Aspergillus Proteinase に関する研究 (第4報¹⁾) *Aspergillus melleus* の

産生する微アルカリプロテイナーゼによる蛋白の加水分解

(酵素剤の研究 第42報²⁾)

杉浦 衛, 伊藤万蔵

岐阜薬科大学³⁾

Studies on *Aspergillus* Proteinase. IV.¹⁾ Hydrolysis of Protein by

Semi-Alkaline Proteinase from *Aspergillus melleus*

(Studies on Enzymes. XLII²⁾)

MAMORU SUGIURA and MANZO ITO

Gifu College of Pharmacy³⁾

(Received January 13, 1969)

The extent of hydrolysis of milk casein by the semi-alkaline proteinase from *Aspergillus melleus* was compared with that by α -chymotrypsin, trypsin, pepsin, etc. The data obtained indicated that 65% of the milk casein was hydrolyzed by the semi-alkaline proteinase (100 units casein). This value was about 4.5 times greater than that by α -chymotrypsin. Milk casein hydrolyzed with the above animal proteinases was further hydrolyzed by the semi-alkaline proteinase. On the contrary, animal proteinases reacted slightly with milk casein hydrolyzed by the semi-alkaline proteinase. These results suggest that the semi-alkaline proteinase was better as a digestive enzyme.

近年酵素化学の著しい発展にともない各種起源の微生物酵素が開発され、消化酵素として繁用されるようになった。そして消化酵素剤の評価法も多く研究者により改良され、考案されてきている。たとえば、岡崎等⁴⁾は制酸剤の動的試験法⁵⁻¹¹⁾に着目し、その1つである Fuchus 法⁷⁾を改変することにより胃液の分泌を考慮に入れた胃模型による消化酵素剤の糖化試験法を考案した。また飯沼等¹²⁾は胃模型を応用して蛋白分解酵素剤の試験法を考案した。

しかし、これらの試験法はいずれも酵素活性のみを対象とし、酵素により基質の分解されて生じた分解物が消化吸収に適しているかどうか、という基本的な問題点にはふれていない。

著者等は酵素活性のみではなく、基質の分解率に主眼をおいて、*Aspergillus melleus* の産生するプロテイナーゼの消化酵素剤としての評価について検討したので報告する。

- 1) 第3報：伊藤万蔵，杉浦 衛，薬誌，88，1591 (1968)；本報告の1部は日本薬学会第86年年会で発表，富山，1966年4月。
- 2) 第41報：小木曾太郎，杉浦 衛，Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 17, 1034 (1969)。
- 3) Location: Mitahora 492-36, Gifu.
- 4) 岡崎寛蔵，北村允夫，薬剤学，16，(2) 12 (1956)；16，(3) 31 (1956)；16，(14) 15, 21 (1956)。
- 5) N.E. Rossett, M.L. Rice, Am. Int. Med., 18, 193 (1943)。
- 6) E.H. Johnson, J. Duncan, Quart. J. Pharm. J. Pharmacol., 18, 251 (1945)。
- 7) C. Fuchs, Drug and Cosmetic Ind., 64, 692 (1949)。
- 8) J. Armstrong, M. Martin, J. Pharm. and Pharmacol., 5, 672 (1953)。
- 9) H. Brindle, J. Pharm. and Pharmacol., 5, 692 (1953)。
- 10) N.E. Rossett, M.L. Rice, Gastroenterology, 26, 490 (1954)。
- 11) R.E. Booth, J. K. Dale, J. Am. Pharm. Ass., 44, 694 (1955)。
- 12) 飯沼竜一，薬剤学，18，112, 179, 259 (1958)。

実 験 の 部

実験材料および実験方法

供試酵素 本実験には微生物起源、植物起源、および動物起源のプロティナーゼを使用した。微生物起源のプロティナーゼとしては糸状菌、放線菌、および細菌の産生するプロティナーゼをそれぞれ2—3種選択した。糸状菌プロティナーゼとしては *Aspergillus melleus* の産生する微アルカリプロティナーゼ、結晶¹³⁾ およびアルカリプロティナーゼ、結晶¹⁴⁾ を使用した。放線菌プロティナーゼとしては *Streptomyces griseus* の産出する中性プロティナーゼ、すなわちプロナーゼ E およびプロナーゼ P、科研化学製を使用した。細菌プロティナーゼとしては *Bacillus subtilis* の産生する細菌中性プロティナーゼ、すなわち結晶細菌プロティナーゼ、Novo 社製、結晶細菌プロティナーゼ、1500 PU/mg、大和化成製、ナガーゼ、結晶、長瀬産業製を使用した。

また細菌耐熱性プロティナーゼとしては *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko の産生する耐熱性プロティナーゼ、テルモリジン、3 回再結晶品、大和化成製を使用した。

植物起源のプロティナーゼとしては Doll 社製のブロメラリンを使用した。

動物起源のプロティナーゼとしてはペプシン、 α キモトリプシン、トリプシンおよびパンクレアチンを使用した。

ペプシンは Worthington Biochemical Corp. 製の 2 回再結晶ペプシンを使用した。 α キモトリプシンは α キモトリプシン、NF.; キモチーム、結晶、帝国臓器製、キモプシン、結晶、エーザイ製を使用した。トリプシンはトリプシン、NF.; トリプシン、豚膵臓製、結晶、22.2 Anson units/g, 640426-2, Novo 社製を使用した。パンクレアチンはパンクレアチン、JPVII $\times$ 4.5, 保栄薬工製を使用した。

なお、カゼインの加水分解実験には、 α キモトリプシンとしてはエーザイ製を、細菌プロティナーゼおよびトリプシンとしては Novo 製を使用した。

酵素活性測定法 0.1M リン酸緩衝液 (pH 8.0) を含む 2% カゼイン溶液 (メルク製 Hammarsten casein を使用) 1 ml に酵素液 1 ml を加え 37° で 20 min 反応後、TCA-B 液¹⁵⁾ 2 ml を加えて反応を停止せしめ、37° で 20 min 放置後自然沈降する。沈降液 1 ml を 0.55M Na₂CO₃ 液 5 ml 中に入れ、5 倍希釈した Folin-Ciocalteu 試薬 1 ml を加え、37° にて 20 min 加温発色した後、日立 EPU 2A 型分光光度計を用い 660 m μ における吸光度を測定した。活性の表示は 60 min 反応したとき、Folin 色の OD が 1.0 を示すに必要な酵素量を単位とした。

加水分解率の測定 蛋白の加水分解率の測定は加水分解によって遊離したアミノ基をホルモール滴定法によって定量し算出した。

すなわち、1% カゼイン溶液の加水分解物 10 ml に 10% ホルマリン 10 ml を加え、0.02N NaOH でカルボキシル基を滴定した。なお終点は pH 8.5 とし、pH メーターを用いて測定した。また 2% カゼイン溶液 5 ml に再蒸留した 6N HCl 25 ml を加え、バイレックスガラス封管中で、105°, 24 hr 加水分解したものを分解率 100% とした。

蛋白の定量 蛋白の定量はマイクロ Kjeldahl 法¹⁶⁾ および 280 m μ の吸収によりおこなった。また、各種蛋白分解酵素のプロティナーゼ活性の比較はマイクロ Kjeldahl 法により算出した蛋白 1 g 当りの活性で示した。

実験結果

微アルカリプロティナーゼのプロティナーゼ活性 プロティナーゼ活性を測定する場合に使用される基質のうち、最も一般的なものはミルクカゼインである。そこでミルクカゼインを基質として、各種プロティナーゼと *Aspergillus melleus* の産生する微アルカリプロティナーゼの蛋白分解能を比較した。

その結果 Table I に示すように、微アルカリプロティナーゼは蛋白 1 g 当り 304800 単位を示し、供試したプロティナーゼの中では最も高い活性を示した。

各種天然基質に対する微アルカリプロティナーゼの蛋白分解能の比較 微アルカリプロティナーゼはミルクカゼインに対し強い蛋白分解能を示したので、ミルクカゼインと他の動物性蛋白および植物性蛋白を基質にした場合の蛋白分解能を比較検討した。

蛋白としてはミルクカゼイン、ヘモグロビン、卵白アルブミン、大豆ミール、大豆カゼイン、エデスチン、小麦グルテンの 7 種を用い、未変性基質、熱変性基質、および尿素変性基質を調製した。

未変性基質の調製は蛋白を約 30 倍の緩衝液とホモジナイズし、蛋白濃度を 2% に調整した。熱変性基質は約 30 倍の緩衝液に溶解した後、蛋白濃度を 2% に調整したものであり、尿素変性基質は蛋白を測定 pH の 8M 尿素溶液で変性溶解後、緩衝液で希釈し尿素濃度 4M、蛋白濃度 2% に調整したものである。なお緩衝液は pH 8.0 が 0.1M の Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 緩衝液、pH 9—10 は 0.2M の KCl-H₃BO₃-Na₂CO₃ 緩衝液を使用した。

上記のように調製した基質 1 ml を小試験管にとり、40° で 10 min 加温後、微アルカリプロティナーゼ (1.5 単位) 1 ml を加え 40° で 20 min 反応させ、酵素活性測定法に準じて操作し蛋白分解能を測定した。

13) 伊藤万蔵, 杉浦 衛, 薬誌, **88**, 1583 (1968).

14) 伊藤万蔵, 杉浦 衛, 薬誌, **88**, 1576 (1968).

15) 0.11M CCl₃ COOH, 0.22M CH₃ COONa, 0.33M CH₃ COOH の混液。

16) 改訂新版実験農芸化学, 上巻, 東大農芸化学教室, 朝倉, 東京, 1960, p. 116.

TABLE I. Comparison of Proteolytic Activity of Various Proteinase

Proteinase	Proteolytic activity (units/g protein)
<i>Aspergillus melleus</i> proteinase	
Semi-alkaline proteinase ^{a)}	304800
Alkaline proteinase ^{a)}	201600
<i>Streptomyces griseus</i> proteinase	
Pronase E ^{b)}	135500
Pronase P ^{b)}	80000
<i>Bacillus subtilis</i> proteinase	
Bacterial proteinase ^{a)}	161000
Bacterial proteinase ^{a)}	158900
Nagase ^{a)}	167500
Bromelain ^{b)}	25000 (add. cysteine)
Pancreatin ^{c)}	18900
α -Chymotrypsin	
α -Chymotrypsin (NF) ^{a)}	156200
Chymozym ^{a)}	144800
Kimopsin ^{a)}	151200
Trypsin	
Trypsin (NF) ^{a)}	216900
Trypsin ^{a)}	198000

a) crystalline enzyme b) partial purificatory enzyme c) JPVII $\times 4.5$

その結果 Table II に示すように、微アルカリプロティナーゼはミルクカゼインに対し最もよく作用した。また、尿素変性、加熱変性などの変性操作をほどこさない蛋白に対しても作用することが判明した。

TABLE II. Effect of Substrate on Proteinase Activity

Protein	pH	Methods of denaturation		
		None	Heat	8M Urea
Milk casein	8.0	100	100	191
Hemoglobin	8.0	31	69 (14)	85
Egg albumin	9.0	14	52 (25)	61
Soy-meal	9.5	18	49	35
Soy-casein	9.0	33	55	58
Edestin	10.0	17	39	31
Wheat gluten	10.0	43	51	48

Reaction mixture contained 1 ml of enzyme solution (1.5 units/ml) and 1 ml of 2% protein in buffer solution at various pH values.

The mixture was incubated at 40° for 20 minutes and activity was assayed by the casein-Folin method.

The activity was expressed as relative value.

buffer solution, pH 8.0: 0.1M Na₂HPO₄-KH₂PO₄ buffer, pH 9-10: 0.2M KCl-H₃BO₃-Na₂CO₃ buffer
(): heat coagulation

なお、Table II の値はミルクカゼインの熱変性基質に対する蛋白分解能を 100 とした相対活性で示し、各蛋白とも pH 8.0 における分解能に換算したものである。

プロティナーゼ活性におよぼす尿素の影響 0—8M の各種濃度の尿素を含むように調製した 1% ミルクカゼイン溶液 (0.05M リン酸緩衝液を含む) 50 ml に微アルカリプロティナーゼ 0.07 mg (21 単位) を同じ緩衝液 1 ml にとかしたものを加え、40° で加水分解反応をおこなった。経時的に反応液より 2 ml ずつサンプリングをおこない、0.4M CCl₃ COOH 2 ml に入れ、未反応の蛋白を凝固させ、40°, 10 min 放置後濾過した。濾液中に含まれる蛋白の加水分解物を酵素活性測定法に準じて Folin 法で測定した。

その結果 Fig. 1 に示すように、尿素無添加の基質に比較し、尿素を添加した場合には、一般に微アルカリプロティナーゼによるカゼインの加水分解速度が速く、短時間の反応では高い分解率を示した。

Fig. 1. Effect of Urea on Proteinase Activity

Crystalline semi-alkaline proteinase (0.07 mg) was added to 50 ml of 1% milk casein solution dissolved in 0.05M phosphate buffer (pH 8.0), containing various concentrations of urea and the mixture was incubated at 40°. Aliquots of 2 ml were taken out from the mixture at intervals, and 2 ml of 0.4M CCl_3COOH solution was added, then activity was assayed by Folin method.

concentration of urea: ●—● none, ○—○ 2M, ×—× 4M, △—△ 6M, ■—■ 8M.

Fig. 2. Effect of Urea on Stability of Semi-Alkaline Proteinase

Crystalline semi-alkaline proteinase was dissolved in 0.05M phosphate buffer (pH 8.0) containing various concentrations of urea. After the mixtures (enzyme concentration, 1 mg per ml) were incubated at 40° for indicated periods, the remaining activity was assayed by casein-Folin method.

concentration of urea: ●—● none, ○—○ 2M, ×—× 4M, △—△ 6M, ■—■ 8M.

すなわち、反応時間が 30 min までは 2M および 4M 尿素の存在で 2.1 倍、6M 尿素の存在で 1.7 倍の反応促進効果を示し、尿素濃度が高くなるにつれてプロテイナーゼの失活の影響があらわれた。

また、微アルカリプロテイナーゼ自身の尿素による変性は、Fig. 2 に示すように 40°, 30 min の条件では、2M で 90%, 4M で 50%, 6M で 20% の残存活性を示すにすぎず、尿素によるプロテイナーゼの変性失活はかなり急速におこるものと思われる。

微アルカリプロテイナーゼによるミルクカゼインの加水分解について プロテイナーゼの基質として一般に用いられているミルクカゼインを用いて、その加水分解限度について検討した。

Fig. 3. Thermal Inactivation of Semi-Alkaline Proteinase

enzyme concentration: 1%
incubation temperature

○—○: 50°, water solution
△—△: 55°, water solution
●—●: 60°, water solution
○—○: 50°, 0.1% casein solution
△—△: 55°, 0.1% casein solution
●—●: 60°, 0.1% casein solution

蛋白の加水分解限度を測定する場合、多くホルモール法が用いられる。このホルモール法で酵素分解を追跡する場合、酵素量を多くして短時間 (0.5—2 hr) に反応を終結させると、その経過を追うことが困難である。

そこで酵素量を少なくして、長時間反応させることが必要となる。しかし、37° で長時間反応させると、細菌が繁殖し、正しい滴定値を得ることがむづかしい。このような場合トルエンや

Fig. 4. Relation between Hydrolysis Degree and Percentage of Soluble Nitrogen in 0.2M CCl_3COOH Solution

各種防腐剤が用いられるが、プロティナーゼの種類により活性阻害効果が認められ好ましくない。そこで反応温度を上げ細菌の繁殖をおさえ実験をおこなうことにした。

まず、微アルカリプロティナーゼの pH 8.0 における温度安定性を検討した。その結果 Fig. 3 に示すように、50° 付近より熱変性が急速におこり、50° 以下の温度で反応させることが必要となる。

したがって本実験では 45° で反応させることにし、トルエン添加もおこない細菌の繁殖をおさえることにした。

つぎに、1% ミルクカゼイン溶液 (pH 8.0) 200 ml に微アルカリプロティナーゼ溶液 1 ml (15 単位) を加え 45° で加水分解反応をおこない、経時的に 2 ml ずつサンプリングし、0.4M CCl_3COOH 2 ml 中に加えた。また別に 10 ml ずつサンプリングしてホルモール法によりカゼインの加水分解率を測定した。カゼインの加水分解率に対する 0.2M CCl_3COOH 可溶性窒素量の関係を図示すると Fig. 4 のようになった。

すなわち加水分解率 10% では 70% の分解物は 0.2M CCl_3COOH に可溶となり、加水分解率が 20% を越えると 95% 以上の分解物が可溶となった。この関係は他の起源のプロティナーゼでもほぼ同様であった。

つぎに、各種プロティナーゼによるミルクカゼインの極限加水分解物をセロファン膜中に入れ、精製水に対し透析し、カゼイン加水分解物のセロファン膜透過率を 280 m μ 法により測定した。

極限加水分解物は 1% ミルクカゼイン溶液 100 ml に酵素液 1 ml 加え、24 hr 加水分解後煮沸して酵素を失活せしめ調製した。酵素反応の条件は α キモトリプシンおよびトリプシンの場合には pH 9.0, 37° で、細菌プロティナーゼおよび微アルカリプロティナーゼの場合には pH 8.0, 45° の条件でおこなった。なお酵素量は α キモトリプシン、トリプシンおよび細菌プロティナーゼの場合には 200 単位、微アルカリプロティナーゼの場合には 50 単位という大過剰を用いた。Table III は、セロファン膜に Visking チューブを用い、透析内液 2 ml を精製水 50 ml に対し 5 日間透析した結果である。外液の約 10% が内液に移行していたので、0.2M CCl_3COOH 可溶性窒素の場合と同じく、分解率が 25% を越えると完全に透析可能な分解物となっていることが判明した。

TABLE III. Dialysis of Digest of Milk Casein by Various Proteinase

Proteinase	Rate of nitrogen		Decrease of outer solution (%)	Hydrolysis rate (%)
	Inner solution	Outer solution		
None	99.5	0.5	10	0
Semi-alkaline proteinase	7.8	92.2	12	55.0
α -Chymotrypsin	15.9	84.1	13	18.3
Trypsin	38.3	61.7	13	14.7
Bacterial proteinase	12.0	88.0	12	26.0

condition of incubation

α -chymotrypsin, trypsin: pH 9.0, 37°, 24 hr

semi-alkaline proteinase, bacterial proteinase: pH 8.0, 45°, 24 hr

enzyme concentration

semi-alkaline proteinase: 50 units per gram casein

α -chymotrypsin, trypsin, and bacterial proteinase: 200 units per gram casein

reaction system

1% milk casein in Britton-Robinson buffer solution

condition of dialysis

against 25 volumes of water for 5 days

微アルカリプロティナーゼと各種プロティナーゼのミルクカゼインに対する加水分解限度 まず、微アルカリプロティナーゼの酵素量とミルクカゼインの加水分解限度を検討した。酵素量はカゼイン 1 g 当り 5, 10, 50, 100, および 200 単位をそれぞれ加えた。反応条件は 0.05M リン酸緩衝液 (pH 8.0) を含む 2% カゼイン溶液 50 ml に酵素液 1 ml を加え、45° で加水分解をおこなった。

微アルカリプロティナーゼによるミルクカゼインの加水分解限度は、Fig. 5 に示すように酵素量の増加にしたがい上昇し、200 単位では約 70% に達した。

つぎに、微アルカリプロティナーゼと各種プロティナーゼのミルクカゼインの加水分解限度を比較した。

Fig. 6 は各種プロティナーゼの酵素量とカゼインの加水分解限度の関係を求めたものである。

加水分解限度は酵素量の増加とともに漸次高くなり、最も分解限度の高いプロティナーゼは *Aspergillus melleus* の産生する微アルカリプロティナーゼであった。

また、起源別では糸状菌プロティナーゼ > 細菌プロティナーゼ > 動物起源プロティナーゼの順であった。

微アルカリプロティナーゼと各種プロティナーゼの交叉作用 ミルクカゼインの加水分解限度はプロティナーゼの対数量に比例して増加することが判明したので、こんどはカゼイン 1 g 当り、プロティナーゼを 10 単位ずつ用いて交叉作用を検討した。

Fig. 5. Hydrolysis of Milk Casein by Semi-Alkaline Proteinase

reaction condition: 2% casein, pH 8.0, 45°

- : 200 units/g casein
- △—△: 100 units/g casein
- ×—×: 50 units/g casein
- : 10 units/g casein
- : 5 units/g casein

Fig. 6. Relation between Hydrolysis Degree of Milk-Casein and Enzyme Concentration

Using 2% casein solution as a substrate, reactions were carried out at 45°, at pH 8.0 (excepting pH 2.0 for pepsin) for 24 hours. Course of hydrolysis was followed by the formol titration method.

- ×—: trypsin
- : α-chymotrypsin
- : pepsin
- △—: bacterial proteinase
- : thermolysin
- : semi-alkaline proteinase

その結果 Fig. 7 および Fig. 8 に示すように、比較的基質特異性の高いトリプシン、αキモトリプシン、ペプシンなどのようなプロティナーゼで分解して、これに微アルカリプロティナーゼを作用させると著しく分解率が

Fig. 7. Hydrolysis of Milk Casein by Semi-Alkaline Proteinase, Trypsin, α-Chymotrypsin or Pepsin followed by Semi-Alkaline Proteinase

The experimental conditions are described in Fig. 6.
enzyme concentration

- 10 units per gram casein
 - : semi-alkaline proteinase
 - ×—×: trypsin
 - : α-chymotrypsin
 - : pepsin
- 20 units per gram casein
 - : semi-alkaline proteinase
- 30 units per gram casein
 - ▲—▲: semi-alkaline proteinase (10 units/g casein) and α-chymotrypsin (20 units/g casein)

上昇し、同じ単位 (20 単位) の微アルカリプロティナーゼの場合よりもはるかに高い加水分解限度を示した。また αキモトリプシン (20 単位) と微アルカリプロティナーゼ (10 単位) を混合した場合には、活性に比して加水分解限度が上昇せず相乗作用も、相加作用も認められなかった。

一方、基質特異性の低いと思われる微アルカリプロティナーゼで分解し、これに特異性の高いトリプシン、α

Fig. 8. Hydrolysis of Milk Casein by Semi-Alkaline Proteinase followed by Various Proteinases

The experimental conditions are described in Fig. 6.
enzyme concentration, 10 units per gram casein.

- : semi-alkaline proteinase
- ×—×: trypsin
- : α-chymotrypsin
- : pepsin

キモトリプシン、ペプシンなどを加えるとその作用はほとんど認められなかった。

ミルクカゼイン酵素分解物の分子量分布 微アルカリプロティナーゼはミルクカゼインをよく分解し、高い加水分解率を与えることが判明したので、これらの酵素分解物の分子量分布をみることにした。

ミルクカゼイン分解物の加水分解率が 25% 以上になるとセロファン膜をほとんど通過することが認められたので、Sephadex G25 によるゲル濾過をおこなうことにした。

まず微アルカリプロティナーゼを用いて、加水分解率 0, 25, 45, および 65% の 2% ミルクカゼイン分解物を調製し、その 5 ml を 1.8×90 cm の Sephadex G25 のカラムに負荷し、そのパターンを観察した。

その結果 Fig. 9 に示すように加水分解率の上昇とともに、パターンは右に移行し、低分子化していることが認められた。

すなわち、ホルモール法における加水分解率が 25% というのは平均分子がテトラペプチドに相当するが、本酵素は液化型のプロティナーゼであるので、かなり大きいポリペプチドからアミノ酸に至るまで各種の分解産物を生成し、これが B のパターンとして示されているものと考えられる。

また、加水分解率 45% の C パターンではアミノ酸およびオリゴペプチド（ジおよびトリペプチド）が増加し、ポリペプチドが減少している。この傾向は加

Fig. 9. Gel-Filtration Patterns of Hydrolyzed Milk Casein by Semi-Alkaline Proteinase on a Column (1.8×90 cm) of Sephadex G25

Elution was performed with distilled water.

A: casein substrate B: hydrolysis rate 25%
C: hydrolysis rate 45% D: hydrolysis rate 65%
■: blue dextran □: glucose

Fig. 10. Gel-Filtration Patterns of Limit-Hydrolyzed Casein by Various Proteinases on a Column (1.4×45 cm) of Sephadex G25

Elution was performed with 0.1M NaCl.

condition of hydrolysis: proteinase, 100 units on one gram of casein; 2% casein solution, pH 8.0, 45°, 24 hr

A: semi-alkaline proteinase B: α -chymotrypsin
C: bacterial proteinase D: trypsin
■: blue dextran, □: glucose

TABLE IV. Hydrolysis of Synthetic Peptides and Esters by Semi-Alkaline Proteinase of *Aspergillus melleus*

10 mg of peptides was dissolved in 2 ml of 0.1M phosphate buffer solution, pH 8.0, which contained 50 μ g of the enzyme. After incubation for 6 hours at 37° under toluene, aliquots of the reaction mixture were withdrawn and subjected to the paper partition chromatography in order to identify amino acids and their derivatives liberated.

Solid and broken arrows designate the sites which were split by the enzyme rapidly and slowly, respectively.

水分解率 65% の D のパターンにおいてとくに著しい。

つぎに各種プロティナーゼで加水分解 (100 単位 /g カゼイン, pH 8.0, 45°, 24 hr) した 2% ミルクカゼイン分解物 2 ml を 1.4×45 cm の Sephadex G 25 のカラムに通し, 分子量分布を観察した。

その結果 Fig. 10 に示すように, *Aspergillus melleus* の産生する微アルカリプロティナーゼが最も低分子化されており, つぎが細菌プロティナーゼであった。

微アルカリプロティナーゼによる合成基質の分解 微アルカリプロティナーゼによる合成基質の分解作用を検討した。

Table IV はその結果を示すもので, α キモトリプシンの基質である Ac-Tyr-OEt, トリプシン, プロメライン, ファイシン, パパインなどの基質である Bz-L-Arg-NH₂, ペプシンの基質である Cbz-L-Glu-L-Tyr, グリシルグリニンジペプチダーゼの基質である Gly-Gly, グリシルロイシンジペプチダーゼの基質である Gly-Leu を分解する。

しかし, ジペプチダーゼ作用はアミダーゼおよびエステラーゼ作用に比して極めて弱く, ペプチダーゼ作用の強さは Leu-Gly-Gly ≫ Leu-Gly ≫ Gly-Leu ≧ Gly-Gly の順であった。

考 察

従来, 消化酵素剤の研究は酵素活性の強さを指標としておこなわれてきた。しかし, 酵素活性の強さは加水分解反応の初速度で測定されるものであるから, 基質を小さい分子に加水分解する能力とは別のものと考えられる。消化酵素は消化管の負荷を軽減する目的と食物の消化と吸収を促進する目的に使用されるものと思われる。

消化管の負担を軽くする目的ならば基質をランダムに切る液化型の酵素が適しており, 消化と吸収の促進を目的とした場合には基質をできるだけ小分子に加水分解する酵素が適していると考えられる。

特に微アルカリプロティナーゼのように小腸内の pH と酵素の最適 pH がほぼ等しい酵素では, 蛋白の分解産物がそのまま吸収できうる大きさとなることが重要である。このような考え方に基づいて, 各種プロティナーゼによる蛋白の加水分解物の大きさをホルモール法, 0.2M CCl₃COOH 可溶性窒素量, 透析法, Sephadex 分画法等により検討した。

まず微アルカリプロティナーゼと各種プロティナーゼの活性を酵素活性測定法に準じカゼイン Folin 法により測定した。その結果微アルカリプロティナーゼは他の結晶プロティナーゼよりも著しく活性が強く, おそらく糸状菌プロティナーゼでは最強の酵素と推察される。

次に動物および植物性蛋白を用いて, 未変性基質, 熱変性基質, および尿素変性基質を調製し, 蛋白間および基質間における微アルカリプロティナーゼの作用の強さを比較した。その結果, 供試した蛋白の中ではミルクカゼインがもっとも作用をうけやすく, 特に尿素変性基質にした場合は熱変性基質 (酵素活性測定法は熱変性基質を使用する) に対する酵素活性の約 2 倍であった。

尿素変性基質には尿素が 4M の濃度に含まれており, これに微アルカリプロティナーゼが加わり基質を加水分解するとき, 尿素によりプロティナーゼ自身も変性をうけ, 当然活性は低下するものと思われる。

仮りにミルクカゼインの酵素蛋白保護作用が無いとした場合には, Fig. 2 の結果より 4M 尿素中では, 40°, 30 分間に約 1/2 のプロティナーゼが失活する。

しかし Fig. 1 の結果より, 4M 尿素含有ミルクカゼインに微アルカリプロティナーゼが作用するとき, 40°, 30 分反応において, 尿素を含まない場合の約 2 倍の活性を示した。また Table II の結果より, 尿素変性基質とした場合に著しく活性が上昇する蛋白はミルクカゼインのみであり, 尿素的酵素蛋白に対する何らかの作用により活性が上昇したとは考えられない。

以上のことより考察すると, 酵素反応系に尿素を加えた場合, プロティナーゼを失活させる濃度および時間においても微アルカリプロティナーゼの作用の促進が認められるということは, ミルクカゼインによる酵素蛋白保護作用と尿素による基質の改良にもとづく見かけの活性化作用との協力によるものと考えられ興味深い。

次に各種プロティナーゼが蛋白をどのように加水分解するかを, ミルクカゼインを用い消化酵素としての立場から検討した。

消化酵素としてのプロティナーゼも蛋白質の可溶化のみを考える場合には, 加水分解率が 20% に達するプロティナーゼならばどれでもよく, 分解物は 0.2M CCl₃COOH に可溶となり, セロファン膜を通過できうる大きさになる。しかし, このような液化型のプロティナーゼでは消化管の負担を軽減できても, 分解物の吸収には関係がないものと考えられる。酵素分解された分解物が直接小腸壁より吸収できうる大きさに分解するプロティナー

セがあれば腸の負担の軽減のみでなく、栄養素の吸収という面からみても好ましい。このような条件を満足できるプロティナーゼはその作用最適 pH が小腸内 pH (pH 6.0—8.0) に一致し、基質特異性が少なく、蛋白の加水分解率が 50% 以上に達するものでなければならない。

Fig. 5 および Fig. 6 の結果よりみると、供試した酵素の中でミルクカゼインの加水分解率が 50% を越えるプロティナーゼは微アルカリプロティナーゼのみであり、ペプシン、トリプシン、 α キモトリプシンなどの消化酵素は単独では加水分解率の上昇がみられず、ペプチターゼの作用によってはじめて腸管吸収できうる大きさに分解されるものと思われる。

また Fig. 7 の結果に示すように、微アルカリプロティナーゼは消化管に存在するペプシン、トリプシン、 α キモトリプシンなどのプロティナーゼで加水分解されて得られるペプチドをさらに加水分解し、少ない酵素量で著しく高い分解率を与えた。

この交差作用は微アルカリプロティナーゼで加水分解されて得られたペプチドの場合も同様であり、同じ加水分解率を与えるのに単独使用の場合の約 1/10 の酵素量で済むことを示している。

このことより微アルカリプロティナーゼを消化酵素として使用する場合には、小腸内で一度に崩壊する剤型よりも、崩壊時間を異にする剤型を用いた方が、少ない酵素量で高い分解率を与えるものと考えられる。

次に各種プロティナーゼで加水分解したミルクカゼイン分解物を Sephadex G25 を用いて分画した。

Fig. 9 および Fig. 10 に示す Sephadex 分画よりみても、微アルカリプロティナーゼの加水分解物はもっとも小分子化されており、他のプロティナーゼより消化酵素として優れたものと考えられる。

ホルモール法における加水分解率が 50% ということは分解産物の平均分子がジペプチドに相当し、100% ということはアミノ酸に相当することを意味する。

微アルカリプロティナーゼの加水分解限度は 60—70% であり、65% という値はアミノ酸とジペプチドが 1:2 の割合で混在しているものに相当するが、Fig. 9 の Sephadex パターンでもほぼ同様な結果が得られた。

このように微アルカリプロティナーゼの加水分解率が他のプロティナーゼに比較して著しく高いということは、Table IV に示した合成基質に対する作用によっても確認された。

すなわち、微アルカリプロティナーゼはペプシン、トリプシン、 α キモトリプシンなどの合成基質に対して作用するのみでなく、高分子の蛋白から低分子のペプチドにいたるまで幅広くペプチドに対して親和性を有しており、これが高い加水分解率を与える原因と考えられる。

また前記の加水分解率 65% のミルクカゼイン分解物の Sephadex パターンは次のようにして生成されたものと思われる。

蛋白は微アルカリプロティナーゼによってランダムに分解される。ここに生じた不均質のペプチドはさらに分解され、おそらくトリペプチドとなって集積される。トリペプチドは微アルカリプロティナーゼによって分解されうるので、これがさらにアミノ酸とジペプチドに分解される。この段階でほとんど分解が停止し、分解産物は主としてアミノ酸およびジペプチドであり、これに少量のポリペプチドが混在しているものと推察される。

結 論

Aspergillus melleus の産生する微アルカリプロティナーゼによるミルクカゼインの加水分解について検討した。また数種の合成基質を用いて基質特異性について検討した。

その結果、本酵素は基質特異性の低いプロティナーゼであり、蛋白を小分子に加水分解でき、消化酵素として優れたものであることが判明した。