こうじかびのアルカリプロテアーゼ

— その構造と機能 —

林 和 也

Kazuya HAYASHI

キッコーマン醤油株式会社中央研究所

われわれ日本人の食生活になじみ深い醤油や味噌の原型といわれる醬（ひしお）が、わが国の食物の歴史に登場したのは、飛鳥時代と推定されている。醬の旨味成分は、主として穀物蛋白質がこうじかびのプロテアーゼによる酵素分解を受けてつくられたものであるから、思えば日本人は相当古くからこうじかびプロテアーゼの恩恵を受けてきたものである。

前世紀の末に、ドイツの Wehmer によって、はじめてこうじかびに蛋白分解能があることが見いだされて以来、こうじかびのプロテアーゼは、そのアミラーゼとともに、こうじかびを利用するユニークな産業をもつわが国の研究者の好個の研究対象となり、多くの地道な研究が積み重ねられてきた（1960年ごろまでの研究史については安井⁽¹⁾、布川⁽²⁾などの総説を参照されたい）。それにもかかわらず、現代酵素化学の水準からみた場合、こうじかびプロテアーゼの研究の進展のありさまは、動物臓器起源のプロテアーゼや枯草菌起源のサブチリシンなどの研究の現状と比較したときに、その著しい立ち遅れは覆うべくもない。

しかしながら、1960年代の後半になって、こうじかびとこの近縁菌の生産する主なプロテアーゼであるアルカリプロテアーゼの構造と作用上の特性に関する研究が、わが国をはじめ世界各地で活発に行なわれるようになり、この酵素に関するわれわれの知識は現在、急速に深まりつつある。本稿では、古くからわが国の産業上、大きな役割を果たしてきているこの酵素にスポットをあててみた。

こうじかびの生産するプロテアーゼ群と アルカリプロテアーゼの単離

わが国において、清酒、味噌、醤油などの醸造に用いられている分生孢子頭が黄緑色の *Aspergillus* 属糸状菌を、一般にこうじかび（もしくは麴菌、黄麴菌）と称しており、*A. oryzae*, *A. sojae* などがこれに属する。このうち前者は各種醸造に用途広く用いられているが、後者はほとんど醤油用に限られ、両者は分生孢子表面の突起の有無で区別される。

こうじかびの生産する菌体外プロテアーゼが数種類存在することは古くから知られていた。この分離と性質に関する研究は 1950 年代初頭より多くの研究者によってなされてきたが、得られた精製標品についての基本的な性質に関する知見ははなはだ乏しいものであった。しかし、この間にあって、こうじかびのプロテアーゼをはじめ結晶化した Crewther ら⁽³⁾や、はじめてこの酵素の活性中心構造にメスを入れた Sanger 一派⁽⁴⁾の仕事は、特筆されなければならない。

こうじかびのつくるプロテアーゼ群は、蛋白質に作用する際の至適 pH と阻害剤に対する挙動とによって、アルカリ性、中性、酸性プロテアーゼに分類されており、それぞれを系統的に精製単離する方法も報告されている^(5,6)。この他、数種類に及ぶエキソ型のペプチダーゼの存在が知られ、その一部は均一に単離されて性質が検討されはじめた。これらの酵素群は一般に菌株の種類や培養条件が異なると、その相互の生産量を著しく異にするが、通

常の培養条件においては、こうじかびの生産するプロテアーゼ群の主体を占めるのはアルカリプロテアーゼ（以下 AP と略す）である。この酵素は、後述するように、有機リン酸であるジイソプロピルフルオロリン酸(DFP)で阻害されることから、トリプシン、キモトリプシンやサブチリシンなどと同じく、セリン残基を活性中心にもついわゆるセリンプロテアーゼの一種と考えられている（こうじかびの AP について、他のセリンプロテアーゼや他の微生物プロテアーゼとの広い比較検討は、一島⁽⁷⁾や Matsubara⁽⁸⁾の総説を参照されたい）。

こうじかびの生産する AP の構造と性質に関しては、*A. oryzae* 起源のものについて Subramanian ら^(9~12)、Ives ら⁽¹³⁾、Nordwig ら⁽¹⁴⁾により、*A. sojae* 起源のものについて筆者ら^(15~25)により、こうじかびではないがごく近縁の *A. flavus* 起源のものについて Turková ら^(26~30)により検討がなされている。さらに、これ以外の *Aspergillus* 属糸状菌の生産する AP については、*A. melles*⁽³¹⁾、*A. sulphureus*⁽³²⁾、*A. candidus*⁽³³⁾、*A. terricola*⁽³⁴⁾ 起源のものについて、その構造と性質の検討がなされている。本稿では、このうちこうじかび（*A. oryzae*、*A. sojae*）およびごく近縁の *A. flavus* 起源の AP に限り、その構造と機能について従来までに得られた知見をまとめてみた。

こうじかびの AP は、菌体内で不活性体として生産され、これが活性化されて分泌されることが知られている^(35,36)が、不活性体の構造、活性化機構については、あまり研究は行なわれていない。

こうじかびおよび近縁菌の AP は、ふすまこうじの抽出液や液内培養の培養濾液から、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法などの組合せによって、比較的容易に均一に精製することができる^(5,6,16,26)。最近、ニワトリの卵白インヒビターを結合させたセファロースのカラムを用いて、1段階の操作で一挙に AP を単離する方法が報告された⁽³⁷⁾。

こうじかびアルカリプロテアーゼの蛋白化学

A. sojae の AP の等電点は 5.1 付近にあり^(17,38)、*A. oryzae* および *A. flavus* 起源の酵素も、そのアミノ酸組成の類似性よりみてこの付近にあるとみられる。動物、微生物起源のセリンプロテアーゼのほとんどがその等電点をアルカリ性側にもっているのに対し、こうじかびの

AP が弱酸性蛋白質であることはきわだった特徴である。

こうじかびとこの近縁菌の AP の分子量については、各研究者により 18,000~24,000 程度のさまざまな値が報告されている^(10,13,14,18,26,27)。測定法の原理や測定技術上の配慮が異なるため、報告された分子量値のみからこれら各酵素標品の異同は論じられない。こうじかび AP は、その偏比容値がアミノ酸組成から算出した場合と、溶液の密度を実測して算出した場合とで、その値に相当の隔たりがみられ^(10,18)、これが分子量算出に少なからざる影響を与えている。*A. oryzae*、*A. sojae*、*A. flavus*、起源の 3 つの標品をまったく等しい条件でセファデックス G-75 のゲル濾過に供したところ、溶出位置にはまったく差が認められなかった⁽³⁹⁾。すなわち、これら菌種のつくる AP はほとんど同じ分子量をもつものと考えてよい。

A. sojae の AP については、その物理化学的性質が詳細に調べられており、分子量 22,600（沈降平衡法）、沈降係数 $s_{20,w}^0 = 2.82$ S、拡散係数 $D_{20,w} = 9.97 \times 10^{-7}$ cm²/sec、固有粘度 $[\eta] = 0.027$ dl/g、偏比容 $\bar{V} = 0.696$ cm³/g（実測）、摩擦比 $f/f_0 = 1.16$ 、ストークス半径 21.5 Å、分子を細長い回転楕円体で水合がないと仮定したときの軸比 3.8 などの値が得られている^(17~19)。

A. oryzae、*A. flavus* 起源の AP 標品には、いずれもわずかながら糖が定量されている^(10,11,26)が、*A. sojae* の AP は糖をまったく結合していないことが確かめられている⁽¹⁶⁾。また、いずれの標品にもリンは結合していない^(11,16,26)。

A. sojae の AP 分子には、1 個のカルシウムが強固に結合していることが見いだされた⁽²²⁾。このカルシウムは、透析や低温での EDTA 処理では除くことができないことから、マスクされた状態にあると推定され、さらに酵素分子の空間構造の維持に役立っているとみられる証拠が得られている⁽²²⁾。

こうじかびおよび近縁菌の AP のアミノ酸組成については、表 1 にみられるように、たいへんよく似た結果が得られている^(10,13,14,17,19,26)。末端基はすべて一致しており、いずれも N-末端はグリシン、C-末端はアラニンであり、酵素分子は 1 本鎖と考えられている^(12,18,26)。サブチリシンと同様に S-S 結合をまったく欠いていることは、トリプシン、キモトリプシンなどが相当量の S-S 結合により空間構造を保持していることとくらべ、著しく対照

表 1 こうじかびおよび近縁菌のアルカリプロテアーゼのアミノ酸組成, 末端基, 分子量

	<i>A. oryzae</i> ^(10,12)	<i>A. oryzae</i> ⁽¹³⁾	<i>A. oryzae</i> ⁽¹⁴⁾	<i>A. sojae</i> ^(18,19)	<i>A. flavus</i> ^(26,27)
Lys	11~12	15	12	12	11
His	4	5	4	4	3~4
Arg	2	3	3	3	2
Trp	2	2	2	2	2
Asp	21	23	21~22	27	21
Thr	11	13	13	16	11
Ser	19	21	23	25	20
Glu	12	13	13	16	12~13
Pro	4	5	5~6	6	4~5
Gly	19	21	21	24	20
Ala	23	27	23	28	23
Cys	0	0	0	0	0
Val	15	17	16	16	15
Met	0	2	1	2	1
Ile	9~10	11	10~11	12	9~10
Leu	9	11	10	13	9
Tyr	5	6	4~5	7	5
Phe	5	5	6	6	5
アミド-NH ₃	15	—	—	18	17
計	171~174	200	187~191	219	173~177
N-末端	Gly	—	—	Gly	Gly
C-末端	Ala	—	—	Ala	Ala
分子量	18,000 ^{b)}	22,000 ^{b)}	20,600 ^{a)} 20,500 ^{c)} 19,500 ^{d)}	22,600 ^{a)} 21,700 ^{c)} 23,000 ^{e)}	23,600~27,200 ^{a)} 19,000 ^{d)} 23,900 ^{e)} 17,800 ^{f)}

a) Yphantis 法, b) Archibald 法, c) 沈降係数と固有粘度より算出, d) 光散乱法, e) ゲル濾過法,

f) アミノ酸組成より算出

的である。また、トリプシンやキモトリプシンとくらべると、塩基性アミノ酸の数はほぼ等しいが、酸性アミノ酸の数が相当多く、これは AP の等電点によく反映しているといえよう。

こうじかびおよび近縁菌の AP のアミノ酸組成はよく似ているが、詳細に比較してみると若干の相違がみられ(たとえばメチオニン含量など)、これが菌種間の、もしくは同一種内の菌株間の酵素分子の 1 次構造上の差を意味しているのか、単に分析技術上の差によるものか難しいところである。これら種もしくは株の異なるかびのつくる AP の化学構造は、はたしてすべて同一のものだろうか。それとも少しずつ異なるものが存在するのだろうか。異なるとしても、たとえばサブチリシンの BPN' タイプと Carlsberg タイプの差ほどのちがいがみられるのだろうか。

最近, Nasuno⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ は, *Aspergillus* に属する多くの菌株から得た粗酵素を一定条件でポリアクリルアミドゲルの電気泳動に供すると、その AP 活性を示す区分の泳動距離が、菌株の種によってそれぞれ一定値を示すこと

を見いだして、*Aspergillus* の AP の比較生化学上、興味ある知見を得た。この泳動距離には酵素蛋白質の電荷と形状と大きさが関与するとみられる。この結果によれば、

1) 1 つの種の中では各株とも同一かほとんど同じ構造の AP をつくり出している可能性が大きいこと⁽⁴⁰⁾, 2) 種が異なると異なる構造の AP をつくる場合があり、たとえば Raper と Fennell の分類による *Aspergillus flavus* グループの場合には、その AP は少なくとも 4 つのタイプに分類できること⁽⁴¹⁾ が明らかになった。これによると、*A. oryzae* 起源の AP は *A. flavus* 起源の AP と同一の構造である可能性が大きい、*A. sojae* 起源の AP はこれらとは異なる構造であることが示唆された⁽⁴²⁾。

Turková ら⁽³⁹⁾ は、*A. oryzae*, *A. sojae*, *A. flavus*, *A. sulphureus* 起源の 4 つの AP 標品に、まったく同一の条件でトリプシンまたはキモトリプシンを作用させ、その消化生成物をペプチドマップ法で比較してみた。この結果を整理すると表 2 のごとくなる。これから、*A. oryzae* の AP と *A. flavus* の AP の 1 次構造は同一か、もしくはほとんど完全に一致していることが示唆され、

表 2 *Aspergillus* 属アルカリプロテアーゼの酵素水解物の
ペプチドマップによる比較⁽⁸⁹⁾

酵素の起源	トリプシン消化物		キモトリプシン消化物		<i>A. flavus</i> 酵素との類似性
	主なス ポットの 数	<i>A. flavus</i> 酵 素と同じス ポットの表	主なス ポットの 数	<i>A. flavus</i> 酵 素と同じス ポットの数	
<i>A. flavus</i>	16	標準	33	標準	標 準
<i>A. oryzae</i>	16	16	33	33	同一（またはきわ めてよく一致）
<i>A. sojae</i>	15	14	34	30	よく一致している が同一ではない
<i>A. sulphureus</i>	12	10	25	19	似ているが一致し ている度合少ない

一方 *A. sojae* の AP はこれらと一致している度合は大きい、明らかに差異のあることが判明した。分類上、上記三者とかけ離れているとみられる *A. sulphureus* の AP の場合、消化物ペプチドの一致している度合はやはり相当低下していた。

水溶液中における空間構造と活性

こうじかびの AP 分子は、水溶液中でどのような空間構造をとって安定に存在しているのであろうか。この問題については、*A. sojae* 起源の酵素について旋光分散、赤外吸収スペクトル、紫外吸収差スペクトル、粘度などを測定することにより検討された⁽²⁰⁾。

A. sojae の AP の比旋光度 $[\alpha]_D$ は -18.3° であり、また固有粘度が 0.027 dl/g と小さいことは、本酵素がコンパクトに fold された球状蛋白質であることを示している。300~600nm 領域の旋光分散の測定から、旋光分散定数 $\lambda_c=256 \text{ nm}$ 、Moffitt-Yang の式のパラメーター $a_0=-78^\circ$ 、 $b_0=-74^\circ$ の値が得られた。さらに、コットン効果の観察される紫外領域での旋光分散は、233nm に負の谷 ($[m']_{233}=-2400$)、199~201nm に正の山 ($[m']_{200}=11,700$)、210~215nm に肩を有するもので、一応 α -ヘリックス型のパターンを示した⁽²⁰⁾。

この AP を塩酸グアニジンや尿素のような蛋白変性剤で処理した場合、比較的軽微な変性条件で b_0 値が零となり、かつ 233nm におけるコットン効果の負の谷が失われ、 α -ヘリックスの崩壊が示唆された^(20,21)。そして、さらに変性条件を強めるに従い、 $-a_0$ 値および左旋性が著しく増大することが認められたが、この増加の程度は α -ヘリックスの崩壊の程度をはるかに凌駕するものであって、本酵素は α -ヘリックス以外にかなりコンパクトに fold された空間構造をもつことが示された⁽²⁰⁾。

AP の赤外吸収スペクトルについては、重水中でアミド I 吸収帯、塩化銀板上でアミド V 吸収帯の観察が行なわれた⁽²⁰⁾ (図 1)。アミド V 吸収帯において観察された 653 cm^{-1} の強い吸収は不規則構造に、 622 cm^{-1} の強い吸収は不規則構造に、 622 cm^{-1} および 700 cm^{-1} の比較的弱い吸収はそれぞれ α -ヘリックスおよび β 構造に帰属させることができる。さらに、アミド I 吸収帯において観察

された 1650 cm^{-1} 付近の強い吸収は、不規則構造と α -ヘリックスに、 1630 cm^{-1} の肩は β 構造に基づくものと考えられ、 1685 cm^{-1} における肩はこの β 構造が逆平行であることを示すものである。

以上の旋光分散、赤外吸収スペクトル、固有粘度などの測定結果から判断して、*A. sojae* の AP は 10~15% 程度の α -ヘリックスと若干量の β 構造を有すること、そして分子を構成するペプチド鎖の大半は不規則な構造

図 1 *A. sojae* アルカリプロテアーゼの赤外吸収
スペクトル⁽²⁰⁾
(a) アミド I 吸収帯 (重水中)
(b) アミド V 吸収帯 (塩化銀板上)

であって、しかも全体として強く fold されていることが推定されるに至った⁽²⁰⁾。この不規則構造は、主として疎水結合により安定化されていると想像されるが、AP 分子にそれぞれ若干量存在する α -ヘリックスおよび β 構造は、水素結合以外に側鎖の疎水的な相互作用によっても安定化されているものと考えられることができるであろう。

ついで、塩酸グアニジンや尿素のような蛋白変性剤を用いていろいろな条件で本酵素を処理し、この酵素の空間構造の変化を活性と関連づけて検討した⁽²¹⁾。塩酸グアニジンの濃度をいろいろと変えて AP を処理したときの旋光分散パラメーター、294nm における吸光度の差、および酵素活性の変化を図 2 に示す。

塩酸グアニジンの濃度が上昇するに従い、旋光分散のパラメーター a_0 値はしだいに増大し、6M で 261° に達した。さらに、この濃度で pH を 2 に下げると、 $-a_0 = 381^\circ$ の値を示した⁽²¹⁾。いまこの a_0 値の変化を AP 分子の空間構造の崩壊の指標と考えると、1.5~1.6M 塩酸グアニジン処理の場合の本酵素分子の空間構造の崩壊程度は、全体からみると比較的小さいと考えられる。事実、

図 2 塩酸グアニジン存在下における *A. sojae* アルカリプロテアーゼの空間構造と活性の変化⁽²¹⁾
pH 7, 20°C, 3 時間後

この程度の変性処理においては、固有粘度の変化はほとんど認められていない。しかしながら、この濃度において b_0 値は零となり、233nm におけるコットン効果の負の谷が消失し、酵素活性はこの谷の消失とよい平行関係を示して完全に失われた⁽²¹⁾。さらに、8M 尿素処理による空間構造と酵素活性の経時的な変化が検討されたが、この場合も、酵素蛋白質分子全体からみた空間構造の変化が比較的小さいような段階において、 α -ヘリックスと酵素活性の並行的な喪失が観察された⁽²¹⁾。

図 2 に示された $\Delta \epsilon_{294}$ 値の変化ならびに 2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルブロミドによる化学修飾実験の結果⁽²⁰⁾から、AP に含まれる 2 個のトリプトファン残基は 2 個とも分子内部の疎水領域に埋めこまれており、比較的局所的な空間構造の変化しか起きていないと推定される。1.6M 以下の塩酸グアニジン処理において、2 個とも溶媒に露出することが明らかになった⁽²¹⁾。

以上の実験結果からのみでは、トリプトファン残基と 2 次構造との関係については推定の域を脱しないが、この 2 個のトリプトファン残基は、本酵素を構成するポリペプチド鎖が α -ヘリックスを形成している箇所位置している可能性が指摘されている⁽²¹⁾。

酵素作用上の特徴と活性中心

こうじかびおよび近縁菌の AP は、その名の示すごとく、一般にアルカリ性側でカゼイン、ヘモグロビンなどの蛋白質をよく加水分解する。その作用至適 pH は、*A. oryzae* 酵素では 7.0~10.5 のさまざまな値が報告され^(5,11,14,43,44)、*A. sojae* 酵素では 11.0 の値が得られている⁽²⁴⁾。この至適 pH は基質蛋白質の種類によって異なるほか、使用する緩衝液の種類によってもはなはだしく異なる場合⁽¹⁴⁾が知られている。*A. oryzae*、*A. sojae*、*A. flavus* 起源のそれぞれの AP 標品について、同一の条件(Britton-Robinson 緩衝液を使用)でヘモグロビンに作用させたところ、すべて pH 7~10 の範囲で広い至適 pH 域が観察され⁽³⁹⁾、サブチリシンと同様な pH-作用曲線が得られている。

こうじかびの AP は、多種類の蛋白質に対しトリプシンやキモトリプシンを相当上まわる加水分解速度を示し、フィブリンやコラーゲンなどにも弱いながら作用することができる^(5,14,24)。この酵素は典型的なエンドペプチダーゼとしての性格を有し、多くの蛋白質の消化に際して

そのペプチド結合の8~15%を切断すると反応を停止する。この際、遊離アミノ酸の生成はほとんど認められない⁽²⁴⁾。したがって、醤油などの醸造において、本酵素は穀物蛋白質の低分子化に基づくところの窒素成分の可溶化に主役として働くものであり、遊離アミノ酸の生成には直接関与していないものと考えられる⁽²⁴⁾。

こうじかびおよび近縁菌のAPの基質特異性は、個々の精製酵素について、各種低分子合成基質やインシュリンB鎖のような高分子ペプチドを用いて検討が進められてきており、とくに Morihara ら^(44,45)により、微生物セリンプロテアーゼ全般にわたって系統的研究が精力的に行なわれた。低分子合成基質を用いた特異性の検討により、こうじかびおよび近縁菌のAPは、1) 他の多くのセリンプロテアーゼと同様にいわゆるエンドペプチダーゼであること、2) 切断点のカルボキシル基を含むアミノ酸残基に最大の特異性を有すること（ちなみに細菌の中性プロテアーゼは切断点のアミノ基側のアミノ酸残基に特異性を有する）、3) サブチリシンなどと同様に、チロシン、フェニールアラニン、ロイシンなどの芳香族または疎水性アミノ酸残基に特異性を有するほか、アルギニン、リジンなどの塩基性アミノ酸残基にも特異性を示すこと、すなわち、キモトリプシン様の特異性にトリプシン様の特異性をあわせもっていること、が結論された^(24,45)。

エステル基質であるベンゾイル-L-アルギニン・エチルエステルおよびアセチル-L-チロシン・エチルエステルは、それぞれトリプシンおよびキモトリプシンの代表的な基質であるが、こうじかびのAPは両方の基質に対しエステラーゼ作用を示すことが知られている^(24,25,29,45)。ところが最近に至り、さきに動物臓器起源のエラスターゼ（パンクレアトペプチダーゼE）の特異的な基質として合成されたアセチル-L-アラニル-L-アラニル-L-アラニン・メチルエステルに対し、こうじかびのAPが高いエステラーゼ活性を示すことが明らかになり^(25,37)、こうじかびAPがキモトリプシン様、トリプシン様活性のほかに、エラスターゼ様活性をもあわせもっていることが示された(表3)。もっとも、こうじかびAPはその等電点が酸性側にあるために、プロテアーゼ作用に先立って行なわれる不溶性のエラスチンとの静電点的吸着が行なわれず、そのために天然エラスチンに対しては作用しない^(24,48)。このAPのカルボキシル基の一部を化学修飾

表 3 エステル基質に対する作用^(25,37)

酵 素	基 質	$K_m(\text{mM})$	$k_{\text{cat}}(\text{sec}^{-1})$
<i>A. oryzae</i> アルカリプロテ アーゼ	Bz-Arg-OEt ^{a)}	7.1	41
	Ac-Tyr-OEt ^{b)}	12.8	43
	Ac-Ala ₃ -OMe ^{c)}	20.8	2850
<i>A. sojae</i> アルカリプロテ アーゼ	Bz-Arg-OEt	8.3	26
	Ac-Tyr-OEt	10.9	30
	Ac-Ala ₃ -OMe	21.6	2800
トリプシン	Bz-Arg-OEt	0.05	22
α -キモトリプシン	Ac-Tyr-OEt	0.70	193
エラスターゼ	Ac-Ala ₃ -OMe	0.43	73

反応条件：pH 8.0, 25°C

a) ベンゾイル-L-アルギニン・エチルエステル

b) アセチル-L-チロシン・エチルエステル

c) アセチル-L-アラニル-L-アラニル-L-アラニン・メチルエステル

でブロックすると、酵素蛋白質の電荷が塩基性に傾き、天然エラスチンに対する活性が出現することが認められている⁽⁴⁸⁾。

A. oryzae および *A. flavus* 起源のAPをインシュリンB鎖に作用させて、その切断点の位置がしらべられた^(14,30,45~47)。この結果は、Nordwig ら⁽¹⁴⁾の得た結果のみを例外としてよく一致していた。*A. oryzae*に属する1株、*A. sojae*、*A. flavus*および*A. sulphureus*起源のAPをまったく同一条件で、インシュリンB鎖に作用させ、その分解産物をペプチドマップ法で比較した結果は、まったく一致していた⁽³⁹⁾。これらのAP標品は、それぞれ各切断点の分解速度に若干の差が存在する可能性はあるものの、まずほとんど同じ特異性をもつものとみてよいであろう。*A. oryzae*の1株からNordwig らによって得られたAPは、インシュリンB鎖に対する切断点が他のAPと著しく異なることがはじめ報告された⁽¹⁴⁾のために、こうじかびに新しいタイプのAPの存在するものとして注目を集めたが、その後の*A. flavus*酵素との比較試験結果⁽⁴³⁾からみて、どうやら実験上の不備に基づくものらしい。

APをインシュリンB鎖や天然の蛋白質に作用させて得られた切断点に関する知見は、必ずしも低分子合成基質を用いて得られた特異性に関する知見と矛盾するものではなく、前述の特異的なアミノ酸残基のカルボキシル基を含む結合以外にも、相当多岐にわたる切断点を有し、かなり広い特異性をもつことが示された。このような広い基質特異性は、サブチリシンなどの微生物プロテアーゼに多くみられる特徴であって、酵素の活性中心の結合

表 4 活性セリン残基近傍のアミノ酸配列

<i>A. oryzae</i> アルカリプロテアーゼ ⁽⁴⁾	-Thr-Ser*-Met-Ala-
<i>A. flavus</i> アルカリプロテアーゼ ⁽²⁸⁾	-Gly-Thr-Ser*-Met-Ala-
サブチリシン ⁽⁵⁰⁾	-Gly-Thr-Ser*-Met-Ala-
トリプシン ⁽⁵⁰⁾	
キモトリプシン ⁽⁵⁰⁾	-Gly-Asp-Ser*-Gly-Gly-Pro-
エラスターゼ ⁽⁵⁰⁾	

Ser* は活性セリン残基

討^(14,23,25)より, APの活性中心構造はこれら動物起源のセリンプロテアーゼと異なっていることが推定されるに到った^(14,23).

DFPと反応する活性セリン残基近傍の1次構造は, *A. oryzae*, *A. flavus* 起源の酵素について調べられており^(4,28)(表4), その1次構造は動物臓器起源のセリンプロテアーゼの場合とは異なっており, サブチリシンの場合と一致している結果が得られている. サブチリシンは,すでに全1次構造, 空間構造まで解明され, その触媒作用はキモトリプシンと基本的には同様の Asp(32)→His(64)→Ser(221)の電荷リレー系の存在に基づくことが示されている⁽⁴⁹⁾. *A. flavus* 起源のAPについて, 合成エステル基質に対する酵素反応速度のpH依存性から, 活性基にヒスチジン残基が関与しているとみられる証拠が提出されており⁽²⁹⁾, この点からは, 一応触媒部位はサブチリシンと同様な構造をもつものと推定することができる.

*

こうじかびプロテアーゼは, われわれ日本人にとっては古くからたいへんなじみ深い酵素であるにもかかわらず, その構造や基本的な性質に関する知識は, 近年に至るまではなほだ乏しいものであったといわざるをえない. 酵素のもつ特異的な機能を, その分子構造との関連において理解しようとする試みは, 現在すでにいくつかの酵素について相当の成功が収められているが, こうじかびのAPについてはまだまだ多くの基礎的知見の積み重ねが必要である. しかしながら, 近年, この酵素は世界各地の研究者の大きな関心を集めるようになり,すでに全1次構造決定の仕事が開始された模様である⁽⁵¹⁾. 永年の間, わが国の伝統的な醸造産業を支えてきたこの酵素の構造と機能の全貌が明らかになるのも, そう遠い先のことではないであろう.

図 3 *A. sojae* アルカリプロテアーゼとキモトリプシンの DFP による阻害作用⁽²³⁾

酵素を各濃度の DFP と下記の条件に保ったのち, 残存活性を測定
A1: アルカリプロテアーゼ ($1.2 \times 10^{-6} \text{M}$), pH 7.5, 30°C, 30 分
A2: アルカリプロテアーゼ ($1.2 \times 10^{-6} \text{M}$), pH 7.5, 23°C, 5 時間
C: α -キモトリプシン ($1.7 \times 10^{-6} \text{M}$), pH 7.5, 30°C, 30 分

部位が数多くあるためと推定されている^(30,44).

A. oryzae の AP の活性部位の大きさについての知見を得る目的で, 特異性をもつアミノ酸残基を含むペプチドの N-端または C-端方向へペプチド鎖を順次延長したさまざまなペプチド基質に対する加水分解速度や, この基質に類似のクロルメチルケトン誘導体による阻害度が系統的に調べられた. この結果, 切断点の N-端側へ少なくとも 3 残基, C-端側へ少なくとも 3 残基が影響を与えていること, さらに基質としてある程度のペプチドの長さを必要とすることが示されている⁽⁴⁴⁾.

こうじかびおよびこの近縁菌の AP に共通して認められる性質として, 金属キレート試薬や SH 試薬による阻害を受けず, 前述のように活性セリン残基の特異的修飾剤である DFP で阻害を受けることが知られており^(11,14,23,26), このためこれら AP はいわゆるセリンプロテアーゼの範疇に包含される. しかしながら, 図 3 にみられるように, *A. sojae* の AP の DFP による阻害の程度は, 代表的なセリン酵素であるキモトリプシンと比較して著しく低いことが判明しており⁽²³⁾, さらにトリプシンやキモトリプシンの特異的阻害剤を用いての検

文 献

- 1) 安井恒男: “生化学講座” 第 10 卷 (片桐英郎ら編), 共立出版, 1960, p. 346.
- 2) 布川弥太郎: 醸協, 56, 170, 271 (1961).
- 3) W. G. Crewther & F. G. Lennox: *Nature*, 165, 680 (1950).
- 4) R. A. Oosterbaan & J. A. Cohen: in “Structure and Activity of Enzymes” (ed. T. W. Goodwin *et al.*), Academic Press, New York, 1964, p. 87.
- 5) R. Bergkvist: *Acta Chem. Scand.*, 17, 1521, 1541, 2230 (1963).
- 6) T. Misaki, M. Yamada, T. Okazaki & J. Sawada: *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1383 (1970).
- 7) 一島英治: 醸協, 25, 337 (1967); 27, 269 (1969).
- 8) H. Matsubara & J. Feder: in “The Enzymes” Vol. III, 3rd ed. (ed. P. D. Boyer), Academic Press, New York, 1971, p. 721.
- 9) A. R. Subramanian & G. Kalnitsky: *Biochemistry*, 3, 1861 (1964).
- 10) A. R. Subramanian & G. Kalnitsky: *Biochemistry*, 3, 1868 (1964).
- 11) A. R. Subramanian, S. Spadari & G. Kalnitsky: *Fed. Proc.*, 24, 593 (1965).
- 12) S. Spadari, A. R. Subramanian & G. Kalnitsky: *Biochim. Biophys. Acta*, 243, 479 (1971).
- 13) D. A. J. Ives & A. L. Tosoni: *Can. J. Biochem.*, 45, 1055 (1967).
- 14) A. R. Nordwig & W. F. Jahn: *European J. Biochem.*, 3, 519 (1968).
- 15) K. Hayashi, D. Fukushima & K. Mogi: *Agr. Biol. Chem.*, 31, 642 (1967).
- 16) K. Hayashi, D. Fukushima & K. Mogi: *Agr. Biol. Chem.*, 31, 1237 (1967).
- 17) K. Hayashi, D. Fukushima & K. Mogi: *Agr. Biol. Chem.*, 31, 1171 (1967).
- 18) K. Hayashi, M. Terada & K. Mogi: *Agr. Biol. Chem.*, 34, 289 (1970).
- 19) 林 和也, 寺田 勝, 福島男児, 茂木孝也: 調味科学, 17, 170 (1970).
- 20) K. Hayashi, D. Fukushima & K. Mogi: *Agr. Biol. Chem.*, 32, 988 (1968).
- 21) K. Hayashi, D. Fukushima & K. Mogi: *Agr. Biol. Chem.*, 34, 38 (1970).
- 22) 林 和也, 寺田 勝, 茂木孝也: 農化, 45, 310 (1971).
- 23) K. Hayashi, M. Terada & K. Mogi: *Agr. Biol. Chem.*, 34, 627 (1970).
- 24) K. Hayashi & M. Terada: *Agr. Biol. Chem.*, 36, 1755 (1972).
- 25) A. Gertler & K. Hayashi: *Biochem. Biophys. Acta*, 235, 378 (1971).
- 26) J. Turková, O. Mikeš, K. Gančev & M. Boublík: *Biochem. Biophys. Acta*, 178, 100 (1969).
- 27) J. Turková & O. Mikeš: *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 37, 1408 (1972).
- 28) O. Mikeš, J. Turková, Nguyen Bao Toan & F. Šorm: *Biochem. Biophys. Acta*, 178, 112 (1969).
- 29) J. Turková: *Biochim. Biophys. Acta*, 220, 624 (1970).
- 30) J. Turková & O. Mikeš: *Biochem. Biophys. Acta*, 198, 386 (1970).
- 31) 伊藤万蔵, 杉浦 衛: 薬誌, 88, 1576, 1591 (1968).
- 32) G. Danno: *Agr. Biol. Chem.*, 34, 264 (1970).
- 33) S. Nasuno & T. Ohara: *Agr. Biol. Chem.*, 36, 1791, 1797 (1972).
- 34) G. V. Samsonov, L. K. Shataeva & O. U. Orlovskaya: *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 206, 497 (1972).
- 35) 山本喜志郎, 林 和也: 酵素化学シンポジウム, 18, 21 (1962).
- 36) 当山清善, 杉森恒武, 片桐英郎: 醸工, 38, 355, 360 (1960).
- 37) G. Feinstein & A. Gertler: *Biochim. Biophys. Acta*, 印刷中.
- 38) S. Nasuno & T. Ohara: *Agr. Biol. Chem.*, 35, 836 (1971).
- 39) J. Turková, O. Mikeš, K. Hayashi, G. Danno & L. Polgár: *Biochem. Biophys. Acta*, 257, 257 (1972).
- 40) S. Nasuno: *Agr. Biol. Chem.*, 35, 1147 (1971).
- 41) S. Nasuno: *Agr. Biol. Chem.*, 36, 684 (1971).
- 42) S. Nasuno: *J. Gen. Microbiol.*, 71, 29 (1972).
- 43) G. Bretschneider, A. Nordwig, O. Mikeš & J. Turková: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 352, 1372 (1971).
- 44) K. Morihara, T. Oka & H. Tsuzuki: *Arch. Biochem. Biophys.*, 146, 297 (1971).
- 45) K. Morihara & H. Tsuzuki: *Arch. Biochem. Biophys.*, 129, 620 (1969).
- 46) F. Sanger, E. D. P. Thompson & K. Kitani: *Biochem. J.*, 59, 509 (1955).
- 47) G. Kalnitsky & S. Spadari: Abstracts of 7th International Congress of Biochemistry, Tokyo (1967).
- 48) A. Gertler: *Febs. Letters*, 19, 255 (1971).
- 49) C. S. Wright, R. A. Alden & J. Kraut: *Nature*, 221, 235 (1969).
- 50) M. L. Bender & F. J. Kézdy: *Ann. Rev. Biochem.*, 34, 49 (1965).
- 51) J. Turková: (私信).

新 刊

Molecular Mechanisms of Enzyme Action

—NRI Symposia on Modern Biology—

Edited by Yasuyuki Ogura, Yuji Tonomura,
and Takao Nakamura

菊判 336 pp./ 定価 ¥ 4,000

Advance in Biophysics, Vol. 3

Editor: Masao Kotani

Authors: Satoru Fujime/Akira Takeuchi/Syoten Oka/
Hiromichi Morita/Uichiro Kishimoto/Tateo Yamanaka

菊判 292 pp./ 定価 ¥ 2,800

東京都文京区 本郷東大構内 東京大学出版会 振替東京 59964
電話 811-8814