Aspergillus oryzae W-1 の アルカリプロテアーゼインヒビター

石原昌信[§], 片山寿雄, 平良東紀,
多和田真吉, 小波本直忠

琉球大学農学部

An alkaline protease inhibitor from
Aspergillus oryzae W-1

Masanobu Ishihara[§], Hisao Katayama, 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 (API) from *Aspergillus oryzae* W-1 was purified to homogeneity by DEAE-Cellulose and Hydroxyl apatite column chromatographies. The molecular mass of the inhibitor was estimated to be 14 KDa by SDS-PAGE and 12.5 KDa by gel filtration on Sephadex G-50 column chromatography; the isoelectric point was 4.6. API was extremely heat stable and retained 100% of its original activity even after heating in a boiling water bath for 5 min in the pH range of 4-6. API exhibited an inhibitory activity against the proteolytic activity of alkaline protease from *A. oryzae* or *A. oryzae* W-1, but not for subtilisin, subtilisin BPN', papain, ficin, bromelain, trypsin and α -chymotrypsin. It was found that the inhibitor was inactivated by the action of the latter seven enzymes.

(Received Dec. 20, 2002; Accepted Apr. 15, 2003)

糸状菌のプロテアーゼについては、Wehmer によって始めて報告されて以来多くの研究が行われている¹⁾。特に、*Aspergillus oryzae* は我国の発酵食品に広く用いられる最も重要な麹菌であり研究例が多い^{2)~4)}。黄麹菌のアルカリプロテアーゼ (AP) は細胞内では不活性体として存在することが古くから知られている。また、同麹菌の粗酵素液中には、プロテアーゼインヒビターの存在が明らかになり、AP とインヒビターの複合体、即ち前駆体が存在するものと考えられている⁵⁾⁶⁾。しかし、本前駆体は精製過程で容易に活性化されることから、精製標品を得るに至っていない。

山本ら⁵⁾は、黄麹菌の細胞内には 2 種類のインヒビター (Inhibitor α および β) が存在することを明らかにし、インヒビターがプロテアーゼによって分解され、これに伴い

AP が活性化される反応機構を想定している。当山ら⁷⁾は、*A. oryzae* W-1 の粗酵素液中に存在する不活性体 AP を pH 5 付近で加温処理すると活性化が起こることを明らかにしている。しかし、AP の活性化機構は未だ詳細には解明されていない。一方、麹菌の AP は蛋白質的に均一に精製され、酵素化学的特性および遺伝子解析が行われており⁸⁾⁹⁾、プレプロ AP の全塩基配列が明らかにされている酵素もある¹⁰⁾。しかし、プレプロ AP の遺伝子配列とインヒビターとの相関については詳細に解析されていない。また、上記 2 種類のインヒビターを均一になるまで精製し、諸性質を明らかにした論文は見当たらない。

そこで本研究では、AP の活性化機構を解明することを前提に、*A. oryzae* W-1 の粗酵素液から 1 種類のアルカリプロテアーゼインヒビター (API) を電気泳動的に均一に精製し、諸性質について調べ、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

アゾアルブミンは Tomarellis の方法¹¹⁾ に準じて合成した。酵素標品の trypsin, α -chymotrypsin, papain, *A. oryzae* AP (Sigma type II), subtilisin BPN' および ficin は Sigma 社より購入した。subtilisin は長瀬産業社の部分精製標品、bromelain は半井化学社製品を用いた。その他の試薬は市販品の特級を用いた。本実験では *A. oryzae* W-1 を供試菌株とした。培地組成は、グルコース 1.0%, ペプトン 0.75%, リン酸第一カリウム 0.5%, 塩化カリウム 0.5% および硫酸アンモニウム 0.05% から成り、pH を 6.5~7.5 に調節した。菌の培養は、5L 容 Jar fermentor を用い、30°C で 48 時間通気攪拌して行った。培養菌体 1.8 kg に 2 倍量の 1 mM リン酸カリウム緩衝液 (KPB, pH 7) を加え、湯浴中で 10 分間煮沸処理し、遠心分離 (12 000 rpm, 20 分間) 後得られた上澄液を粗 API 液として用いた。AP を調製する目的で、小麦フスマ 50 g をシャーレに採り、これに水道水 50 ml を加え、120°C で 20 分間殺菌した後、麹菌の菌糸体を接種した。菌の培養は 30°C で 36 時間静置して行い、得られた小麦フスマ菌体に 10 mM トリスマレイト緩衝液 (TMB, pH 8.5) 500 ml を加えて酵素を抽出した。次に、ガーゼ濾過と遠心分離を順次行い、得られた上澄液に 2 倍量のアセトンを加え、再度遠心分離により沈殿画分を得、室温で乾燥させた。本乾燥粉末を上記 TMB に溶解し、粗 AP (蛋白質 = 2 mg/ml) として用いた。API の活性は、麹菌の AP に API を作用させた後、残存するプロテアーゼ活性を測定して求めた。即ち、酵素反応は AP 0.1 ml に 0.5M TMB (pH 8.5) 0.5 ml, API および基質として 1.25% アゾアルブミン溶液 0.5 ml を加えて総量を 1.5 ml とした反応混液を 37°C で 20 分間保持して行った。本反応混液に 0.4 M トリクロロ酢酸 2 ml を加えて反応を停止し、遠心分離後上澄液の吸光度を波長 400 nm において測定した。各種プロテアーゼに対する API の活性測定も上述の

〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原 1

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

方法に準じた。インヒビターの 1 単位は、プロテアーゼ活性を 50% 阻害する量とし、比活性は蛋白質 1 mg 当たりの単位数とした。SDS-PAGE は、Weber-Osborn らの方法¹²⁾に準じ、0.1% SDS を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた。分子量マーカーには Boehringer Mannheim 社製品の ovalbumin (45 KDa), chymo-trypsinogen A (25 KDa), cytochrome C (12.4 KDa) またはオリエンタル酵母社製品の cytochrome C monomer~hexamer (12.4~74 KDa) を用いた。等電点電気泳動は、2% アンホライン (pH 3.5~10) を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用い、等電点 (pI) は標準物質を用いて作成した検量線から算出した。標準蛋白質には、Sigma 社製品の amyloglucosidase (3.6), β -lactoglobulin A (5.1), carbonic anhydrase II (5.9), myoglobin (7.2), L-lactic dehydrogenase M4 (8.6) を用いた。

実験結果および考察

API を均一に精製する目的で、粗インヒビター溶液を 40~80% 飽和で硫酸分画した後、遠心分離 (12000 rpm, 10 分間) により沈殿画分を得た。次に、これを 20 mM KPB (pH 8) に可溶化した後、事前に同緩衝液で平衡化した DEAE-Cellulose カラム (3.5×70 cm) に吸着させた。緩衝液中の食塩濃度を 0 から 0.5 M まで変えて試料の溶出を行った結果、インヒビターは非吸着画分と吸着画分に分離されたが、吸着画分に比較的高い活性が認められた。そこで、本活性画分を回収し 80% 飽和で硫酸塩析を行い、遠心分離により沈殿画分を得た。さらに、本画分を 2 mM の上記緩衝液に対して透析を行った後、事前に同緩衝液で平衡化した Hydroxyl apatite カラム (1.7×16 cm) に吸着させた。試料の溶出は、同緩衝液の濃度を 2 mM から 50 mM まで直線的に変えて行った。得られた活性画分を電気泳動に供した結果、pH 9.4 の Native-PAGE において蛋白質に由来するバンドが 1 本検出された (Fig. 1)。また、本蛋白質バンドの位置にインヒビター活性が認められたことから、API は均一に精製されているものと判断された。API は、粗標品から約 20 倍に精製され、収率は約 6% であった (Table 1)。API の分子量は、Sephadex G-50 (1.1×110 cm) を用いたゲル濾過法により 12.5 KDa, SDS-PAGE 法により 14 KDa と算出された。また以上の結果から、API はモノマー型であることが明らかになった。一方、*A.*

oryzae の粗酵素液を酸処理して得られた粗インヒビターの分子量は 17 KDa と報告されている⁶⁾。また、API の pI は 4.6 と算出され、AP (pI=5.1)³⁾ と同様弱酸性蛋白質であることがわかった。Inhibitor α の pI は 9.5 と報告されていることから、API は Inhibitor β に相当するものと推測される。

次に API の pH 安定性を調べる目的で、試料に pH 1~12 の各種緩衝液を加え、37°C で 20 分間加温処理した後残存活性を測定した。その結果、API は pH 4~8 の領域では 100% の活性を保持することがわかった。一方、API を 5 分間各種 pH で煮沸処理すると、pH 4~6 の弱酸性領域では活性の低下は認められないが、pH 1~3 の酸性領域では約 15~20% の活性低下が認められた (Fig. 2)。これらの結果は、API が熱安定性であることを示しており、Inhibitor α と似ている。API は *A. oryzae* および *A. oryzae* W-1 の AP に対して強い阻害活性を示したが、subtilisin や subtilisin BPN' には濃度を変えても阻害作用は認められなかった (Fig. 3)。また、実験に用いた他のプロテアーゼに対する阻害活性も認められなかった。麹菌 AP と subtilisin は活性部位のアミノ酸配列⁸⁾ が類似しているが、API による阻害作用に差異がみられるのは酵素の立体構造の違いによるものと推測される。*A. oryzae* および *A.*

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of purified inhibitor

About 20 μ g of the inhibitor was applied to a 7.5% polyacrylamide gel at pH 9.4.

Table 1 Summary of alkaline protease inhibitor purification from *Aspergillus oryzae* W-1

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)
Crude inhibitor	18 297	18 468	1	100
Ammonium sulfate fractionation (40~80%)	2 350	10 423	4.4	56
DEAE-Cellulose	1 257	9 167	7.2	50
Hydroxyl apatite	57	1 120	19.6	6

Fig. 2 Effect of pH on the stability of inhibitor

The API was incubated at various pHs at 37°C for 20 min (○) or in boiling water bath for 5 min (●), and then residual inhibitory activity was assayed. Buffer used: acetate buffer (pH 1-5), phosphate buffer (pH 6-8), glycine buffer (pH 8-12).

Fig. 3 Inhibitory activities against various proteases

Protease and inhibitory activities were measured by the procedure described in Materials and Methods. ○, *A. oryzae* alkaline protease (50 μg/ml); ●, *A. oryzae* W-1 alkaline protease (100 μg/ml); △, subtilisin (2.5 μg/ml); □, subtilisin BPN' (1.6 μg/ml).

oryzae W-1 の AP (50 μg/ml) の活性を 50% 阻害するのに要する API 量は、それぞれ 6.4 μg/ml および 5.4 μg/ml であり、ほぼ同等の活性を示すことがわかった。また、API は同属麹菌の AP に対して阻害活性を示すことが確認された。次に、API に上述の各種プロテアーゼを 37°C で 20 分間作用させた後、5 分間煮沸して反応を停止し、残存インヒビター活性を測定した。その結果、API 活性は subtilisin, subtilisin BPN', papain, ficin, bromelain, trypsin および α-chymotrypsin により低下した (Table 2)。これは、API がペプチド様であることを示しており、

Table 2 Inactivation of API by various proteases

	Concentration (μg/ml)	Inhibitor activity (%)
Control		100
Papain	7	0
Ficin	1	8
Bromelain	6.6	30
Trypsin	5	0
α-Chymotrypsin	2	27
Subtilisin	1	5
Subtilisin BPN'	1	4

The inhibitor was incubated with various proteases at 37°C for 20 min, and the reaction was stopped by boiling for 5 min. The residual inhibitory activity was assayed.

280 nm 付近に吸収極大値を有することと符合する。また、*A. oryzae* W-1 の粗酵素液によっても API の分解反応が認められるが (図表無し)、これは AP 以外のプロテアーゼの作用によるものと推測される。現在、AP の活性化には酸性または中性プロテアーゼが関与しているものと考えられている。事実、供試菌株の粗酵素液中には pH 5 付近に最適 pH を有する API 失活化酵素の存在が確認されている (未発表)。今後、本酵素の API の分解性や AP 活性化への関与を明らかにする必要があると思われる。

要 約

Aspergillus oryzae W-1 のアルカリプロテアーゼインヒビター (API) は、DEAE-Cellulose および Hydroxyl apatite カラムクロマトグラフィーにより均一に精製された。API の分子量は SDS-PAGE 法により 14 KDa, Sephadex G-50 を用いるゲル濾過法で 12.5 KDa と算出され、等電点は 4.6 であった。API は著しく熱安定性であり、pH 4~6 の範囲内で 5 分間煮沸処理後でも処理していないものと同等の活性を保持した。API は *A. oryzae* や *A. oryzae* W-1 の AP に対して阻害活性を示したが、subtilisin, subtilisin BPN', papain, ficin, bromelain, trypsin および α-chymotrypsin に対する阻害作用は認められなかった。一方、API は後者の 7 つのプロテアーゼによって不活性になることが明らかになった。

文 献

- 1) 一島英治, プロテアーゼ研究の進歩, バイオサイエンスとインダストリー, **48**, 1161-1166 (1990).
- 2) Sekine, H., Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae* - some enzymatic properties -, *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 207-216 (1972).
- 3) 林 和也, こうじかびのアルカリプロテアーゼ —その構造と機能—, 化学と生物, **11**, 82-89 (1973).
- 4) Ogawa, Y., Tatsumi, H., Murakami, S., Ishida, Y., Murakami, K., Masaki, A., Kawabe, H., Arimura, H., Nakano, E. and Motai, H., Secretion of *Aspergillus oryzae* alkaline protease in an osmophilic yeast,

- Zygosaccharomyces rouxii*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2521-2529 (1990).
- 5) 山本喜志郎, 林 和也, *Aspergillus sojae* の cell-free-extract 中の protease-inhibitor とその失活, 酵素化学シンポジウム第 18 集, 21-29 (1962).
 - 6) 松嶋欽一, 嶋田 協, 麹菌の無細胞抽出液中に存在するアルカリプロテアーゼ・インヒビターについて, 三重大学農学部紀要, **49**, 139-147 (1975).
 - 7) 当山清善, 杉森恒武, 片桐英郎, 麹菌のプロテアーゼの生成について (第 2 報) Inactive protease の活性化因子に関する検討, 醸工, **38**, 360-364 (1960).
 - 8) Tatsumi, H., Ogawa, Y., Murakami, S., Ishida, Y., Murakami, K., Masaki, A., Kawabe, H., Arimura, H., Nakano, E. and Motai, H., A full length cDNA clone for the alkaline protease from *Aspergillus oryzae*: structural analysis and expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.*, **219**, 33-38 (1989).
 - 9) Murakami, K., Ishida, Y., Masaki, A., Tatsumi, H., Murakami, S., Nakano, E., Motai, H., Kawabe, H. and Arimura, H., Isolation and characterization of the alkaline protease gene of *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2807-2811 (1991).
 - 10) Cheevadhanarak, S., Renno, D.V., Saundara, G. and Holt, G., Cloning and selective over expression of an alkaline protease - encoding gene from *Aspergillus oryzae*. *Gene*, **108**, 151-155 (1991).
 - 11) Tomarellis, R.M. and Charney, J., The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity., *J. Lab. Cli. Med.*, **34**, 428-433 (1949).
 - 12) Weber, K., and Osborn, M., The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- (平成 14 年 12 月 20 日受付, 平成 15 年 4 月 15 日受理)
-