Penicillium sp. H 48 による細胞内チオールプロテアーゼ・インヒビターの生産と，インヒビターの２，３の性質について

松嶋　欽一・森　　直人・粟冠　和郎・嶋田　　協

Production and Some Properties of Intracellular Thiol Proteinase Inhibitors by/of *Penicillium* sp. H 48

Kin-ichi MATSUSHIMA, Naoto MORI, Kazuo SAKKA and Kyo SHIMADA

緒　　言

パパイン，フィチン，カルパイン等のチオールプロテアーゼに対して阻害作用を呈するチオール プロテアーゼ・インヒビターが，これまでに放線菌[1~5]，かび[6]，および細菌[7]から分離されている。

しかしながら，これらのインヒビターは，いずれも培養液中に分泌される細胞外インヒビターであり，また，かびが生産するE－64[6]を除いて，多かれ少なかれトリプシン等セリンプロテアーゼに対しても阻害作用を示すことが報告されている。

著者らは今回，先に耐酸性糸状菌として分離し，本研究で *Penicillium sartoryi* Thom に所属すると同定した青かびの１株が，チオールプロテアーゼを特異的に阻害するインヒビターを細胞内に保有していることを見出した。本報においては，このインヒビターに関して得られた２，３の知見について報告する。

実験材料および方法

１．供試菌株

本研究に供試した青かび菌株は，著者らが先に東北地方の酸性温泉地から分離した約1000株の耐酸性糸状菌の中から，パパイン活性阻害物質の生産性のあるものとしてスクリーニングした３菌株の中の最強力株であって，山形県蔵王酢川（pH 1.2~2.4）から分離したものである。以下に述べる実験で，本菌を *Penicillium sartoryi* の１株と同定した。

２．培養条件

500mℓ容三角フラスコに培地100mℓを入れ，常法により加圧滅菌した後，胞子懸濁液を接種して，25℃で２～３日間の静置培養を行った。

３．インヒビター液の調製

湿菌体を10倍量の0.01M phosphate buffer（pH 7.0）と共に，最初 Universal homogenizer（日本精機），つづいて Potter-Elvehjem homogenizer を用いて磨砕し，濾紙を用いて吸引濾過した。得られた濾液を100℃，10分間加熱して冷却後，遠心分離（9,000 rpm，15分間）した上清をインヒビター液として用いた。

４．インヒビター活性の測定方法

パパイン溶液（Merck 製パパイン10mgを10^{-3}M $HgCl_2$溶液10mℓに溶解したもの）0.05mℓ，0.2M KH_2PO_4-0.1M $Na_2B_4O_7$ buffer（pH 8.0）0.45mℓ，0.02Mシステイン－0.08Mエチレンジアミンテトラ酢酸溶液0.5mℓ，適宜希釈したインヒビター液0.5mℓの混液を37℃で５分間 preincubation した後，基質（２% Hammersten ミルクカゼイン溶液）0.5mℓを加えて同温度で30分間反応を行わせた。これに0.4Mトリクロロ酢酸２mℓを加えて30分間以上放置後濾過し，濾液の280nmでの吸光度を測定し，ブランクの吸光度との差から$\Delta A_{280}^{inhibitor}$を求めた。対照（上記反応混液中のインヒビターを脱イオン水で置き換えたもの）についても上と同様に行い$\Delta A_{280}^{control}$を求めた。$\Delta A_{280}^{control} - \Delta A_{280}^{inhibitor}$の吸光度の値をインヒビター活性とした。なを，上記の測定条件下で，１分間に１μg チロシンと同じ吸光度を与えるパパインの量を１パパイン単位とし，１パパイン単位を阻害するのに必要なインヒビターの量を１インヒビター単位と

規定した。

実験結果および考察

1．供試菌株の同定

本菌の顕微鏡観察による形態的特徴，ならび Czapek's agar, Czapek's yeast-autolysate agar および malt-extract agar 上に生育したコロニーの性状等の培養的特徴を，Ramirez[9] の分類・図鑑の中の記載と照合した結果，本菌株は単輪生状の Penicillus を有し，conidia はダエン形ないし亜球形で，大きさは 2.5−3.5×2.0−2.5 μm，また Czapek's agar 上でのコロニーは密なフェルト状ないしはベルベット状で中央が盛り上がり，培養期間を通じて表面が白色，胞子形成は密でないことや，上記の他の2培地に生育したコロニーの性状，その他においても，*Penicillium sartoryi* Thom の性質と良く一致した。因って，本菌を上記菌種に所属する1株と同定した。

2．インヒビター活性と，preincubation 時間およびインヒビター量との関係

反応開始に先立つ酵素とインヒビターとの preincubation 時間についての実験結果は Fig. 1に示した如くで，preincubation 時間は5分間で充分であると思われた。また，インヒビター量とインヒビター活性との間には，直線関係が見られた（Fig. 2）。

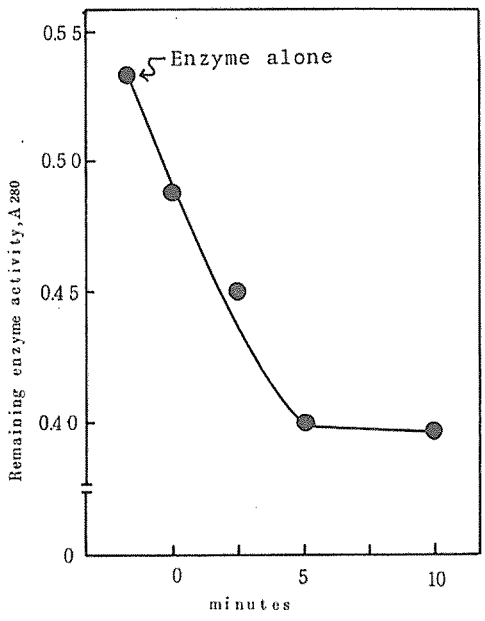


Fig. 1．Effect of preincubation time on the inhibitory activity.

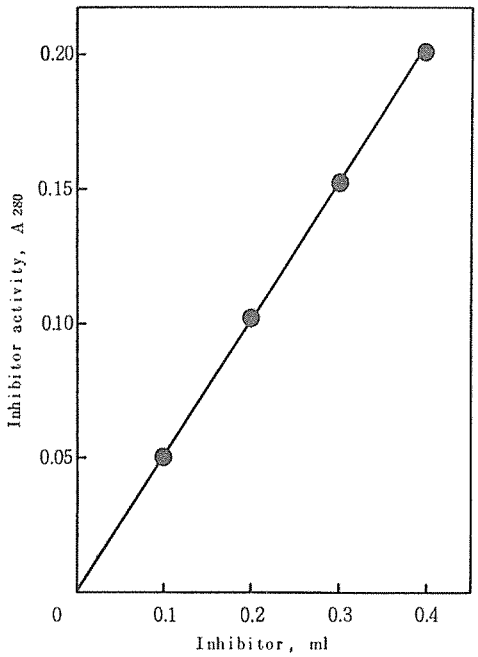


Fig. 2．Relation between amount of inhibitor and inhibitor activity.

3．細胞外インヒビターと細胞内インヒビターの量比

上に述べた様に，本菌はパパイン阻害物質生産菌として多数の耐酸性かびの中から選択された1菌株である。そのスクリーニングに際しては，培養液中の阻害活性を測定したので，当初は細胞外チオールプロテアーゼインヒビター生産菌として研究を始めた。しかしながらその後の実験で，本菌は培養液中よりも，むしろ細胞内に多量のインヒビターの含有していることが明らかとなった。Table 1に示した分析結果は，フラスコ当りの細胞内インヒビター量は培養液中のそれの数倍にも達することを示している。

4．菌の生育条件

細胞内インヒビターの給源としての菌体を可及的多量に得るために，菌の生育条件について若干の検討を行った。

Table 1. Intracellular and extracellular inhibitors produced by H48

Culture time hr	Inhibitor activity, units／flask Intracellular	Extracellular
48	30,916	4,800
72	22,248	7,100

The fungus was grown without shaking in 100ml of glucose (2.5%) - $(NH_4)_2SO_4$ (0.25%) -mineral medium at 25℃.

1）培養方法

静置培養と振盪培養における菌の生育を比較した結果が Fig. 3である。菌の生育は，静置培養より振盪培養の方がはるかに良好であった。しかしながら，菌体内インヒビターについては，上とは逆に，静置培養では振盪培養によるよりも，フラスコ当りはるかに多量のインヒビターが得られるという興味ある事実を知り得た。よって以下の実験では，静置培養法で菌を生育させた。

2）温度および pH

本菌の生育至適温度は25℃であった。また，本菌は中性から強酸性にわたる広い pH 範囲で良く生育したが，中性よりもむしろ pH 1～2の強酸性での方が生育量が大であった（Table 2）。このことは，本菌の菌体収得に際して強酸性培地を用いることにより，加熱滅菌操作を省略して，しかも開放条件下でも他菌からの汚染を排除して本菌を培養し得る可能性を示している。

Table 2. Effect of temperature and pH on the growth of H48

Temperature (℃)	Growth (Dry cell,g)	Inicial pH of medium	Growth (Dry cell,g)
20	0.20	1.0	0.30
25	0.23	2.0	0.28
30	0.15	3.0	0.29
35	0	4.0	0.28
		5.0	0.27
		6.0	0.26
		7.0	0.26

Culture conditions are the same as shown in Table 1.

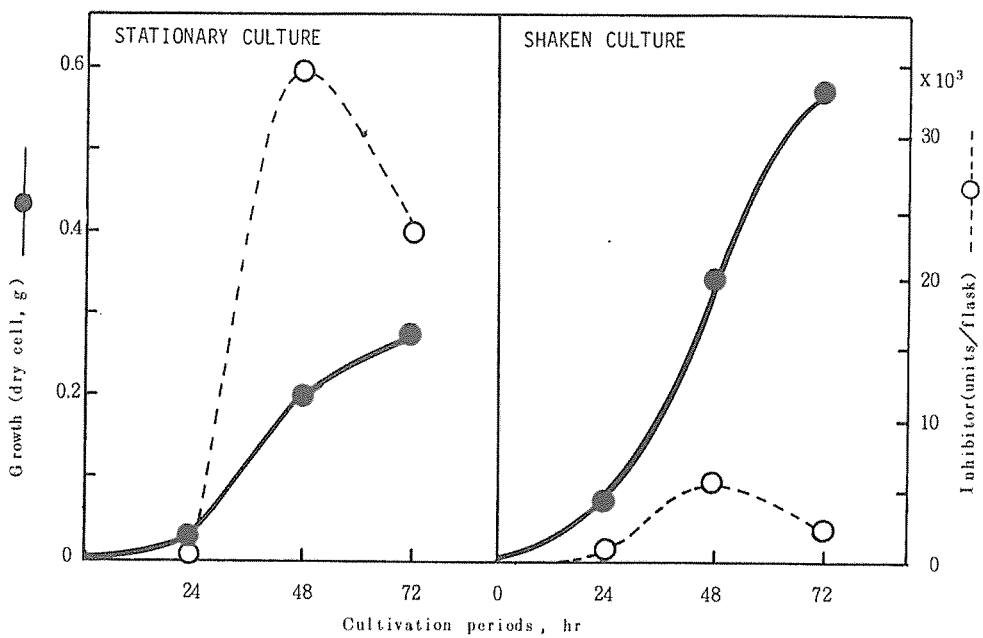


Fig. 3. Growth and inhibitor formation of／by H48 in stationary-and shaken cultures.
The fungus was grown in glucose (2.5%) - $(NH_4)_2SO_4$ (0.25%) -mineral medium at 25℃.

3）胞子接種濃度

胞子接種濃度と菌体生産量との関係を試験した結果はTable 3に示した如くで，接種濃度が高いほど多量の菌体が得られた。

Table 3. Growth of H48 as a function of inoculum size

Inoculum size (Number of spores /ml of medium)	Growth (Dry cell,g) after 48hr	after 72hr
1.5×10^4	0.22	0.32
1.5×10^5	0.35	0.57
1.5×10^6	0.35	0.64

Culture conditions are the same as shown in Table 1.

4）培地組成

ブドウ糖1.0%，ポリペプトン0.5%，KH_2PO_4 0.1% $MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.05% pH 5の組成の培地を基本培地として，炭素源および窒素源の種類，または無機塩類の濃度をかえて，菌体の生育に及ぼす影響を試験した。

a．炭素源および窒素源の種類

Table 4の実験結果が示すように，本菌の生育には，ブドウ糖のほかに果糖，麦芽糖，蔗糖およびマンニットが良好な炭素源であった。また，窒素源（ポリペプトン5%と同一窒素濃度になるように添加）の中では無機窒素源より有機窒素源の方が一般的に良い生育を与えたが，中でもポリペプトン，ソイトン，およびカザミノ酸が最も良好であった。

Table 4. Effect of Carbonand Nitrogen sources on the growth of H48

Carbon source	Growth (Wet cell,g)	Nitrogen source	Growth (Wet cell,g)
Glucose	0.49	$NaNO_3$	0.14
Fructose	0.43	NH_4NO_3	0.21
Maltose	0.49	$(NH_4)_2SO_4$	0.18
Sucrose	0.47	Ammonium tartrate	0.20
Lactose	0.27	Urea	0.15
Sol. starch	0.37	Casaminoacid	0.39
Xylose	0.32	Polypepton	0.43
Glycerol	0.34	Soytone	0.41
Mannitol	0.47	Bacto peptone	0.25
Solbitol	0.16	Trypticase peptone	0.29
Ethanol	0.12	Phytone	0.29
Acetic acid	0		
Lactic acid	0.17		
Malic acid	0.15		
Citric acid	0.15		

Medium composition : Glucose (or substitute) 1%, Polypepton (or substitute) 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.05%, pH 5.0.

b．無機塩類の濃度

KH_2PO_4 および $MgSO_4\cdot7H_2O$ をそれぞれ0.05－1.0%および0.01～0.5%の範囲の各濃度に含有させた培地を用いて試験したが，菌の生育にはほとんど差が認められなかった。

5．インヒビターの抽出方法

「実験材料および方法」の中に記した如く，本実験におけるインヒビター活性測定に際してのインヒビター液の調製には，Potter Elvehjem homogenizer で菌体を磨砕して抽出する方法を用いたが，大量の菌体を処理する場合に菌体から直接インヒビターを抽出する方法があれば便利である。そこで，上記のブドウ糖（1%）－ポリペプトン（0.5%）－無機塩類培地上に生育（25℃ 48時間）させた菌蓋を，新鮮な別の液体上でさらに48時間培養を続ける（置換培養法）か，あるいは液中に浸漬して抽出するかして，菌体からのインヒビターの溶離のもようをしらべた。その結果，Table 5に示したように，置換培養法よりも浸漬抽出法の方が菌体からのインヒビター溶離量が大であることがわかった。そこでさらに，浸漬に用いる溶媒について種々試験したところ，微生物細胞の自己消化を促進することで知られている酢酸エチル，n－ブタノール，クロロホルム等の添加（浸漬液の1/10量）効果は認めることが出来なかったが，各

Table 5. Release of inhibitor from mycerial mat

Method	Inhibitor units	%
Replacement culture in 0.1M sodium citrate-HCl buffer, pH2.0	560	2.6
Replacement culture in the above buffer containing 2.5%glucose	928	4.3
Replacement culture in the above buffer containing 0.25% ammonium sulphate	748	3.6
Submerged extraction	8,320	38.8
Control(homogenized mycelia)	21,420	100

Replacement cultures and submerged extraction were conducted at 25℃ for 48hr

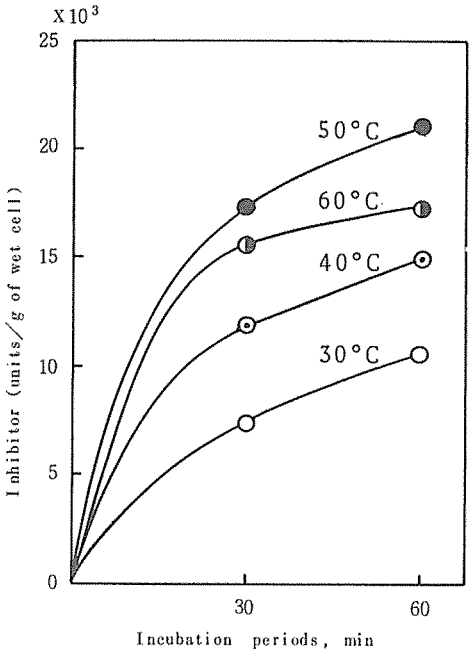


Fig. 4. Effect of temperature on the submerged extraction of inhibitor with 50% methanol.

種 buffer や脱イオン水よりも50～70%メタノールを用いた方が菌体からのインヒビターの溶離量が多いことを見いだした。

Fig. 4は，50%メタノールに菌体を浸漬してインヒビターを抽出する際の温度の影響を試験した結果である。この結果から，抽出温度は50℃が最も良く，この温度で60分間抽出した場合のインヒビター溶出量は，上記磨砕法により抽出したインヒビター量の約60%であった。

6．2種のインヒビターの存在について

上記の様にして得た50%メタノール抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮したものをインヒビター試料として，これを0.05Mピリジン－ギ酸緩衝液（pH 5.5）で平衡化した Amberlite IRC－50カラム（3.2×30cm）に負荷してカラムクロマトグラフィーを行ったところ，インヒビターは，カラムを素通りする区分と0.7M同上 buffer で溶離する区分の2つのピークに分れて溶出した（Fig. 5）．前者をインヒビターⅠ，後者をインヒビターⅡと呼称した。

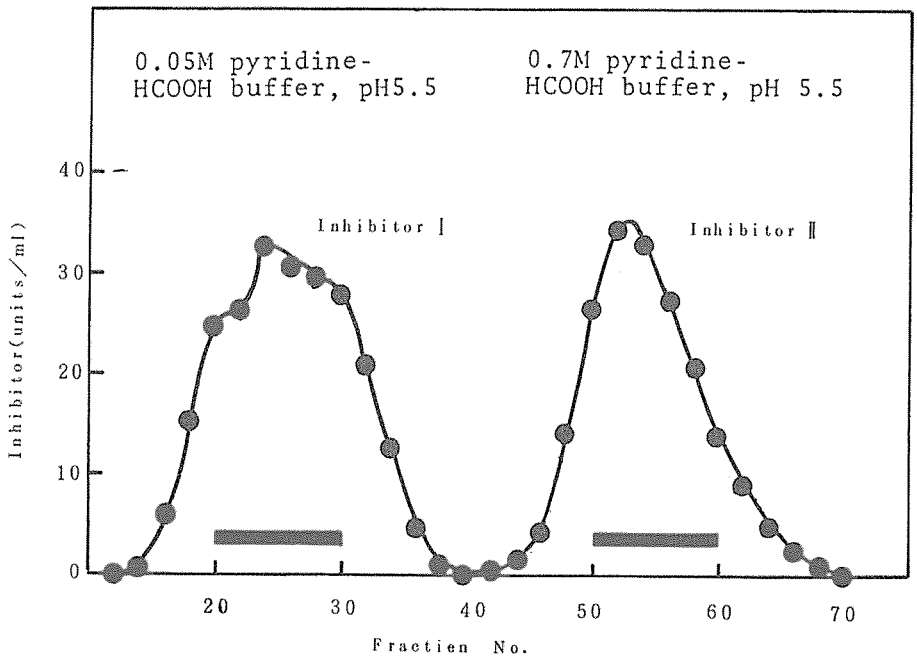


Fig. 5. Chromatography of inhibitors on IRC 50 column.
Column : 2 x 20 cm, flow rate : 40 ml／hr, one fraction : 5 ml.
The solid bars on the abscissa indicate fractions pooled.

Table 6. Some properties of the Inhibitors

Property	Inhibitor I	Inhibitor II	E-64
Heat stability(100℃, 10min)	Yes	Yes	Yes
Passing through sortorius membrane	Yes	Yes	Yes
Elution volume on Sephadex G-15 gel filtration(ml)	420	345	360
Inhibition activity against ;			
Pepsin	No	No	No
Penicillium cyclopium acid-proteinase	No	No	−
Trypsin	No	No	No
Semialkaliprotease	No	No	−
Pronase P	No	−	
Bacillus No.221 alkali-proteinase	No	No	−
B. subtilis neutral proteinase	No	No	−
Papain	Yes	Yes	Yes
Ficin	Yes	Yes	Yes
Rf in thin-layer chromatogram with solvent system of ;			
50% Methanol	0.69	0	0.62
100% Methanol	0.27	0	0.40
n-Butanol-acetic acid-water (3 : 1 : 1)	0.22	0.07	0.41
Propanol-water(3 : 1)	0.31	0	0.38
12% Acetic acid	0.79	0.64	0.57

7．インヒビターの性質について

Amberlite IRC−50カラムクロマトグラフィーで分離した上記2種のインヒビターについて2，3の性質をしらべた結果を Table 6にまとめた。この結果からわかる様に，インヒビターⅠおよびⅡは100℃の加熱に対して安定であり，またコロジオンバッグ（Sartorius-Membranefilter 社，孔径8㎜）を通過することから分子量12,000以下の低分子物質であろうと想像される。また，両インヒビターは共に，パパイン，フィチンを阻害するが，ペプシン，トリプシン，枯草菌中性プロテアーゼ等，カルボキシルプロテアーゼ，セリンプロテアーゼ，およびメタルプロテアーゼには全く阻害作用を及ぼさない，チオールプロテアーゼに特異的なインヒビターであることがわかった。

以上の諸性質において，両インヒビターは共に，すでによく知られている *Aspergillus japonicus* TPR−64の生産するE−64[6]のそれと類似しているが，しかし，インヒビターⅠは Sephadex G−15のゲル濾過において，また，インヒビターⅡはシリカゲルの薄層クロマトグラフィーにおいて，それぞれE−64とは明らかに異なる挙動を示したことから，両インヒビターはいずれもE−64とは異なる新規のインヒビターであることが充分に予想される。

要　　約

1．本研究に使用した耐酸性青かびH48は，その菌学的特徴から，*Penicillium sartoryi* Thom の1株と同定した。

2．本菌株は，培養濾液中よりも菌糸体中に多量のチオールプロテアーゼ・インヒビターを含有していた。振盪培養よりも静置培養した菌体の方が含有量が高かった。

3．無処理の菌体からインヒビターを抽出するには，50%メタノール中で50℃で抽出する方法が最も良かった。

4．インヒビターは2種存在し，共にチオールプロテアーゼを特異的に阻害する低分子物質であった。

5．その他の性質のちがいから，2種のインヒビターは既知のE−64とは異なる物質であろうと推定した。

なお，本研究は昭和59年度文部省科学研究費補助金（一般研究 C，課題番号59560103）によって行われたものであることを付記する。

引 用 文 献

(1) T. AOYAGI, T. TAKEUCHI, A. MATSUZAKI, K. KAWAMURA, S. KONDO, M. HAMADA and H. UMEZAWA : *J. Antibiot.*, **22**, 283 (1969).

(2) H. UMEZAWA, T. AOYANAGI, H. MORISHIMA, S. KUNIMOTO, M. MATSUZAKI, M. HAMADA and T. TAKEUCHI : *J. Antibiot.*, **23**, 425 (1970).

(3) H. SUDA, T. AOYAGI, M. HAMADA, T. TAKEUCHI and H. UMEZAWA :*J. Antibiot.*, **25**, 263 (1972).

(4) S. MURAO and T. WATANABE : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1313 (1977).

(5) K. OGURA, M. MAEDA, M. NAGAI, T. TANAKA, K. NOMOTO and T. MURACHI : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 799 (1985).

(6) K. HARADA, M. TAMAI, M. YAMAGISHI, S. OHMURA, J. SAWADA and I. TANAKA : *Agric. Biol. Chem.*,**42**, 523 (1978).

(7) S. MURAO, T. SHIN, Y. KATSU, S. NAKATANI and K. HIRAYAMA : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 895 (1985).

(8) 嶋田 協, 大野博幸, 松嶋欽一 : 三重大農学報., №. 67, 95 (1983).

(9) C. RAMIREZ : Manual and Atlas of the Penicillia, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, 1982.

SUMMARY

Penicillium sp. H48, which was identified as *Penicillium sartory*, produced more inhibitors in stationary culture than in shaken culture. The inhibitors could be extracted with a yield of 60% by incubating mycelia in a 50% methanol solution at 50℃ for one hour. The presence of two inhibitors, inhibitor I and inhibitor II, was revealed by Amberlite IRC-50 column chromatography. Like E-64, both inhibitors were stable against heat treatment(100℃ for 10 min), were permeable through collodion bag suggesting that they are of low-molecular weight, and inhibited papain and ficin but not pepsin, mold acid proteinase, trypsin, bacterial neutral proteinase, and bacterial alkaline proteinase. However, inhibitor I and inhibitor II behaved differently from E-64 in Sephadex G-15 gel filtration and in thin layer chromatography on silica gel, respectively.