Aspergillus oryzae W-1 のアルカリ プロテアーゼインヒビター 失活化酵素の精製と性質

石原昌信[§], 盛根信也, 片山寿雄, 儀間朝頼,
平良東紀, 多和田真吉, 小波本直忠

琉球大学農学部

Purification and Some Properties of an Alkaline
Protease Inhibitor-Inactivating-Enzyme
from *Aspergillus oryzae* W-1

Masanobu Ishihara[§], Nobuya Morine, Hisao Katayama,
Tomoyori Gima, Toki Taira, Shinkichi Tawata
and Naotada Kobamoto

Department of Bioscience and biotechnology,
Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus,
1, Senbaru Nishihara-cho, Okinawa 903-0213

An alkaline protease inhibitor-inactivating enzyme (AIE) of *Aspergillus oryzae* W-1 was purified to homogeneity by the combination of various column chromatographies. The molecular mass of the enzyme was estimated to be 42 kDa by SDS-PAGE; the isoelectric point was 4.7. AIE was optimally active at around 55°C and pH 6. The enzyme was stable up to 40°C and in the pH range of 6–10. AIE was inactivated by HgCl₂ or *p*-chloromercuribenzoate (*p*-CMB) but not by trypsin inhibitor, leupeptin, and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). It was also inactivated by chelating agents, like ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and *o*-phenanthroline. The enzyme treated with HgCl₂, however, was reactivated by the addition of 2-mercaptoethanol (2-ME). On the other hand, EDTA-inactivated AIE was reactivated in the presence of 2-ME and CaCl₂. When the protease-inhibitor complex was incubated with AIE at 37°C and pH 5, the activation of AP was detected. From these results, it was supposed that AIE is responsible for the activation of alkaline protease (AP) in the cells of mold. (Received May 28, 2003; Accepted Aug. 26, 2003)

黄麹菌のアルカリプロテアーゼ (AP) は細胞内ではそのインヒビター (API) と複合体を形成していると考えられている¹⁾²⁾. 本複合体は不活性であるが、別のプロテアーゼの作用によって API が分解されるに伴い活性型の AP へ変換されるものと想定されている¹⁾. しかし AP の活性化機構は、充分には解明されていない. 著者らは、API を失活させるプロテアーゼを黄麹菌 *Aspergillus oryzae* W-1 の無細胞抽出液に認め、同酵素をアルカリプロテアーゼイン

ヒビター失活化酵素 (AIE) と呼称した. AIE は、Sekine³⁾⁴⁾ によって報告されている *A. sojae* の中性プロテアーゼ I (NP-I) に対応するものと推察されるが、酵素化学的特性は不明である.

A. sojae の細胞内には 2 種類の中性プロテアーゼが認められており、両酵素が AP の活性化へ関与すると考えられている⁴⁾. しかし、両酵素が細胞内で AP の活性化に関与するという直接的な証拠は未だ得られていない. 黄麹菌の AP および API はそれぞれ均一に精製され諸性質が明らかにされているが⁵⁾⁶⁾, AP-API 複合体の単離や AP の活性化機構の解明に直接結びつく知見は得られていない. また、AP の酵素化学的特性やブレブ酵素の遺伝子解析が行われ、アミノ酸配列等が明らかにされている⁵⁾. しかし、プロテアーゼのアミノ酸配列と API との関係については明らかでない.

本研究では、AIE が AP の活性化に関与するか否かを明らかにする目的で、*A. oryzae* W-1 の粗酵素液から AIE を均一に精製し、本酵素の API に対する作用や酵素化学的特性等について調べた.

1. 実験方法

本研究では黄麹菌 *Aspergillus oryzae* W-1 を供試菌株とした. 菌の培養は、前報⁵⁾ で述べた液体培地を 5L 容ジャーファーマンターに採り、殺菌後前培養菌体を接種し、30°C で 48 時間通気攪拌して行った. AP と API の調製および活性測定は前報⁶⁾ に準じた. インヒビターの 1 単位は AP 活性を 50% 阻害する量とした. AIE は次のように調製した. 即ち、培養菌体を乳鉢中で磨砕した後、0.01 M トリス・マレイト緩衝液 (TMB, pH 8.5) を加えて酵素を抽出した. 次に、遠心分離により上澄液を得、0.01 M リン酸カリウム緩衝液 (KPB, pH 7) に対して透析し、粗酵素液とした. 酵素反応液の組成は、0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 5) 0.1 ml, 3.6 mg/ml API 0.1 ml および酵素液 (AIE) を加えて総量を 0.5 ml とした. 酵素反応は、本反応混液を 37°C で 20 分間保持して行い、その後残存インヒビター活性を前報⁶⁾ に従って測定した. AIE の 1 単位は、反応 20 分間に 400 nm における吸光度を 1 変化せしめる酵素量とし、比活性は蛋白質 mg 当たりの単位数で表示した. Native-PAGE は Davis の方法⁷⁾ に従った. SDS-PAGE は 0.1% SDS を含む 7.5% ゲルを用い、Weber-Osborn の方法⁸⁾ に準じた. 分子量マーカーにはオリエンタル酵母社製品の各種分子量の Cytochrome C を用いた. 等電点電気泳動は、両性電解質の 2% アンホライン (pH 3.5~10) を含むポリアクリルアミドゲルを用いて行い、酵素の等電点 (pI) は等電点測定用キット (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) で作成した検量線から算出した. 蛋白質の定量は Lowry の方法⁹⁾ に従った.

2. 実験結果および考察

AIE を精製する目的で、粗酵素液を 0.01 M TMB (pH

〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原 1 番地

[§] 連絡先 (Corresponding author), mishiha@eve.u-ryukyu.ac.jp

8.5) に対して透析を行い、同緩衝液で平衡化した DEAE-Cellulose カラム (6×70 cm) に吸着させた。0.15 M NaCl を含む同緩衝液で溶出した画分を、0.01 M TMB に対して透析後、同緩衝液で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラム (4×60 cm) に吸着させた。次に、0.15 M NaCl を含む同緩衝液で溶出された活性画分を 0.008 M KPB (pH 7) に対して透析を行った後、同緩衝液で平衡化した Hydroxyl apatite カラム (1×20 cm) に吸着させた。酵素は、0.02 M の同緩衝液により溶出され、濃縮後上記緩衝液で平衡化した Sephadex G-150 カラム (1×150 cm) を通過させた。得られた活性画分は、0.008 M KPB に対して透析後同緩衝液で平衡化した Hydroxyl apatite カラム (1×20 cm) に吸着させた。カラムを十分に洗浄した後、0.02 M KPB を用いて酵素を溶出した。酵素は粗酵素液から約 2100 倍に精製され、回収率は 9.1% であった (Table 1)。本酵素は電気泳動的に均一であることが確認されたので (Fig. 1)、諸特性を解析した。

AIE の分子量は SDS-PAGE 法により約 42 KDa と推定され、Sekine³⁾ によって報告されている *A. sojae* の中性プロテアーゼ I (NP-I, 41.7 KDa) の分子量と類似していた。また、AIE の等電点は 4.7 と算出された。この値は、NP-I の等電点と同値であった³⁾。また、AIE の至適 pH は 6 付

近であった。NP-I の至適 pH は 7 であると報告されており、若干の差異が認められる⁴⁾。一方、Misaki らは *A. oryzae* 起源の中性プロテアーゼの至適 pH は 6.8~7 であったと報告している¹⁰⁾。酵素間の至適 pH の差異は、酵素活性の測定に用いた基質の違いによるものと思われる。AIE の至適温度は 55℃ 付近であった。本酵素は 40℃ まで安定であったが、45℃ で失活する傾向がみられ、60℃ では完全に失活した。また、本酵素は pH 6~10 の範囲では比較的安定であった。AIE は至適温度と温度安定性においても NP-I とよく似ている。次に、各種阻害剤の影響について調べた結果、AIE は、トリプシンインヒビター、ロイペプチン、フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) などのインヒビターや薬品では阻害されないが、0.1 mM の HgCl₂ や *p*-クロロメルクリ安息香酸 (*p*-CMB) で阻害された (Table 2)。NP-I もセリン酵素に特異的な試薬では阻害されないことより⁴⁾、この点においても AIE と NP-I は類似している。また、本酵素はエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) やオルトフェナントロリン等のキレート剤でも顕著に阻害された。しかし、HgCl₂ 処理酵素は 2-メルカプトエタノール (2-ME) 添加で活性の回復が認められた。また、EDTA 処理酵素は 2-ME 存在下で CaCl₂ を添加すると活性回復が認められた (Fig. 2)。本活性回復の程度は、40 mM 以上の CaCl₂ 添加ではほぼ一定値を推移し、無処理酵素の約 80% に相当した。以上のことから、本酵素の活性発現には SH 基とともに金属イオンが関与していることが示唆された。一方、NP-I は *p*-CMB を 1 mM まで添加しても 10% 程度の阻害率であることが報告されている⁴⁾。さらに、EDTA で失活した NP-I の賦活化には Co²⁺ が効果的であることが明らかにされている⁴⁾。AIE と NP-I は *p*-CMB による阻害程度に差異があるものの、いずれも EDTA で著しく失活するなど類似点が多い。

Table 1 Purification procedure of AIE

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)
Crude enzyme	11319	12566	0.9	100
DEAE-Cellulose	246	10178	41	81
DEAE-Sephadex A-50	105	7114	68	70
Hydroxyl apatite	78	2806	36	27
Sephadex G-150	4	2712	605	27
Hydroxyl apatite	0.6	1140	1900	9.1

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of purified AIE

About 15μg of the purified AIE was applied to a 7.5% polyacrylamide gel at pH 9.4.

Table 2 Effect of protease inhibitors or chemical reagents on AIE

Inhibitors	Remaining activity (%)
Control	100
Trypsin inhibitor (soybean) 20μg/ml	98
Trypsin inhibitor (chicken) 20μg/ml	100
Leupeptin 20μg/ml	100
<i>o</i> -Phenanthroline 0.1 mM	1
Ethylenediaminetetraacetate 0.1 mM	0
Iodoacetate 0.1 mM	99
HgCl ₂ 0.1 mM	0
<i>p</i> -Chloromercuribenzoate 0.1 mM	66
Phenylmethylsulfonylfluoride 0.1 mM	98

After AIE was treated with protease inhibitors or chemical reagents at 37℃ and pH 8.5 for 10 min, the enzyme activity was determined.

Fig. 2 Reactivation of the EDTA-inactivated enzyme

The inactivated AIE, treated with 0.01 mM EDTA at 37°C and pH 8.5 for 10 min, was incubated with CaCl₂ in the presence of 0.1% 2-ME, and then AIE activity was determined.

次に AIE と API を pH 5 または pH 8.5 で 37°C, 60 分間作用させた後, Native-PAGE におけるゲル上の API の変化を調べた. API は, 菌体の煮沸抽出液から前報⁹⁾に準じて精製した. API の蛋白質バンドは, pH 8.5 で変化は認められないが, pH 5 では消失した. この結果は, API が中性域で AIE によって明らかに蛋白質分解を受けることを示しており, 粗酵素液における AP の活性化が弱酸性から中性域で顕著である報告と符合している¹¹⁾.

次に, AP-API 複合体を調製し, 本複合体に対する AIE の作用について調べる目的で, 下記の手順により AP の精製を行った. 最初に, 無細胞抽出液に 10% ポリエチレンイミンを蛋白質 mg 当たり 1 ml 加えた後, 限外ろ過により濃縮し粗酵素液とした. 酵素は, 0.1 M NaCl を含む 0.01 M KPB で平衡化した Sephadex G-50 カラム (4.6×110 cm) を用いるゲルろ過に供した. 活性画分を, 0.05 M KPB で平衡化した Hydroxyl apatite カラム (3×30 cm) に吸着させた後, 0.075 M KPB で活性画分を溶出し, これを DEAE-Toyopearl カラム (1.8×30 cm) に吸着させた. 最後に, 0.01 M 同緩衝液で酵素を溶出し, 精製標品とした. 酵素は粗酵素液より約 360 倍に精製され, 回収率は 1.2% であった (Table 3). 酵素は電気泳動的に均一であり, その分子量は Sephadex G-50 を用いるゲルろ過法により約 25 KDa と算出された. 本 AP に各種濃度のインヒビターを作用させた後残存活性を測定した結果, 6 μg/ml の AP の活性を完全に阻害するのに要する API 量は 3.1 μg/ml であることが判明した (Fig. 3). そこで, あらかじめこの比率で調製した AP-API 複合体溶液に AIE を添加し, 37°C (pH 5) で酵素反応を行なった後, AP および API 活性の変動を調べた. Fig. 4 に示すように, 酵素反応時間の経過とともに API 活性は減少し, それに伴い AP 活性の増大が認められ

Fig. 3 Inhibition rate of alkaline protease by its inhibitor

A fixed amount of AP (6 μg/ml) was incubated with various concentrations of API at 37°C for 5 min, and then remaining protease activity was determined.

Fig. 4 Activation of protease-inhibitor complex by the treatment with AIE

After (6 μg/ml) of AP was incubated with 3.1 μg/ml of API at 37°C and pH 8.5 for 10 min, the reaction mixture was incubated with AIE at 37°C and pH 5 for indicated times, and then the remaining AP(○) and API(●) activities were determined, respectively.

Table 3 Purification procedure of alkaline protease

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)
Crude enzyme	18624	259	0.014	100
Sephadex G-150	831	198	0.24	76
Hydroxyl apatite	4	13	3.2	5
DEAE-Toyopearl	0.6	3	5	1.2

た。以上のことから、AIE は API と AP が複合体を形成していることと無関係に API を分解することが明らかになった。AP の活性化への AIE の関与を明確にするためには、AP-API 複合体に対する AIE の作用を更に詳細に検討する必要がある。

3. 要 約

Aspergillus oryzae W-1 起源のアルカリプロテアーゼインヒビター失活化酵素 (AIE) は各種カラムクロマトグラフィーにより均一に精製された。本酵素の分子量は、SDS-PAGE 法により約 42 KDa と算出され、等電点は 4.7 であった。本酵素の至適 pH は 6 付近であり、至適温度は 55℃ 付近であった。酵素は 40℃ までの温度や pH6~10 の範囲で比較的安定であった。本酵素は、トリプシンインヒビター、ロイペプチン、PMSF などのインヒビターでは阻害されないが、HgCl₂ や *p*-CMB では阻害された。本酵素は EDTA やオルトフェナントロリン等のキレート剤でも顕著に阻害された。しかし、HgCl₂ 処理酵素は 2-ME 添加で活性が回復した。一方、EDTA 処理酵素は 2-ME 存在下で CaCl₂ を添加すると活性の回復が認められた。プロテアーゼ-インヒビター複合体に AIE を pH 5, 37℃ で作用させ

ると、アルカリプロテアーゼ (AP) の活性化が認められた。これらの結果から、AIE は細胞内で AP の活性化に寄与するものと推測された。

文 献

- 1) 山本喜志郎, 林 和也, 酵素化学シンポジウム第 18 集, 21-29 (1962).
 - 2) 林 和也, 醗協誌, **30**, 325-338 (1972).
 - 3) Sekine, H., *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 198-206 (1972).
 - 4) Sekine, H., *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 207-216 (1972).
 - 5) Tatsumi, H., Ogawa, Y., Murakami, S., Ishida, Y., Murakami, K., Masaki, A., Kawabe, H. and Arimura, H., *Mol. Gen. Genet.*, **219**, 33-38 (1989).
 - 6) 石原昌信, 片山寿雄, 平良東紀, 多和田真吉, 小波本直忠, 食科工, **50**, 327-330 (2003).
 - 7) Davis, B.J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
 - 8) Weber, K. and Osborn, M. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
 - 9) Lowry, O.H., Rosenbrough, H.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
 - 10) Misaki, T., Yamada, M., Ogawa, T. and Sawada, J., *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1383-1392 (1970).
 - 11) 当山清善, 杉森恒武, 片桐英郎, 醗工, **38**, 360-365 (1960).
- (平成 15 年 5 月 28 日受付, 平成 15 年 8 月 26 日受理)