

微生物のプロテアーゼインヒビター活性の分布

酒 井 敦 子
中 川 理 沙
阿 部 誠

生体中にはプロテアーゼの活性を阻害するプロテアーゼインヒビターが存在している。これらの多くはタンパク質であり、生体中で種々の重要な役割を果たしているプロテアーゼの活性をコントロールできることから、重要な生体成分として注目されている。¹⁾

動物や植物等の高等生物からは種々のプロテアーゼインヒビターが分離・精製され、その特性が解明されつつある。微生物のプロテアーゼインヒビターについては、アンチパイン、ペプスタチン等が青柳らにより発見され、現在、研究用試薬として製造・販売されている。また、E-64⁴⁾をはじめとするエポキシコハク酸誘導体がシステインプロテアーゼのインヒビターとして分離されている。これらの低分子性プロテアーゼインヒビターは放線菌や一部のカビ類を中心とした限られた微生物群を対象としており、微生物全般における分布はまだ明らかでない。また、タンパク性のプロテアーゼインヒビターの報告例は少なく、詳しい特性が知られているのは放線菌のサブチリシンインヒビター⁶⁾とメタルプロテイナーゼインヒビター⁷⁾、*Candida*のシスタチン⁸⁾、酵母のプロテアーゼAインヒビター⁹⁾とプロテアーゼBインヒビター¹⁰⁾など数種にすぎない。

プロテアーゼはその活性中心に基づき4つのタイプに分類されるが、プロテアーゼインヒビターもそれぞれに対応する4種、すなわち、セリンプロテアーゼインヒビター、システインプロテアーゼインヒビター、アスパルティックプロテアーゼインヒビター、メタルプロテアーゼインヒビターに大別される。これらの代表的なインヒビター活性の強度を各種の微生物間で比較検討した研究例は見られない。

本研究では、これまで多くのプロテアーゼの研究がなされているのに対し、そのプロテアーゼインヒビターの存在があまり知られていない微生物について、プロテアーゼインヒビターの分布状況を明らかにすることを目的として、まず

代表的な4つのタイプのプロテアーゼに対する阻害活性をカビ、酵母、細菌について検討した。

実験方法

1. 実験材料および試薬

微生物サンプルとしては、Table I に示すカビ8種、酵母3種、細菌13種を東京大学分子細胞生物学研究所細胞・機能高分子総合センターIAM カルチャーコレクションより入手し、実験に用いた。プロテアーゼとして、パパイン

Table I Microorganisms Investigated for Their Inhibitory Activities against Four Kinds of Proteases

Molds	IAM 2630: <i>Aspergillus oryzae</i>
	IAM 2930: <i>Aspergillus niger</i>
	IAM 5009: <i>Fusarium oxysporum</i>
	IAM 6131: <i>Mucor rouxii</i>
	IAM 7003: <i>Penicillium citrinum</i>
	IAM 7095: <i>Penicillium purpurogenum</i>
	IAM 7106: <i>Penicillium chrysogenum</i>
	IAM 8001: <i>Monascus anka</i>
Yeasts	IAM 4220: <i>Candida utilis</i>
	IAM 4967: <i>Pichia anomala</i>
	IAM 12209: <i>Debaryomyces hansenii</i>
Bacteria	IAM 1007: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IAM 1011: <i>Staphylococcus aureus</i>
	IAM 1025: <i>Proteus vulgaris</i>
	IAM 1041: <i>Lactobacillus plantarum</i>
	IAM 1056: <i>Micrococcus luteus</i>
	IAM 1104: <i>Serratia marcescens</i>
	IAM 1207: <i>Bacillus natto</i>
	IAM 1264: <i>Escherichia coli</i>
	IAM 1645: <i>Brevibacterium ammoniagenes</i>
	IAM 12118: <i>Bacillus subtilis</i>
	IAM 12435: <i>Corynebacterium glutamicum</i>
	IAM 13004: <i>Leuconostoc mesenteroides</i>

(Sigma, Type I)、トリプシン (Sigma, Type I)、ペプシン (Sigma, 2×crystallized)、サーモライシン (Sigma, Type X)、プロテアーゼ活性測定用基質として、*N*- α -Benzoyl-DL-arginine- β -naphthylamide (BANA) (Sigma)、ヘモグロビン (DIFCO Laboratories)、カゼイン (Merck, Hammarsten) を用いた。透析チューブとしては、Spectra/Por Membrane MWCO; 3500 (Spectrum Medical Industries, Inc.) を用いた。

なお、以下の記述では次の略号を用いる。BANA, *N*- α -Benzoyl-DL-arginine- β -naphthylamide; PB, リン酸ナトリウム緩衝液; TCA, トリクロル酢酸; EDTA, エチレンジアミン四酢酸; 2-ME, 2-メルカプトエタノール。

2. 活性測定用サンプル原液の調製

微生物の培養は、糸状菌はツァペックドックス氏液体培地を用い25℃で、酵母はハイグック氏液を用い37℃で、細菌は肉エキス・ペプトン液体培地を用い37℃で、それぞれ72時間振とう培養した。培養後、培養液を15000回転、10分間遠心分離して上清と菌体に分離した。菌体は 10mM Tris-HCl (pH8.0) に懸濁し、Ultra-Turrax T25 (JANKE & KUNKEL GmbH & Co) で24000回転、2分間ホモジナイズした後、15000回転、10分間遠心分離し、得られた上清を菌体の抽出液とした。

得られた培養液上清と菌体抽出液をそれぞれプロテアーゼインヒビター活性測定用サンプル原液とした。

3. プロテアーゼインヒビター活性測定

4種類のプロテアーゼ (パepsin、トリプシン、ペプシン、サーモライシン) に対する微生物培養液上清と菌体抽出液について以下に述べる各々の測定法により阻害活性量を求め、サンプル原液 1ml 当りの阻害活性量を求めた。サンプル原液は必要に応じて純水で希釈して検液として用いた。

4種のプロテアーゼのいずれの場合も、(a)検液+プロテアーゼ、(b)検液のみ、(c)プロテアーゼのみの場合、のプロテアーゼ活性を以下の1)~4)の方法により求め、(b)と(c)の和と(a)の差により阻害活性量を求めた。つまり阻害活性量は次式により求められる。

$$\{(b + c) - a\} \times \text{原液希釈倍率} \cdots (1) \text{式}$$

また、プレインキュベート後、反応停止液を加えた後、基質を加えたものを a、b、c のそれぞれについて測定し、各々の盲検とした。

1) パパインの阻害活性測定

- (a) パパイン液 (25 μ g/ml 25mM PB, pH7.0) 0.1ml、検液 0.2ml、10mM EDTAを含む 0.5M PB (pH6.0) 0.1ml、50mM 2-ME 0.1ml
- (b) 25mM PB (pH7.0) 0.1ml、検液 0.2ml、10mM EDTAを含む0.5M PB (pH6.0) 0.1ml、50mM 2-ME 0.1ml
- (c) パパイン液 (25 μ g/ml 25mM PB, pH7.0) 0.1ml、未培養培養液 0.2ml、10mM EDTAを含む0.5M PB (pH6.0) 0.1ml、50mM 2-ME 0.1ml

各々を混合後、37 $^{\circ}$ C 10分プレインキュベートし、1mM BANA水溶液 0.2mlを加え20分反応させた後、2% HCl/ethanol 1mlを加え反応を停止させた。さらに0.06% *p*-dimethylaminocinnamaldehyde/ethanol 1mlで発色させ、30分間放置したものを1cmセルを用い540nmの吸光度を測定した。阻害活性を(1)式より求め、 $\Delta E_{540}/\text{hr/ml}$ で示した。

2) トリプシンの阻害活性測定

- (a) トリプシン液 (150 μ g/25mM PB, pH7.0) 0.1ml、検液 0.2ml、0.5M PB (pH7.0) 0.1ml、純水 0.1ml
- (b) 25mM PB (pH7.0) 0.1ml、検液 0.2ml、0.5M PB (pH7.0) 0.1ml、純水 0.1ml
- (c) トリプシン液 (150 μ g/25mM PB, pH7.0) 0.1ml、未培養培養液 0.2ml、0.5M PB (pH7.0) 0.1ml、純水 0.1ml

以下の操作はパパインと同様にした。阻害活性は $\Delta E_{540}/\text{hr/ml}$ で示した。

3) ペプシンの阻害活性測定

- (a) ペプシン液 (100 μ g/ml 水) 0.1ml、検液0.5ml、0.1N HCl 0.1ml
- (b) 純水 0.1ml、検液0.5ml、0.1N HCl 0.1ml
- (c) ペプシン液 (100 μ g/ml 水) 0.1ml、未培養培養液 0.1ml、0.1N HCl 0.1ml

各々を混合後、37 $^{\circ}$ C、10分間プレインキュベートし、2.5%ヘモグロビン/0.1N HCl 0.5mlを加え、37 $^{\circ}$ C 20分間反応後、4% TCA 5mlを加えて反応を停止させた。10分間放置後3500回転10分間遠心分離し、上清を1cmセルを用いて280nmの吸光度を測定した。阻害活性は $\Delta E_{280}/\text{hr/ml}$ で示した。

4) サーモライシンの阻害活性

- (a) サーモライシン液 (60 μ g/10mM Tris-HCl, pH8.0) 0.1ml、検液 0.5ml、0.1M Tris-HCl (pH8.0) 0.1ml、0.5mM CaCl₂ 0.1ml
- (b) 10mM Tris-HCl (pH8.0) 0.1ml、検液 0.5ml、0.1M Tris-HCl (pH8.0)

0.1ml、0.5mM CaCl₂ 0.1ml

(c) サーマライシン液 (60 μ g/10mM Tris-HCl, pH8.0) 0.1ml、未培養培養液 0.5ml、0.1M Tris-HCl (pH8.0) 0.1ml、0.5mM CaCl₂ 0.1ml

各々を混合後、37 $^{\circ}$ C 10分間プレインキュベートし、1%カゼイン/10mM Tris-HCl (pH8.0) 0.1ml を加え、37 $^{\circ}$ C 20分間反応後、5%TCA 3ml を加えて反応を停止させた。10分間放置後3500回転10分間遠心分離し、上清を1cmセルを用いて280nmの吸光度を測定した。阻害活性を(1)式により求め $\Delta E_{280}/hr/ml$ で示した。

結果および考察

1. 培養液中のプロテアーゼインヒビター活性

4種のプロテアーゼ、トリプシン、パパイン、ペプシン、サーモライシンに対する阻害活性を72時間培養液について調べた実験結果を Table II に示す。培養液には様々な成分の分泌とともに培養液成分の組成の変化が阻害活性に影響することも考えられるため、阻害活性の認められたものについては水に対して透析して透析内液の活性測定も行った。

1) トリプシンの阻害活性が認められたのは、カビ1種、酵母1種、細菌1種でいずれも微弱であった。このうち *Candida utilis* と *Proteus vulgaris* においては、阻害活性は非透析性で、タンパク性のトリプシンインヒビターによる可能性が大きい。

2) パパインの阻害活性は3種のカビにおいて認められ、いずれも大部分の阻害活性は非透析性でシスタチン様のタンパク質による可能性が考えられた。最近、*Aspergillus oryzae* の培養液上清においてパパイン阻害活性を有する低分子物質の存在が報告され¹¹⁾、また、kojistatin A という物質の存在も報告されているが、今回の実験条件では *Aspergillus oryzae* の培養液にパパイン阻害活性は検出されなかった。また、酵母、細菌においてはパパイン阻害活性は認められなかった。

3) ペプシンの阻害は *Candida utilis* と10種の細菌の培養液において認められたが、いずれも透析すると非透析性画分の活性は見られなくなった。原因として、細菌の場合、アンモニアの産生による培養液のアルカリ化によるペプシンの活性低下が考えられる。実際、培養後の細菌培養液の pH はいずれも培養前よりおよそ 2pH 単位程アルカリ側にずれていた。また、*Candida utilis* の場合と細菌の一部では透析性ペプスタチン様の低分子ペプチドの分泌による可

Table II Protease Inhibitor Activities of the Culture Media of Various Microorganisms

	Inhibition of papain (ΔE_{540} /hr/ml)	Inhibition of trypsin (ΔE_{540} /hr/ml)	Inhibition of pepsin (ΔE_{280} /hr/ml)	Inhibition of thermolysin (ΔE_{280} /hr/ml)
<i>Asp. oryzae</i>	0	2.51(0.83)	0	2.34(0)
<i>Pen. chrysogenum</i>	4.74(4.70)	0	0	0.62(0)
<i>Monascus anka</i>	5.39(2.56)	0	0	3.37(0)
<i>Pen. purpurogeunm</i>	16.32(5.80)	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	0	0	0	0.94(0)
<i>Mucor rouxii</i>	0	1.70(0)	0	0
<i>Asp. niger</i>	0	0	0	0
<i>Pen. citrinum</i>	3.73(0)	0	0	0
<i>Pichia anomala</i>	0	0	0	1.50(0)
<i>Candida utilis</i>	0	2.80(2.80)	18.79(0)	1.12(0)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0	0	0	1.06(0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	32.74(0)	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0	2.67(2.67)	7.81(0)	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	0	14.14(0)	1.09(0)
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	14.14(0)	0
<i>Serratia marcesens</i>	0	0	66.22(0)	0
<i>Bacillus natto</i>	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	141.17(0)	1.56(0)
<i>Brevi. ammoniagenes</i>	0	0	150.66(0)	0
<i>Batillus subtilis</i>	0	0	20.83(0)	0
<i>Leucono. mesenteroides</i>	0	0	53.94(0)	0
<i>Corynebact. glutamicum</i>	0	0	50.22(0)	0

* The inhibitory activities due to non-dialyzable fraction (M.W.>3500 daltons) were shown in parentheses.

能性も考えられる。

4) サーマライシンの阻害はカビ4種、酵母3種、細菌1種でみられたが、いずれも微弱であり、透析すると透析内液の阻害活性は消失した。

2. 菌体抽出物の阻害活性

各微生物の菌体を 10mM Tris-HCl 緩衝液で抽出した場合の活性を TableIII

Table III Protease Inhibitor Activities of the Extract from Various Microbial Cells

	Inhibition of papain (ΔE_{540} /hr/ml)	Inhibition of trypsin (ΔE_{540} /hr/ml)	Inhibition of pepsin (ΔE_{280} /hr/ml)	Inhibition of thermolysin (ΔE_{280} /hr/ml)
<i>Asp. oryzae</i>	3.77	1.09	0	0
<i>Pen. chrysogenum</i>	0	2.27	1.08	0
<i>Monascus anka</i>	13.04	0	5.25	0
<i>Pen. purpurogeunm</i>	8.99	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	0	0	0	1.72
<i>Mucor rouxii</i>	0	0	0.97	0.75
<i>Asp. niger</i>	0	0	1.38	2.93
<i>Pen. citrinum</i>	0	0	1.79	0
<i>Pichia anomala</i>	3.93	0	0	0
<i>Candida utilis</i>	0	0	0	0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	9.44	3.79
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	10.09	5.58	0
<i>Proteus vulgaris</i>	2.39	0	0	0.87
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	2.19	1.67	1.22
<i>Micrococcus luteus</i>	0	1.7	0	0
<i>Serratia marcesens</i>	0	0.69	0	0
<i>Bacillus natto</i>	0	0.93	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	21.87	3.13	0.31
<i>Brevi. ammoniagenes</i>	1.58	1.82	0	0
<i>Batillus subtilis</i>	0	9.68	1.08	1.03
<i>Leucono. mesenteroides</i>	0	0	0	1.47
<i>Corynebact. glutamicum</i>	0.61	0	0	0

に示す。

1) トリプシンの阻害は、カビ2種で微弱であるが検出された。また細菌では9種において阻害活性が認められ、トリプシンインヒビターは細菌菌体中に比較的広く分布していると考えられる。特に明確に活性が見られたのは、*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* の4種であった。

2) パパインの阻害は、カビ3種、酵母1種、細菌3種でみられたが、*Monascus anka* と *Penicillium purpurogenum* の場合以外は微弱であった。

3) ペプシンの阻害がみられたのは、カビ4種、細菌5種であるが、*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 以外はいずれも微弱であり、明確でない。酵母においては、ペプシン類似のプロテアーゼAを阻害する分子量約24000のインヒビターが細胞質内に存在することが知られているが、今回検討した酵母においてはペプシン阻害活性は検出されなかった。

4) サーモライシンの阻害は、カビ3種、細菌5種でみられたが、いずれも微弱であった。

今回の研究では、カビ、酵母、細菌ごとに同一の培地で同一時間の培養を行っている。そのため、菌体の増殖状況は菌により同一ではなく、同じ菌体量当たりの阻害活性での比較が今後必要であろう。プロテアーゼの場合と同じく、培地への成分分泌は、培地の成分により誘導されるケースが多く、その意味でも今後、インヒビターの誘導に適した培地の検討と培養条件の検討が必要である。今回の研究は一般的な培養条件下でのインヒビター活性の産生の度合いを示すものであり、今後、有用なプロテアーゼインヒビターのスクリーニングを進めるうえで基礎となる情報を提供するものである。

要約

- (1) トリプシンの阻害活性は、細菌の菌体に広く分布していた。また、分泌性のもものは活性は弱いが、*Candida* と *Proteus* において非透析性の活性成分の存在が認められた。
- (2) パパインの阻害活性は、菌体内、分泌性のいずれの場合も、*Penicillium* や *Monascus* などのカビ類で多くみられた。
- (3) 培養液がペプシン阻害活性を示すケースが見られ、大部分はアンモニアの生成によると思われる。菌体抽出物では3種の細菌でペプシン阻害活性が検出された。
- (4) サーモライシンの阻害はいずれの微生物においても微弱であった。

参考文献

- 1) Katunuma, N., Suzuki, K., Travis, J., and Fritz H. eds.: Biological Functions of Proteases and Inhibitors, Japan Scientific Societies Press and KARGER, (1994).
- 2) 加藤郁之進、蛋白質核酸酵素、24、667-678 (1979).

- 3) Mossor, G., Skupin, J., and Romanowska, B., *Nahrung*, **28**, 93-112 (1984).
- 4) 梅沢浜夫、青柳高明、竹内富雄、“蛋白質分解酵素と生体制御”、村地孝、浅田敏雄、藤井節郎編、p.163-185、東京大学出版会 (1973).
- 5) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., and Tanaka, I., *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 523-528 (1978).
- 6) Hiromi, K., Akasaka, K., Mitsui, Y., Tonomura, B., and Murao, S. eds.: Protein Protease Inhibitor-The Case of *Streptomyces* Subtilisin Inhibitor (SSI), Elsevier, Amsterdam (1985).
- 7) Oda, K., Koyama, T., and Murao, S., *Biochim, Biophys. Acta*, **571**, 147-156 (1979).
- 8) Tsushima, H., Mine, H., Hoshika, K., Kawasaki, Y., Hyodoh, F., and Ueki, A., *J. Bacteriol.*, **174**, 4807-4810 (1992).
- 9) Saheki, T., Matsuda, Y., and Holzer, H., *Eur. J. Biochem.*, **47**, 325-332 (1974).
- 10) Bunning, P., and Holzer, H., *J. Biol Chem.*, **252**, 5316 -5323(1977).
- 11) 山田尚男、斉藤義幸、川戸章嗣、杉並孝二、“日本農芸化学会1996年度大会講演要旨集”、p.12、(1996).
- 12) Sato, N., Horiuchi, T., Hamano, M., Sekine, H., Chiba, S., Yamamoto, H., Yoshida, T., Kimura, I., Satake, M., and Ida, Y., *Biosci, Biotech, Biochem.*, **60**, 1747-1748 (1996).

(さかい	あつこ	本学副手
	なかがわ	りさ	本学副手
	あべ	まこと	本学教授
)			