

## 担子菌の生産するプロテアーゼの検索

後藤いずみ, 清原 利文, 大杉 匡弘  
(武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

### Screening for Production of Protease by Basidiomycetes

Izumi Goto, Toshibumi Kiyohara and Masahiro Osugi

Department of Food Science and Nutrition,  
School of Human Environmental Science,  
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan

Proteolytic activities of culture broth of basidiomycetes were determined. Basidiomycetes used were 12 strains of commercial product and 40 strains of Isolants from nature. Proteolytic activities were found in tamogitake, mushroom and Isolant W510 belonging to *Tricholoma* sp. In *Tricholoma* sp. W510, two protease activities having optimal pHs at 7 and 11 were shown. Temperature affected strongly the production of protease during the cultivation. No activity was shown at 30°C. Both protease activities were produced highly by increasing malt extract concentration during cultivation.

#### 緒言

血栓溶解剤として血栓症の治療に広く使われている酵素には、人尿からのウロキナーゼ<sup>1)</sup>と組織プラスミノゲンアクチベーター<sup>2)</sup>、微生物起源のストレプトキナーゼ<sup>3)</sup>があり、また、最近では、食品の納豆のナットウキナーゼ<sup>4)</sup>(臨床的にはまだ用いられていない)が知られている。これら酵素は、いずれもプロテアーゼであるので、納豆のように食品として経口投与できる血栓溶解剤としての効用を考慮して、担子菌について血栓溶解活性を調べるためプロテアーゼの検索を行った。

#### 試料および実験方法

##### 1. 供試菌株

市販の12種の食用きのこの継代培養により菌糸体を分離した。京都の雲が畑、宝が池、滋賀県の足尾谷、北小松、仙台の森林公園から採集した約500種のきのこより同じく継代培養により、純粋に菌糸

体を分離した40菌株を本実験に供した。

##### 2. 培地および培養方法

菌糸体培養の培地は、2% malt extract(ナカライテスク社製)150 ml(300 ml容三角フラスコ中)を培地とし、初発pHを6.0に調整した。培養は、20~26°C, 1~3週間、旋回培養(100 rpm)を行った。

##### 3. 生育度の測定

生育度の測定は、菌糸体の乾燥重量より求めた。

##### 4. タンパク質の定量

卵白アルブミンを標準タンパクとして、Lowry法<sup>5)</sup>により求めた。

##### 5. プロテアーゼ活性測定法

プロテアーゼ活性は、萩原のカゼイン消化B法<sup>6)</sup>の改良方法で測定した。すなわち、基質として

0.6% ハマーシュテン・カゼインを用いた。反応組成は、0.1M のトリス塩酸緩衝液(pH 7.2)0.05ml, 培養濾液 0.05ml および 0.6% のカゼイン溶液 0.5ml からなる。反応の停止は、0.11M TCA 溶液 0.5ml の添加による。反応後、反応液は、遠心分離 (2,000×G, 10 分間) して得られた上澄液を 275nm における吸光度を測定した。酵素活性の 1 単位は 1 分間あたりの 1 $\mu$ g のチロシンを生成するに要する酵素量とした。

## 結果および考察

### 1. 生産菌のスクリーニング

市販の食用きのこ 12 菌株および自然界から分離の担子菌 40 菌株の培養濾液を用い、プロテアーゼ活性を調べた。その結果、市販のマッシュルーム (C6), タモギタケ (C8) ならびに野生 (W510) の 3 菌株のみがプロテアーゼ活性を示した。これら 3 菌株の各 pH におけるプロテアーゼ活性を調べた結果を Table 1 に示す。市販のマッシュルーム (C6) においては、pH 11.0 に強い活性を示した。タモギタケ (C8) については、pH 8.0 および 9.0 に微弱な活性を示した。また、野生担子菌 (W510) の場合 pH 7.0~11.0 の広い範囲に活性を示し、特に pH 8.0 および 11.0 付近に活性のピークがみられ、2 種のプロテアーゼの存在が示唆された。

Table 1. Proteolytic activities of culture broth from basidiomycetes.

Strain No.	Proteolytic activity (Units/ml)				
	pH				
	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0
C6	0	0	10	12	36
C8	0	1	3	0	0
W510	22	25	19	23	27

Determination of proteolytic activities was carried out at various pHs for 30 min by the casein digestion B method of Hagihara.

Abbreviations in table shows as follows; C6: Mushroom, C8: Tamogitake (*Pleurotus citrinopileatus*), W510: (*Tricholoma* sp.) .

### 2. 野生担子菌 *Tricholoma* sp. W510 株のプロテアーゼ産生のための培養条件

#### a. 2 種のプロテアーゼ

高いアルカリ pH 領域 (pH 11.0 付近) にプロテアーゼ活性の認められた 2 菌株 (C6, W510) の培養濾液について、各種 pH および温度のプロテアーゼ活性に及ぼす影響を調べた。その結果、野生菌株 (W510) の培養濾液は、pH 7.0 付近、60 $^{\circ}$ C までは、温度の上昇とともに、プロテアーゼ活性の増大が認められたが、70 $^{\circ}$ C では、急激に失活した。最適 pH 7.0, 最適温度 60 $^{\circ}$ C とアルカリ領域、すなわち最適 pH 11.0, 最適温度 40 $^{\circ}$ C で活性を示す酵素の存在が示唆された。一方、市販菌株のマッシュルーム (C6) も野生担子菌 (W510) と同じ高いアルカリ領域に酵素の存在が示唆された。しかし、そのプロテアーゼ活性は、野生担子菌 (W510) のそれと比較して約 1/6 であり、また 40 $^{\circ}$ C では完全に失活した。さらに、野生担子菌 (W510) が生産するプロテアーゼのうち、pH 7.0 に最適 pH をもつ酵素は、30~50 $^{\circ}$ C の温度範囲で 10 分間熱処理しても pH 4.0~9.0 の広い pH 領域で安定であった。また、最適 pH 11.0 を有する酵素も、30 $^{\circ}$ C~40 $^{\circ}$ C において、広い pH 領域 (pH 4.0~11.0) で安定であった。以後の実験は、野生担子菌 (W510) 産生の 2 種のプロテアーゼについて、酵素反応の経時的变化を調べた。その結果を Fig.1 に示す。最適 pH 7.0 最適温度 60 $^{\circ}$ C を有するプロテアーゼの酵素反応は、3 時間で平衡に達した。また最適 pH 11.0 で 40 $^{\circ}$ C に最適温度を有するプロテアーゼにおいては、5 時間後にほぼ平衡に達した。

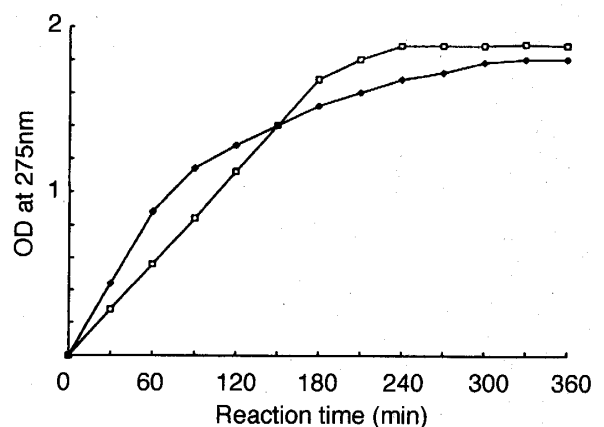


Fig. 1. Time Course of casein hydrolysis by culture broth of *Tricholoma* sp. W510

Proteolytic activity of culture broth was determined by the method described in Materials and Methods. □, at pH7 and 55 $^{\circ}$ C; ■, at pH11 and 40 $^{\circ}$ C.

## b. 温度の影響

野生菌株(W510)の菌体外プロテアーゼ生産量が培養温度によっていかなる影響を受けるかを調べた。その結果をFig.2に示す。その結果、30℃の培養温度では、20日間の培養を行っても培養濾液中には、pH 7.0, 温度55℃, pH 11.0, 40℃に最適pHと最適温度を有する両酵素の活性は、観察されなかった。20および26℃の培養温度では、6日目から両プロテアーゼの活性が観察され、20℃では、ほぼ12日目に、26℃ではやや遅れて14~16日目に活性が最大となった。また、26℃の培養温度よりも20℃における培養温度が2種類の酵素を効率良く生産していることが明らかとなり、培養温度が高くなるにつれ、酵素生産量が減少する傾向が観察された。

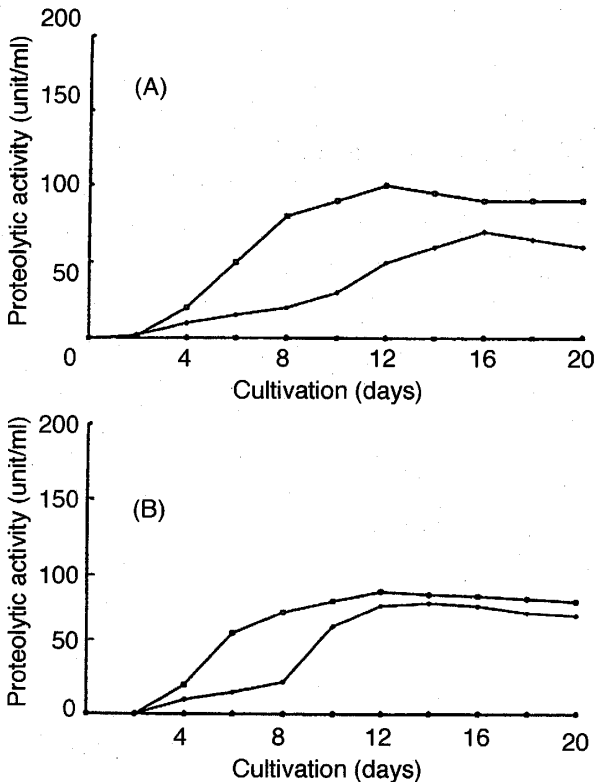


Fig. 2. Effect of cultivation temperature on extracellular production of protease from *Tricholoma* sp. W510

Determination of proteolytic activity was performed by the method described in Materials and Methods. Two enzyme activities were assayed at pH 7.0, 55°C for 30min(A) and at pH 11.0, 40°C for 30min(B), respectively. □, Cultivation at 20°C; ◆, Cultivation at 26°C; ■, Cultivation at 30°C.

## c. pHの影響

菌体外プロテアーゼ生産量について培地の初発pHによる影響を調べた。その結果をFig.3に示す。酵素の活性は、pH 11.0, 温度50℃で測定した場合であるが、初発pH 4.5の培地で18日間の培養を行っても培養濾液中には酵素の活性は全く観察されなかった。しかし、初発pH 5.0にすると酵素活性は観察された。最も高い酵素活性を示したのは、初発pH 6.0~7.5の中性付近であった。また、初発pHをアルカリ側にすると、初発pH中性の場合よりも酵素活性が低下したが、pH 10.5でも酵素の生産がみられた。

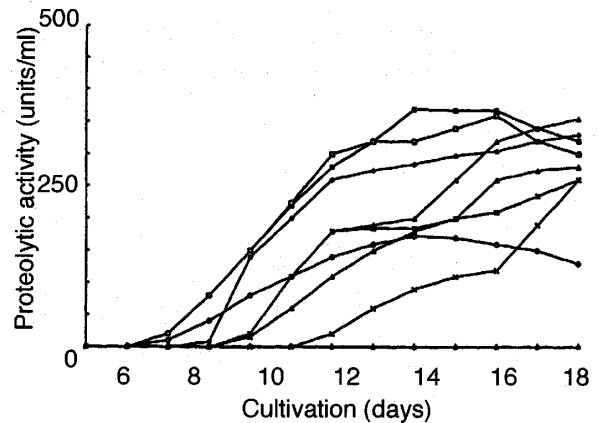


Fig. 3. Effect of pH on extracellular production of protease during cultivation *Tricholoma* sp. W510

Proteolytic activity of culture broth was determined by the casein digestion B method of Hagihara described in Materials and Methods.

●, pH4.5; ○, pH5.0; ◆, pH6.0; ■, pH7.0; □, pH7.5; ▲, pH8.5; △, pH9.0; \*, pH9.5; ×, pH10.5.

## d. 栄養源の濃度の影響

プロテアーゼ生産量に及ぼすモルツ培地の濃度の影響を調べた結果を、Table 2に示す。表に示すモルツエキス濃度と培養日数とプロテアーゼ活性の関係は、各濃度(モルツエキス)における最大のプロテアーゼ活性を示した場合について比較したものである。モルツエキス濃度3, 6および9%での培養の場合、培養日数は同じであっても、生育、培地中へのタンパク質の蓄積およびプロテアーゼ活性はモルツエキス濃度の増大とともに上昇した。15%モル

ツエキス培地での培養の場合、プロテアーゼの比活性は、3% モルツエキス培地の場合に比して pH 7 および pH 11 に最適 pH をもつプロテアーゼはともに約 4 倍の活性の上昇がみられた。

**Table 2.** Effects of concentration of malt extract on production of protease during cultivation of *Tricholoma* sp. W510.

Malt ext. (%)	Culture (days)	Growth (mg/ml)	Protein (mg/ml)	Proteolytic Activity (units/ml)		Specific Activity (units/mg)	
				pH 7	pH11	pH 7	pH11
3	23	7.3	1.1	34	28	32	26
6	23	13.3	1.9	59	59	31	31
9	23	20.1	3.9	207	120	53	14
12	40	30.9	4.1	406	323	99	79
15	32	30.2	7.0	772	557	110	80

Determination of proteolytic activity was performed by the method as described in Table 1. Two enzyme activities were estimated at pH 7.0, 55°C for 10 min and at pH 11.0, 40°C for 10 min, respectively.

## 要約

市販のきのこおよび自然界から分離した担子菌について、その菌糸体培養による培養液中への産生を検討した。その結果、市販菌株のタモギタケ、マッシュルームに、野生菌株の *Tricholoma* sp. W510 株のものにプロテアーゼ活性が見られた。特に W510 株には中性及びアルカリ側に最適 pH をもつ 2 種のプロテアーゼの存在が示唆された。培養によるプロテアーゼの産生には、pH は中性、温度は 20°C が最適であった。また、栄養源としてのモルツ培地も、モルツエキス濃度が高い程プロテアーゼ産生も増大し、3% モルツ培地に比して 15% モルツ培地では約 4 倍に達した。

## 文献

- 1) 須見, 「続生化学実験講座 8, 血液下, ウロキナーゼ」, 日本生化学会編, 東京化学同人, p610(1987)
- 2) Gurewich, V., *Fibrinolysis*, 3, 59-66(1989)
- 3) Elliot, S. D., *J. Exptl. Med.*, 81, 573 (1945)
- 4) Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, h. and Muraki, H., *Experientia*, 43, 1110-1111(1987)
- 5) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr,

A. L., and Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275(1951)

6) Hagihara, B., *Ann. Rep. Fac. Sci. Osaka Univ.*, 2, 35-79(1954)