日毎にトリプシン阻害活性を測定した。その方法は前報に準じた³⁾。

インヒビターの部分精製：

アセトン、硫酸アンモニウム、エタノールによる分別沈殿法により行なった。なお、その精製度は本酵素反応系における50%阻害に必要なインヒビターの凍結乾燥重量 (I. D₅₀, mg) で表示した。

分子量の推定：

メンブレンフィルター (アミコン) を用いた限外濾過法により行なった。

pH および熱安定性の検討：

部分精製インヒビターを所定の pH の緩衝液に 1% になるように溶解し、所定の条件で処理し、その残存活性を測定することにより pH および熱安定性の検討を行なった。

各種プロテアーゼに対する阻害性の検討：

各種濃度に調整したインヒビター溶液 0.5ml, 酵素溶液 (ナガーゼ 0.005% : 長瀬産業, α -キモトリプシン 0.005% : ベーリンガー, ペプシン 0.1% : メルク, プロナーゼ 0.01% : 科研化学, 或いはパパイン 0.5% : メルク) 0.5ml および緩衝液 1ml を加え 37°C で 10 分間反応した後 4% カゼイン溶液 0.5ml を加えて、さらに 10 分間反応した。続いて、その反応液に 5% トリクロル酢酸 2.5ml を加えて反応を停止した。得られた各反応液について、トリプシンの場合と同様に阻害活性を算出した。なお、用いた緩衝液としては、ナガーゼの場合は 0.1M 炭酸緩衝液 pH 9.0, α -キモトリプシンの場合は 0.1M リン酸緩衝液 pH 7.6, ペプシンの場合は 0.1M 塩酸-塩化カリウム緩衝液 pH 1.6, プロナーゼおよびパパインの場合は 0.1M リン酸緩衝液 pH 7.0 である。

結果および考察

1 インヒビター生産菌株の分離および属の決定

木材より分離した担子菌 (68株), 子囊菌 (7株) から目的菌株として 1 菌株を得た。その菌株の形態的特性より、本菌株は *Neurospora* に属する菌株であることが認められた。したがって、本菌株を *Neurospora* sp. と称して以下の実験に供した。

2 インヒビター生産のための至適培養法の確立

インヒビター生産のための至適培養法を決定した結果を表-1に、その条件下において培養した際の培養時間に伴うインヒビター生産性について調べた結果を図-1に、それぞれ示した。

Table 1 The optimum condition for cultivation.

Medium composition	
	Sucrose 2.0%
	Peptone 2.0%
	Yeast extracts 1.0%
	KH ₂ PO ₄ 0.1%
	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1%
Initial pH	5.0
Shaking (100ml/500ml Shaking-flask)	120 r. p. m
Temperature	30 C
Cultivation day	7 days

すなわち、表一に示した培地成分のように、本インヒター生産用の培地は炭素源、窒素源共に有機体が好ましい。このことは、一般に糸状菌の培地として用いられている Czapek, Hennenberg, Pfeffer, Raulin らの培地⁴⁾においては窒素源として無機の硝酸塩が用いられていることと比較し、非常に興味深い。

また、図一に示した経時的培養過程における測定結果より、本インヒターは培養後3日目付近の定常期から生産され、7

日目付近の自己死滅期に最高に達することが認められた。このことから、インヒターはまず培養初期において菌体内に蓄積され、自己消化により菌体外に生産されることが推定された。したがって、各培養過程の菌体を収集、磨砕後、0.1N-HCl, 0.85%NaCl, 或いは0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で抽出し、その抽出物のトリプシン阻害活性を測定したが阻害活性は認められなかった。このことから、本インヒターは菌体外に特異的に生産されるインヒターであり、松島らにより報告されているカビの生産する菌体内アルカリプロテアーゼインヒターとは本質的に異なった物質と思われる⁶⁾。

3 インヒターの部分精製およびその諸性質

1) 部分精製

表一に示した至適培養条件下で本菌株を培養し、その培養液を用いて表二のように各種溶媒を用いた分画法により本インヒターの部分精製を行なった。その結果、本インヒ

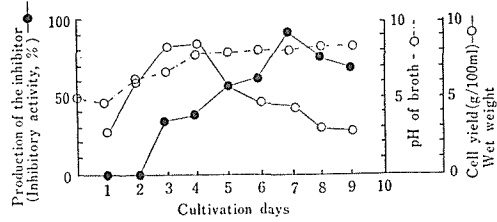


Fig. 1 Production of the inhibitor, changes of pH of the broth and cell yield during cultivation time at 30 C.

Table 2 Scheme of purification of the inhibitor.

	ID ₅₀ (mg)*	Total dry weight (g)
Culture broth		
↓ centrifuged		
Supernatant	9.3	42.5 (2.5 1)
↓ concentrated		
↓ 80% Acetone		
Precipitate	7.8	27.0
↓ dissolved in distilled water, 70% saturated (NH ₄) ₂ SO ₄		
↓ centrifuged		
Supernatant	5.2	14.0
↓ dialysed against tapping-water		
↓ concentrated		
↓ 50% Ethanol		
↓ centrifuged		
Supernatant		
↓ freeze-dried		
Partial purified inhibitor	3.6	2.1

* ID₅₀: Dry weight of the inhibitor to inhibit 50% of the proteolytic activity of trypsin.

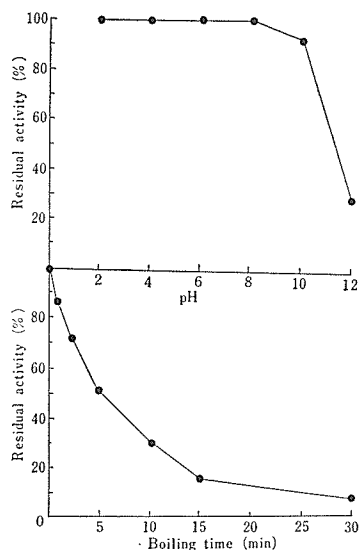


Fig. 2 pH and heat stabilities of the inhibitor.

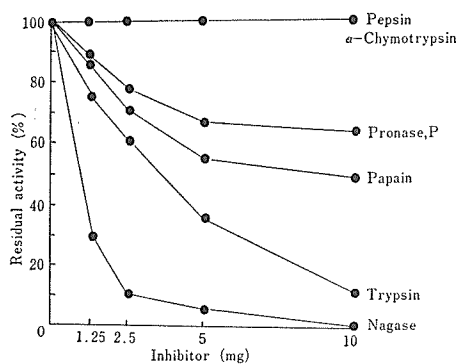


Fig. 3 Effect of the inhibitor on various proteases.

ターは、80%アセトン不溶、70%飽和硫酸アンモニウム可溶、50%エタノール可溶などの性質を利用することにより、約2.6倍まで精製された。

2) 分子量

部分精製物の分子量を限外濾過法により測定した結果、1~3万と推定された。

3) pH および熱安定性

各種 pH および熱に対する安定性を測定した結果を図-2に示した。図より、本インヒビターは60°C、10分の加熱では、酸性から中性溶液では安定であるが、アルカリ溶液では不安定であることが認められた。また、pH 7.0で5分間の煮沸によって50%の阻害活性が、30分間の煮沸によって90%以上の阻害活性が失活することが認められた。これらの結果より、本インヒビターも既知のプロテアーゼインヒビター同様に、酵素と比較して各種 pH および熱に対して安定であることが認められた⁷⁾。

4) 各種プロテアーゼに対する阻害性

各種プロテアーゼに対する阻害性について調べた結果を図-3に示した。

図より、本インヒビターはトリプシンの他にナガーゼ、パpainおよびプロナーゼを阻害し、α-キモトリプシンおよびペプシンを阻害しないことが認められた。

糸状菌の生産するプロテアーゼインヒビターについては、これまで松島らによりカビの酸性プロテアーゼインヒビターとアルカリプロテアーゼインヒビターが報告されている^{6,7)}。これら両インヒビターは、パpainおよびプロナーゼを阻害せず、著者らが分離した本インヒビターとは異なった

阻害スペクトルを示している。また、梅沢らは放線菌の培養液より、多くのペプチド性プロテアーゼインヒビターを単離しているが、本インヒビターのような幅広い阻害スペクトルを有するインヒビターは得ていない⁸⁻¹⁰⁾。これらのことより、本インヒビターは既知のプロテアーゼインヒビターとは明らかに異なった物質であり、加えて特異酵素阻害物質でありながらプロテアーゼに対して幅広い阻害スペクトルを有する特性から考え、今後の利用が期待できる。

要 約

木材断片より分離した子囊菌，担子菌75株を対象にトリプシンインヒビター生産菌株のスクリーニングを行ない，目的菌株として *Neurospora* に属する1菌株を得た。本菌株のインヒビター生産のための至適培養条件，生産インヒビターの部分精製およびその性質について検討を行ない，その結果は次の如く要約される。

1. 本菌株はシュクロース2.0%，ペプトン2.0%，酵母エキス1.0%， KH_2PO_4 0.1%，および $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% (初発pH5.0) よりなる培地 100ml を 500ml 容フラスコで30°C，7日間の振盪培養 (120r. p. m) において最もインヒビター生産が高い。
2. 本菌株により生産されたインヒビターは，その培養濾液より，80%アセトン中で沈殿，70%硫酸アンモニウム可溶，50%エタノール可溶などの性質を利用することにより，約2.6倍まで精製された。
3. インヒビターの分子量は1～3万で，60°C，10分の加熱に対して酸性から中性溶液では安定であるが，アルカリ溶液では不安定であった。また，pH 7.0 で5分間の煮沸によって50%の阻害活性が，30分間の煮沸によって90%以上の阻害活性が失活した。
4. 本インヒビターはさらに，トリプシンの他にナガーゼ，パパイン，プロナーゼの活性を阻害し， α -キモトリプシン，ペプシンを阻害しなかった。
5. 以上の結果から，本菌株の生産するプロテアーゼインヒビターは，既知の微生物起源のものとは異なった幅広い阻害スペクトルを有した新物質と考えられる。

本研究に際し，終始ご助言をいただいた当学部助教授，細野明義博士に深謝いたします。なお，本研究の概要は，昭和51年度日本農芸化学会大会（京都）において発表した。

文 献

- 1) S. SATO, K. NAKAHARA and S. MURAO : *Agr. Biol. Chem.*, **39** : 773 (1975)
- 2) M. HOZUMI, M. OGAWA and H. UMEZAWA : *Cancer Research*, **32** : 1725 (1972)
- 3) 鶴田文三郎，大谷 元：信州大学農学部紀要，**13** : 1 (1976)
- 4) 京都大学農学部農芸化学教室編：農芸化学実験書，第二巻，P781，産業図書（1969）
- 5) 長谷川武治編：微生物の分類と同定，東京大学出版会（1975）
- 6) 松島欽一：農化大会講演要旨集（京都）P89，（1976）
- 7) K. SHIMADA and K. MATSUSHIMA : *Agr. Biol. Chem.* **33** : 549 (1969)
- 8) HAMA O UMEZAWA : *Enzyme inhibitors of microbial origin*, University of Tokyo press (1972)
- 9) T. AOYAGI and H. UMEZAWA : *Proteases and biological control*, Cold Spring Harbor Symposium, P 429 (1975)
- 10) 青柳高明：別冊蛋白質核酸酵素，76 : 5, P241 (1976)

Some Properties of a protease inhibitor produced by *Neurospora* sp.

By Hajime OTANI and Fumisaburo TOKITA

Laboratory of Animal Product Technology, Fac. Agric., Shinshu Univ.

Summary

For the purpose to obtain fungi which are capable of producing trypsin inhibitors, screening test was carried out. A strain, which belongs to the genus of *Neurospora* was obtained, and production of the inhibitor by the strain and some properties of the inhibitor produced were examined. Results obtained were summarized as follows :

1) The strain produced the inhibitor maximally, when it was cultivated with shaking in a medium containing 2.0% sucrose, 2.0% peptone, 1.0% yeast extracts, 0.1% KH_2PO_4 and 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 5.0) at 30 C for 7 days.

2) The inhibitor was partially purified with 80% acetone, 70% saturated ammonium sulfate and 50% ethanol.

3) Molecular weight of the inhibitor was speculated to be 10000 to 30000. The inhibitor was stable both in acid and neutral solutions, and unstable in an alkaline solution. Fifty percent of activity of the inhibitor was inactivated by boiling for 5 minutes in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 and more than 90% was inactivated by boiling for 30 minutes.

4) The inhibitor inhibited Nagase, papain and Pronase as well as trypsin, but not α -chymotrypsin and pepsin.

5) The inhibitor obtained in this experiment was quite different from other protease inhibitors from microorganisms in their properties.