Aspergillus Proteinase に関する研究 (第2報) *Aspergillus melleus* の
産生する微アルカリプロテイナーゼの精製結晶化ならびに
酵素化学的性質について (酵素剤の研究 第38報¹⁾)

伊藤万蔵, 杉浦 衛
岐阜薬科大学²⁾

Studies on *Aspergillus* Proteinase. II. Purification, Crystallization and
Some Properties of Semi-Alkaline Proteinase from *Aspergillus*
melleus (Studies on Enzymes. XXXVIII¹⁾)

MANZO ITO and MAMORU SUGIURA
Gifu College of Pharmacy²⁾

(Received May 30, 1968)

A semi-alkaline proteinase of *Aspergillus melleus* has been purified approximately 15.7-fold from a culture extract by pH treatment, lead subacetate treatment, decolorization with Amberlite IRA93, fractionation with ethanol and ammonium sulfate, dialysis, treatment with acrinol and acid clay, precipitation with acetone, and gel-filtration on Sephadex G75.

The purified proteinase obtained as needle crystals or pillar-shaped crystals was mono-disperse in both the ultracentrifugation pattern and the moving-boundary electrophoresis.

The optimum pH and temperature for the activity were 8 and 50°, respectively. At 20°, the enzyme was highly stable at the range of pH 5 to 9.

Metallic salts except HgCl₂, AgNO₃ and FeCl₃, sulfhydryl reagent, reducing and oxidizing reagents tested had no effect on the activity, but potato trypsin inhibitor, soy-bean trypsin inhibitor, di-isopropyl-fluorophosphate and N-bromosuccinimide caused a marked inhibition.

前報において *Aspergillus melleus* の産生するプロテイナーゼのうちアクリノールとコンプレックスを形成しないアルカリプロテイナーゼの精製を行ない電気泳動的, 超遠心的に均一な結晶酵素を単離し, その酵素化学的性質について検討した.¹⁾ 今回はアクリノールとコンプレックスを形成するプロテイナーゼの精製を行ない電気泳動的, 超遠心的, N 末端的に均一な結晶酵素を得たので報告する.

実 験 の 部

実験方法

1. 供試菌株 本実験には *Aspergillus melleus* No. 2981 菌を使用した.
2. 菌株の培養および酵素の抽出 前報に準じて行なった.¹⁾
3. 酵素活性測定法および蛋白定量法 前報に準じて行なった.¹⁾
4. チゼリウス電気泳動および超遠心分析 前報に準じて行なった.¹⁾
5. ゲル濾過 膨潤した Sephadex G75 をゲル量の2倍量の 1M 食塩溶液で5回洗浄, ついで 0.1M 食塩溶液で5回洗浄し, 直径 1.8 cm のカラムにゲル容積 200 ml を充填した. 充填後カラムに 0.1M 食塩を含む 0.01M リン酸緩衝液 (pH 6.0) を 24 hr 通液し (流速 10 ml/hr), 酵素試料を負荷し, 同じ緩衝液で展開した. 展開温度は 10°, 1 分画は 5 ml とし適宜希釈後, 蛋白 (280 mμ) およびプロテイナーゼ活性 (660 mμ) を測定した.
6. 濾紙電気泳動 東洋濾紙 No. 50 の 4×40 cm 濾紙を緩衝液でしめした後懸垂し, 30 min 放置後濾紙保持わくに固定し泳動槽にセットした. 緩衝液が平衡に達するのを待って (約 2 hr) 通電する. 1 hr 後電流を切り

1) 第 37 報: 伊藤万蔵, 杉浦衛, 薬誌, 88, 1576 (1968); 本報告の要旨は日本薬学会第 86 年会で発表, 富山, 1966 年 4 月.

2) Location: Mitahora 492-36, Gifu.

濾紙の中央に同じ緩衝液で溶解した 20% 酵素液 0.05 ml を線状につけ泳動を開始した。4 hr 泳動後電流を絶ち、濾紙をわくに付けたままヘヤードライヤーで乾燥し、5 mm 間隔に切断した。切断した濾紙片は試験管に入れ、0.1M 食塩水 5 ml で 1 枚ずつ抽出し 280 m μ の吸収およびニンヒドリンによる比色定量法 (570 m μ)³⁾ により蛋白を定量した。また抽出液を 110 倍に希釈してプロティナーゼ活性を測定した。

なお電極槽に塩化カリウム溶液を用いると陽極より塩素が発生し酵素を失活させるので硫酸カリウムの 3% 溶液を用いた。また緩衝液はイオン強度 0.1 のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を用い、濾紙の水平部分の長さ 16.0 cm、緩衝液の液面から濾紙の水平部分までの距離 4 cm、電圧 240V、電流 2mA の条件で泳動を行なった。

7. 溶解度 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中に 2.5M の濃度になるように硫酸アンモニウムを溶かした溶媒 49 ml に 0.5—50 mg/ml の酵素液を 1 ml 加え混合し、5°, 24 hr 放置後遠心分離 (12000 rpm, 15 min) し、上清の 280 m μ における吸収およびさらに 110 倍希釈してプロティナーゼ活性を測定した。

8. アミノ末端 アミノ末端は DNP 法⁴⁾ によって行なった。

DNP 化——0.3 g の結晶酵素を等量の炭酸水素ナトリウムと 3 ml の水に溶解し、これに FDNB⁵⁾ の 5% (v/v) エタノール溶液 6 ml を加え、時々攪拌しながら室温で 3 hr 放置した。生じた黄色の DNP 蛋白は遠心分離しエタノールで数回洗浄、(上記のように DNP 化とエタノール沈殿を同時に行ないエタノールで洗浄すれば FDNB の加水分解によって生じた 2,4-dinitrophenol および DNP 化の副産物である 2,4-dinitroaniline はほぼ完全に除去され、ペーパークロマトグラフィーにおいてスポットが現われない)。つづいて塩酸性懸濁液としエーテルで数回洗浄し、最後に水、アセトン、エーテルで遠心して洗い塩化カルシウム上で減圧乾燥した。

加水分解と DNP アミノ酸の抽出——DNP 蛋白の加水分解は再蒸留した定沸点塩酸 (共沸混合物, bp 108.6°, (760 mmHg), 20.2% (w/w), 6 N) の 100 倍量で封管中 105° で 4, 8, 16 および 24 hr 加水分解した。加水分解液は小さい分液ロートにうつし封管の壁を 2N 塩酸で洗って合しエーテル抽出した。

ペーパークロマトグラフィー——抽出したエーテル層および水層は別々に濃縮し、エーテル層は Levy の方法⁶⁾ にしたがってトルエン、クロロエタノール、ピリジン、0.8N アンモニア (5:3:1.5:3 v/v)⁷⁾ のいわゆるトルエン系を 1 次元展開液とし、1.5M リン酸緩衝液 (pH 6) を 2 次元展開液に用いてペーパークロマトグラフィーを行なった。また水層は *tert*-アミルアルコールフタル酸塩緩衝液系⁸⁾ を用い 1 次元展開した。

9. N 斑点図形⁹⁾ 再結晶の操作において結晶化容器にスライドガラスを入れ、その表面にプロティナーゼの結晶を成長させる。微細結晶の付着したスライドガラスを冷エタノールでよく洗浄後、塩化カルシウム上で真空乾燥し、これにカーボン膜をうすく蒸着せしめ、3 mm² の大きさに傷をつけアルコール中に浸すと微細結晶の付着したカーボン皮膜が剥離してくる。これをメッシュにはり日本電子製電子顕微鏡 (JEM-7) を用い極微回折法により電子線回折を行ない N 斑点図形を得た。

実験結果

1. 酵素の結晶化 酵素抽出液 (麴 20 kg より 30 liter, プロティナーゼ総活性 931000 単位, 可溶性固形分 2550 g, 蛋白量 1149g, pH 6.4) に 10% 水酸化カルシウム液を攪拌しながら徐々に加え pH を 8.0 に調整し、生じた沈殿を遠心除去後、さらに 30% 塩基性酢酸鉛液を少量ずつ pH 7.0 まで加え (1.0 kg), 生じた沈殿を遠心除去し淡黄色澄明な酵素液を得た。

この液を酢酸型のイオン交換樹脂 Amberlite IRA 93 のカラムに通し脱色した。通液条件は酢酸鉛処理酵素液を 20 mesh の Amberlite IRA 93 の酢酸型樹脂を 2 liter 充填した内径 6.5 cm, 長さ 100 cm のアクリル製カラムに SV 2 (SV=space velocity, 1 hr の処理量 (liter)/充填樹脂量 (liter)) で通液した。

カラム通過液 (pH 5.5—6.0) を 5° に冷却し、-15° のエタノールを攪拌しながら徐々に加え、エタノール濃度 50 から 65% (v/v) で沈殿する分画をとり、蛋白濃度が 5% になるように精製水で溶解した (1600 ml)。これに硫酸アンモニウム飽和溶液を加え 0.4 飽和とし、生じた沈殿を除去後、粉末硫酸アンモニウムを加えて 0.7 飽和まであげ、一夜 5° に放置後遠心分離し、沈殿を蛋白濃度が 5% になるように精製水で溶解した (1200 ml)。これをセロファンチューブに入れ水道水に対し 1 日、精製水に対し 1 日透析を行なった。透析内液は蛋白濃度を 3% に調整し、2% アクリノール液を少量ずつ加え濃褐色の不純物が沈殿しなくなったら、さらに 2% アクリノール液を 250 ml 加えて 12000 rpm で 15 min 間遠心分離した。沈殿した鮮黄色のアクリノール・プロティナーゼコンプレックスを 1M 酢酸ナトリウム (pH 6.5) にすばやく溶解し (1000 ml), (コンプレックスはそのまま放置すると不溶性になる)。十分活性化した酸性白土 (100 g) を加えてアクリノールを吸着除去して得られた酵素

3) S. Moore, W.H. Stein, *J. Biol. Chem.*, **176**, 367 (1948).

4) 岩井浩一, 藤岡英子, “蛋白質・核酸・酵素, 生物化学実験法 I, 蛋白質およびペプチドの末端構造分析”, 共立出版, 東京, 1963, p. 5. DNP; 2,4-dinitrophenyl.

5) FDNB: 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene.

6) A.L. Levy, *Nature*, **174**, 126 (1954); H. Fraenkel-Conrat, J.I. Harris, A.L. Levy, “Methods of Biochemical Analysis,” Vol. II, ed. D. Glick, Academic Press Inc., N.Y., 1955, p. 359.

7) G. Biserte, R. Ostewx, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 50 (1951).

8) S. Blackburn, A.G. Lowther, *Biochem. J.*, **48**, 126 (1951).

9) 水渡英二, 植田夏“実験化学講座 4 巻, 固体物理化学”, 第 2 版, 日本化学会編, 丸善, 東京, 1965, p. 301.

液 (920 ml) に, -10° のアセトンを 50% (v/v) になるように加え酵素を沈殿させた. このアセトン沈殿によりわずかに夾雑しているアクリノールも完全に除去され白色の酵素が得られる.

ここに得られた沈殿を約 15% の蛋白濃度になるよう精製水に溶解し, Sephadex G 75 を用いゲル濾過を行なった. Fig. 1 はその結果を示すものでフラクションナンバー 28 から 35 番にプロティナーゼのピークが存在し, 50 番付近にもプロティナーゼ活性を持たない蛋白のピークが認められた. そこでプロティナーゼのピークのみを集め 5% に濃縮して, -15° のアセトンをわずかに濁りが認められるまで加え (通常 20% (v/v)), フリーザー中

TABLE I. Purification of Semi-Alkaline Proteinase from *Aspergillus melleus*

Step of procedure	Total activity (U)	Total protein (g)	Total volume (ml)	Specific activity (U/mg P)	Recovery of activity (%)
Culture extract	931000	1149	30000	0.81	100.0
pH treatment	796000	330.3	28700	2.41	85.5
Lead subacetate treatment	608000	110.9	31500	5.48	65.3
Amberlite IRA 93 treatment	588000	106.9	32000	5.50	63.2
Ethanol fractionation	518000	79.1	1600	6.55	55.6
Ammonium sulfate fractionation	433000	61.2	1200	7.08	46.5
Dialysis	408000	57.4	1900	7.11	43.8
Acrinol fractionation	282000	33.2	1000	8.49	30.3
Acid clay treatment	172000	20.2	920	8.51	18.5
Acetone precipitation	135000	15.9	105	8.49	14.5
Sephadex G 75 gel-filtration	130000	10.2	2300	12.75	14.0
Crystallization	88000	6.93	140	12.70	9.45
Recrystallization	65000	5.12		12.70	7.00

Fig. 1. Gel-Filtration of Semi-Alkaline Proteinase from *Aspergillus melleus* by Sephadex G 75

Two ml of the enzyme solution (15%) was applied to a Sephadex G 75 column, 1.8×90 cm, buffered previously with $0.01M$ phosphate buffer (pH 6) containing $0.1M$ NaCl.

Chromatogram was developed by same buffer at a flow rate of 10 ml per hour, and the effluent was collected in 5 ml portions. A: $E_{280}^{1\%} = 7.98$, B: $E_{280}^{1\%} = 18.5$

— protein (280 mμ) - - - - activity (660 mμ)

Fig. 2. Microphotograph of Crystalline Semi-Alkaline Proteinase of *Aspergillus melleus* ($\times 400$)

に放置すると容器の壁より結晶が析出し, 72 hr で約 70% の酵素蛋白が結晶化した. ここに得られた結晶酵素は $0.01M$ 酢酸カルシウム (pH 6.5) で蛋白濃度が 5% になるように溶解し, 同様アセトンを加え再結晶を行なうと 1 週間後には扇状に柱状結晶が集まりほぼ結晶化が完了した. なお再結晶酵素の収量は麴 20 kg より 5.12 g であり, 比活性は $PU_{\text{per } 157^{\circ} \text{C}}^{\text{cas. ST. FRB}} / \text{mg protein} = 12.70$ であった.

2. 酵素蛋白の均一性について 電気泳動—Fig. 4 に示すように結晶プロティナーゼはチゼリウス電気泳動的に均一であった. また Fig. 5 に示すように濾紙電気泳動的にも均一であった.

超遠心分析—Fig. 6 に示すように結晶プロティナーゼは超遠心的に均一であった.

ゲル濾過—結晶プロティナーゼ 20 mg, グルコース 10 mg およびブルーデキストラン 10 mg を $0.1M$ 食塩

Fig. 3. Net-Like Pattern of Crystalline Semi-Alkaline Proteinase of *Aspergillus melleus*

Fig. 4. Electrophoretic Pattern of *Aspergillus melleus* Semi-Alkaline Proteinase

6 mA, 50 V, sodium phosphate buffer, pH 6.7, $\mu=0.1$

Fig. 5. Paper Electrophoresis Pattern of Crystalline Semi-Alkaline Proteinase

conditions: $m/15$ phosphate buffer, pH 7.0; 10 volts per cm, 0.5 mA per cm
Toyoroshi No. 50, 4×40 cm
optical density at 280 mμ (●)
optical density at 660 mμ by casein-Folin method (○)
optical density at 570 mμ by ninhydrin colorimetric method (x)

2 ml に溶解し, Sephadex G 75 (1.8×90 cm) によるゲル濾過を行なった。Fig. 7 はそのパターンを示すもので蛋白的に均一であった。

溶解度法による純度の検定——Fig. 8 は結晶プロティナーゼの溶解度曲線を示す。この溶解度曲線より明らかに本酵素は固溶体もつくらず明瞭な飽和点が認められ単一の酵素と考えられる。

アミノ末端による純度の検定——結晶プロティナーゼのアミノ末端を DNP 法により検討した。その結果 Fig. 9 に示すようにアミノ末端はセリンただ 1 つでアミノ末端的に均一であった。なお同定に使用した DNP アミノ酸は和光純薬の標準品を用いた。

紫外線吸収スペクトル——Fig. 10 は結晶プロティナーゼの紫外線吸収スペクトルを示す。吸収極大 280 mμ, 吸収極小 252 mμ, 吸収極大/吸収極小比 2.86, 280/260 mμ 比は 2.18 であった。

また, 280 mμ/260 mμ 吸収比よりみて結晶酵素中には核酸の混在は考えられない。

プロティナーゼ以外の酵素活性——麴から水抽出した酵素液にはプロティナーゼ以外に α アミラーゼ, リパー

Fig. 6. Ultracentrifugal Pattern of *Aspergillus melleus* Semi-Alkaline Proteinase

The enzyme was dialyzed overnight against 0.005 M phosphate buffer solution, pH 6.5, in which sodium chloride was added to adjust the ionic strength to 0.1.

Ultracentrifugal analysis was operated at 60000 rpm and 20° for 80 minutes with 3% enzyme solution.

Fig. 8. Solubility Curves of Crystalline Semi-Alkaline Proteinase from *Aspergillus melleus*

solvent: 2.5 M ammonium sulfate solution in 0.1 M acetate buffer at pH 5.0

○—○ protein, 280 mμ ●—● activity, 660 mμ

Fig. 7. Gel-Filtration Chromatogram of a Mixture of Crystalline Semi-Alkaline Proteinase (20 mg), Blue Dextran (MW 2×10^7 , 10 mg), and Glucose (10 mg) on Column (1.8 × 90 cm) of Sephadex G 75

Chromatography conditions were the same as described in Fig. 1.

----- optical density at 280 mμ

— optical density at 660 mμ

glucose: Somogyi-Nelson method, 660 mμ

blue dextran: absorption at 660 mμ

semi-alkaline proteinase, protein: absorption at 280 mμ

activity: casein-Folin method, 660 mμ

Fig. 9. Paper Chromatogram of Amino-Terminal Amino Acid of Semi-Alkaline Proteinase from *Aspergillus melleus*

paper: 50 × 50 cm, Toyoroshi No. 50

solvent: toluene system

toluene-chloroethanol-pyridin-0.8 N ammonia water (5:3:1.5:3 vol/vol)

phosphate system

1.5 M sodium phosphate buffer (pH 6.0)

ゼ, セルラーゼ, アルカリフォスファターゼ, AMP デアミナーゼなどの酵素活性が認められたので, 再結晶酵素を使用してこれらの諸酵素の活性を測定した. すなわち, α-アミラーゼは Gomori 法 (pH 5.0, 酢酸緩衝液),¹⁰⁾ リパーゼは Bunch-Emerson 法 (pH 7.0, リン酸緩衝液),¹¹⁾ セルラーゼは CMC-Na を基質にした Somogyi 法

10) G. Gomori, *Am. J. Clin. Path.*, **27**, 714 (1957).

11) L.D. Bunch, R.L. Emerson, *Clin. Chem.*, **2**, 75 (1956).

Fig. 10. Ultraviolet Absorption Spectrum of Semi-Alkaline Proteinase from *Aspergillus melleus*

Absorption of the enzyme protein was determined in 0.01 M sodium phosphate buffer at pH 6.0. Extinction coefficient at 280 mμ, $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 7.98$

Fig. 11. Effect of pH on Proteinase Activity of Semi-Alkaline Proteinase from *Aspergillus melleus*

Reaction mixture contained 1 ml of enzyme solution (0.005 mg/ml) and 1 ml of 2% milk casein in Britton-Robinson buffer solution at various pH values. The mixture was incubated 37° for 30 minutes and activity was assayed by the casein-Folin method. Concentration of TCA solution used was 0.44 mole.

Fig. 12. Effect of Temperature on Proteinase Activity of Semi-Alkaline Proteinase from *Aspergillus melleus*

Reaction mixture contained 1 ml of proteinase solution (0.001 mg/ml) and 1 ml of 2% milk casein solution dissolved in 1/15 M phosphate buffer, pH 8.0. The mixture was incubated at indicated temperature and activity was assayed by the casein-Folin method.

incubation time: Δ 15 min $\circ$ 30 min $\times$ 45 min $\bullet$ 60 min

した。その結果 Fig. 13 に示すように pH 5-9 において安定であった。

温度安定性——Fig. 14 は結晶プロテイナーゼの温度安定性を示したものである。50°まではほぼ安定であるが 50°を越えると急激に失活した。また熱失活の始まる温度は 48.5°付近と推察される。

4. 金属塩および阻害剤の影響 金属塩の影響——プロテイナーゼ活性におよぼす金属イオンの影響について検討した。その結果 Table II に示すように反応系で 10^{-3}M および 10^{-4}M の濃度においてはほとんど阻害が認められなかったが、 10^{-2}M においては Hg^{2+} , Ag^+ , Fe^{3+} などの重金属イオンには阻害作用が認められ、特に Hg^{2+} は顕著であった。

(pH 4.5, 酢酸緩衝液),¹²⁾ アルカリフォスファターゼは Bessey 法 (pH 9.5, グリシン-NaCl-NaOH 緩衝液),¹³⁾ AMP-デアミナーゼは Letnansky 法 (pH 5.5, 酢酸またはリン酸緩衝液)¹⁴⁾ に準じて活性を測定した。その結果いずれの酵素の活性も認められなかった。

3. 酵素化学的性質 プロテイナーゼ活性におよぼす pH の影響——結晶プロテイナーゼの活性におよぼす pH の影響を検討した。その結果 Fig. 11 に示すようにカゼイン基質の場合には pH 8 付近が最も活性が高く、pH 6 では 85%, pH 10 では 75% の相対活性を示した。

プロテイナーゼ活性におよぼす温度の影響——Fig. 12 は結晶プロテイナーゼの活性におよぼす温度の影響を示したものである。プロテイナーゼ活性は 45°付近までは漸次上昇するが 50°を越えると活性の低下が認められた。

また至適温度は反応時間により異なり、反応時間が長くなると低下し 45°付近であるが、反応時間が短くなると上昇し 15 min 反応では 50°であった。

pH 安定性——結晶プロテイナーゼを各 pH 値の Britton-Robinson の広域緩衝液 (1)¹⁵⁾ で 1% の濃度に溶解し、20°, 1 hr 放置後、pH 8.0 にもどし残存活性を測定

12) 西沢一俊, 小林敏雄, 農化, 27, 239 (1953).

13) O.A. Bessey, O.H. Lowry, M.J. Brock, *J. Biol. Chem.*, 164, 321 (1946).

14) K. Letnansky, F. Seelich, *Klin. Wschr.*, 36, 826 (1958).

15) H.T.S. Britton, R.A. Robinson, *J. Chem. Soc.*, 1931 458, 1456.

Fig. 13. pH-Stability of Semi-Alkaline Proteinase from *Aspergillus melleus*

Enzyme solutions of various pH values, containing 10 mg/ml, were incubated at 20° for 1 hour. After incubation, each enzyme solution was adjusted to pH 8.0 and residual activity was measured. Buffer used was Britton-Robinson buffer (1).

Fig. 14. Thermal Stability of *Aspergillus melleus* Semi-Alkaline Proteinase

5 ml of 1% enzyme solution in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0 was incubated at indicated temperatures in a water bath. After incubation the solution was immediately cooled in an ice water bath and the remaining activity was assayed by casein-Folin method.

● 10 min × 20 min △ 30 min ○ 40 min

TABLE II. Effect of Metal Ions on Proteinase Activity of Semi-Alkaline Proteinase from *Aspergillus melleus*

Salt	Relative activity (%)		
	10 ⁻² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M
None	100	100	100
NaCl	106	103	101
KCl	108	103	103
CaCl ₂	105	105	102
BaCl ₂	103	101	98
Al ₂ (SO ₄) ₃	78	98	100
CoCl ₂	96	103	101
NiSO ₄	92	98	100
ZnSO ₄	98	100	100
CuSO ₄	96	96	99
FeSO ₄	91	95	99
FeCl ₃	68	92	96
MnCl ₂	92	97	100
Pb(OAc) ₂	98	102	100
HgCl ₂	3	92	100
AgNO ₃	59	85	100

One ml of 4% casein solution in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 was mixed with reagent solution of 1 ml (final concentration, 10⁻² M, 10⁻³ M and 10⁻⁴ M), and incubated for 10 minutes at 37°.

Then 1 ml of proteinase solution (0.01 mg/ml) in the same buffer was added and the incubation was continued for further 30 minutes. The enzyme activity was estimated by casein-275 mμ method.

阻害剤の影響——Table III は各種阻害剤のプロテイナーゼ活性におよぼす影響を示したものである。表に示すようにモノヨード酢酸, pCMB のような SH 試薬にも, EDTA, o-phenanthroline のようなキレート試薬にもほとんど活性阻害は認められなかった。また過酸化水素, 過マンガン酸カリウムのような酸化剤, チオグリコール酸ナトリウム, チオ硫酸ナトリウム, アスコルビン酸, システイン, シアン化カリウムのような還元剤もほ

とんど活性発現には関係がないが、ヨウ素、NBS¹⁶⁾では著しい阻害作用が認められた。

また、天然に存在する PTI および STI で顕著な阻害が認められ、セリン酵素の阻害剤である DFP でも活性阻害が認められた。

TABLE III. Effect of Some Inhibitors on Proteinase Activity of Semi-Alkaline Proteinase from *Aspergillus melleus*

Inhibitor	Relative activity (%)		
	10 ⁻² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M
None	100	100	100
EDTA-2Na	96	98	98
<i>o</i> -Phenanthroline		98	100
Hydrogen peroxide	100	103	101
Potassium permanganate	98	99	99
Iodine	0	35	98
Sodium thioglycolate	103	98	99
Sodium thiosulfate	100	100	103
Ascorbic acid	100	100	100
L-Cysteine	95	98	100
Potassium cyanide	98	98	103
<i>p</i> -Chloromercuribenzoate		97	99
Monoiodoacetate	95	98	99
N-Bromosuccinimide	8	91	98
Sodium laurylsulfate	75	98	100
Potato trypsin inhibitor			0 ^{a)}
Soy-bean trypsin inhibitor			8 ^{a)}
Diisopropylfluorophosphate		15	38

The reaction conditions were the same as described in Table II.

a) Crystalline inhibitor (final concentration, 0.1%) was used.

考察および結論

Aspergillus melleus の産生するプロテイナーゼの一種で、アクリノールとコンプレックスを形成するプロテイナーゼの精製結晶化を行ない電気泳動的、超遠心的、N 末端的に単一な結晶酵素をうることに成功した。結晶酵素の酵素化学的性質は至適 pH 8.0, 至適温度 50°, 温度安定性は 50° まで安定であるが、65°, 10 分の加熱で完全に失活した。pH 安定性は中性付近にあり pH 5.0 から 9.0 の範囲内で安定であった。

金属イオンの影響は Ag⁺, Hg²⁺, Fe³⁺ などの重金属イオンが 10⁻²M (反応系濃度) において著しい阻害作用を示し、とくに Hg²⁺ はその作用が顕著であった。

また本酵素は至適 pH が中性プロテイナーゼとアルカリプロテイナーゼの中間に位し、松島の阻害剤による糸状菌プロテイナーゼの分類¹⁷⁾ にはみられない新しい型のプロテイナーゼであり、至適 pH より微アルカリプロテイナーゼと思われる。

16) N-bromosuccinimide.

17) 松島欽一; 農化, 32, 215 (1958).