

担子菌 *Tricholoma* sp. の生産するプロテアーゼの精製と特性

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

Purification and properties of Protease produced by basidiomycete, *Tricholoma* sp.

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

Purification of protease from culture broth of *Tricholoma* sp. W510 was performed by ammonium sulfate fractionation, ion exchange column chromatography, gel filtration and butyl-toyopearl chromatography. The enzyme was purified as one band on SDS-electrophoresis. Molecular weight determined by the electrophoresis was 29,000. Amino acid analysis of the enzyme resulted in lack of cysteine. On the other hand, the enzyme was inhibited by PMSF. From the result, *Tricholoma* sp. protease was defined as a serine protease having fibrinolytic activity as subtilisin and or streptokinase.

緒言

前報の自然界から分離の担子菌 *Tricholoma* sp. に、比較的熱に対して安定で広い pH 領域に作用するプロテアーゼの存在を見出した。担子菌のプロテアーゼに関しては、子実体形成との関連でよく研究されており寺下¹⁾²⁾や川合³⁾の総説がある。担子菌は生育も遅くまた、酵素活性も低いので、酵素の生産という面では細菌、カビ、酵母などの微生物にその給源が求められている。しかしながら、担子菌にも凝乳酵素の検索⁴⁾⁵⁾が行われ、レンネット代替酵素の実用化に近い。本研究は、前報に述べたように血栓溶解酵素を検索する目的でプロテアーゼ活性を担子菌に求め、得られた *Tricholoma* sp. のプロテアーゼについてその精製と 2, 3 の酵素の性質を検討することを目的として以下その結果についてまとめた。

材料と方法

1. 供試菌株

供試菌株としては、前報に準じて自然界から分離の *Tricholoma* sp. W510 を用いた。

2. 酵素の精製

1) 菌糸体培養

菌糸体培養は、2000ml 容三角フラスコを用い 1200ml の 3% モルツ培地 (pH7.0) で、2 週間、20~25℃、巡回培養 (100rpm) を行った。培養後、遠心分離によって得られた上澄液、7745ml を粗酵素液とした。

2) 硫酸分画

上記粗酵素液に固体硫酸アンモニウムを加えて飽和度 0.7 とした。生じた塩析物は、遠心分離 (10000rpm) し、沈殿により得た。次いで塩析物を少量の蒸留水に溶解し、1 昼夜、5℃ で水に対して透析を行なった。

3) DEAE-Cellulose カラムクロマトグラフィー

透析後の試料を pH8.5(50mM)に調整後、酢酸アンモニウム緩衝液(pH8.5, 50mM)で平衡化した DEAE-Cellulose(和光純薬)カラム($\phi 4 \times 25\text{cm}$)に供し非吸着画分(プロテアーゼ活性)を集めた。

4)ゲル濾過

上記非吸着画分を濃縮(ポリエチレングリコール, 分子量, 20,000)後, 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.9, 50mM)に対して透析を行った試料を Sephadex G-75(ファルマシア, $\phi 3.3 \times 140\text{cm}$)に供した。

5)Butyl-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィー

上記で得られたプロテアーゼ活性画分を 20% 飽和硫酸アンモニウムを含む酢酸-酢酸ナトリウム(pH4.9, 50mM)で緩衝化された Butyl-Toyopearl 650M(トソー, $\phi 1.5 \times 18\text{cm}$)に供し, 吸着させた。吸着画分(プロテアーゼ活性)の溶出は, 同溶液と酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.9, 50mM)との直線濃度勾配法で行った。

6)ゲル濾過

上記で得られた活性画分は, 4)で示したゲル濾過(Sephadex G-75, $\phi 1.5 \times 130\text{cm}$)に供した。

3. 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⁶⁾により求めた。

4. 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⁷⁾の改良方法で測定した。

5. 電気泳動

SDS 電気泳動は, Laemmli の方法⁸⁾に従って 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。分子量マーカーとしては, ファルマシア社のキットを用いた。

6. アミノ酸分析

試料を 6N HCl で 110°C, 24 時間加水分解した後, 日立 835 型 Amino Acid Analyzer を用いて分析した。

結果および考察

1. *Tricholoma* sp. W510 のプロテアーゼの精製

自然界から分離の *Tricholoma* sp. の生産するプロテアーゼの精製の結果を Table 1 に示す。表中には, pH7 および pH11 を最適 pH とする 2 種のプロテアーゼ活性を示した。イオン交換クロマトグラフィーで極端な収率の低下をきたした。この原因は, 作用 pH に近く, 酵素が自己消化を起こしたことが考えられる。データは示していないが, CM-Cellulose カラムクロマトグラフィーにおいても, プロテアーゼ活性は素通り画分に現れた。本酵素は, 陰イオンおよび陽イオン交換カラムに吸着しない興味ある酵素である。

また最後のゲル濾過においても, タンパクの溶出ピークと酵素の活性ピークは一致するものの, 極度の酵素活性の低下が起こることから, 酵素の自己消化又は解離がおこりやすいことが想像される。

Table 1. Purification of protease from *Tricholoma* sp. W510

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)		Specific activity (units/mg)		Yield (%)	
		pH		pH		pH	
		7.0	11.0	7.0	11.0	7.0	11.0
Culture broth	25,172	2,542,136	2,105,674	101	84	100	100
70% (NH ₄) ₂ SO ₄ saturation	8,053	1,186,069	1,007,867	147	125	46.7	47.9
DEAE-Cellulose	291	78,343	202,487	269	696	3.1	9.6
1st Sephadex G-75	126	54,014	101,556	428	806	1.9	4.8
Butyl-Toyopearl 650M	52	48,360	68,746	930	1,322	2.1	4.8
2nd Sephadex G-75	26	39,778	36,300	1,560	1,424	1.5	1.7

Purification procedure was described in Materials and Methods.

2. SDS-PAGE

最終ゲル濾過の酵素の活性画分の SDS-PAGE を行った結果を、Fig. 1 に示す。その結果、約分子量 29000 と推定された。

3. 阻害剤の影響

各種の酵素阻害剤の影響を調べた結果を Table 2 に示す。酵素は、チオールプロテアーゼおよび金属プロテアーゼに対する阻害剤 PCMB, モノヨード酢酸, EDTA では、全く阻害されなかった。一方、セリンプロテアーゼに対する阻害剤である PMSF, NPGB に著しく阻害された。また、トリプシンに対する阻害剤の Lima bean には、若干の阻害作用を示した。これらのことよりセリンプロテアーゼであることが示唆され、タイプとしては、subtilisin に類似の酵素と推定された。

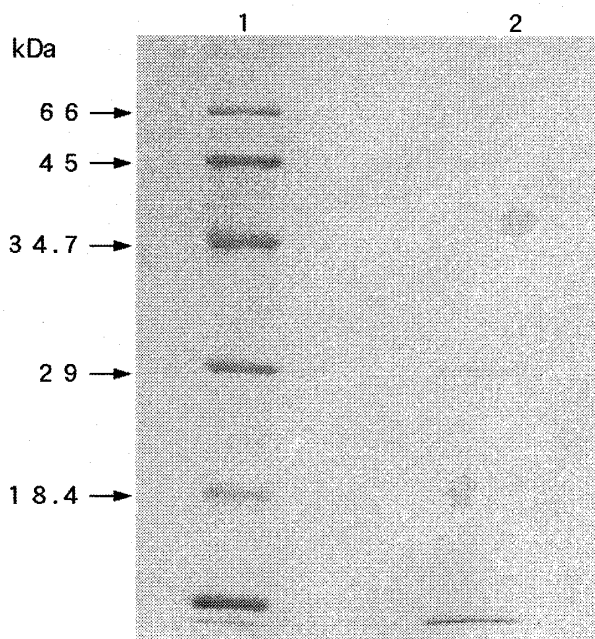


Fig. 1. SDS-PAGE of 2nd Sephadex G-75 fraction of *Tricholoma sp.* W510 protease

The 2nd Sephadex fraction (100 μ g of protein) was electrophoresed in 12.5% SDS-polyacrylamide gel and the gel was stained for BPB. Lane 1, marker; Lane 2, 2nd Sephadex G-75 fraction of protease from *Tricholoma sp.* W510.

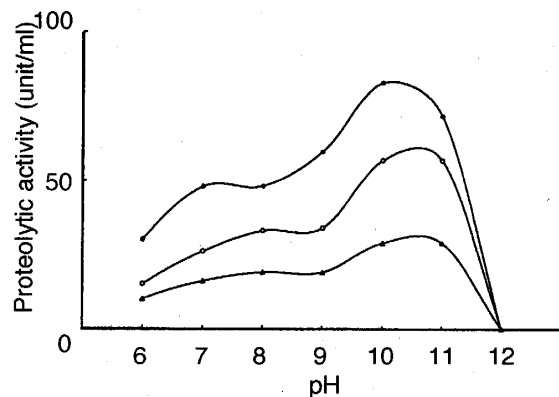


Fig. 2. Effect of pH on proteolytic activity

Reaction mixture contained 0.1 ml of protease solution and 0.5 ml of 0.6% casein solution. Buffer used were 0.05M phosphate buffer (pH6.0~8.0) and 0.01M borex-HCl or NaOH buffer (pH8.0~12.0). The mixture was incubated for 10 min at 30 $^{\circ}$ C (Δ), 40 $^{\circ}$ C (\circ), 50 $^{\circ}$ C (\bullet).

Proteolytic activity was assayed by the method as described in Materials and Methods.

4. pH の影響

Fig. 2 に反応温度と各種 pH の関係を示す。比較的広い pH 域で作用するが、最適 pH は、7 から 8 と 10 から 11 にみられた。試験した温度では、50 $^{\circ}$ C の場合が最も強い活性を示した。本酵素は、pH10~11 のアルカリ側でよく作用することがわかった。

5. 温度の影響

上記の結果、中性およびアルカリ性に作用する酵素の存在が示唆された。最適 pH と作用温度の関係を Fig. 3 に示す。その結果、最適 pH10, 11 では、50 $^{\circ}$ C 付近で作用し、pH7 においては、50 $^{\circ}$ C から 60 $^{\circ}$ C 付近で作用することが判明した。

6. アミノ酸組成

自然界から分離の *Tricholoma sp.* W510 の生産するプロテアーゼについてアミノ酸分析を行った結果を、Table 3 に示す。この結果からグリシン含量が高く、次いでアラニン、セリン、アスパラギン酸等も含量が高かった。しかしシステイン、メチオニンは、殆ど検出されなかった。システインを含まないという点で表に示したように、セリンプロテアーゼでしかも血栓溶解活性をもつ subtilisin や strep-

tokinase と類似した。担子菌のプロテアーゼは主として、酸性プロテアーゼと金属プロテアーゼの存在が多く知られているが⁹⁾、セリンプロテアーゼに関する報告は極めて少ない¹⁰⁾。一方、本菌の生産するプロテアーゼは、本誌において線溶活性を示すことをマウスによる経口投与の実験から明らかにした。

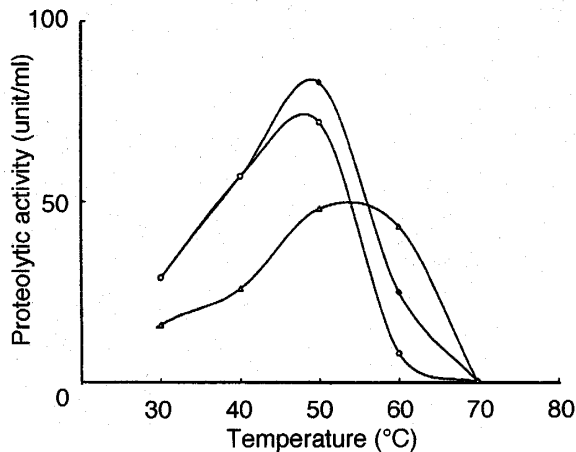


Fig. 3. Effect of temperature on proteolytic activity.

Reaction mixture contained 0.1 ml of protease solution and 0.5 ml of 0.6% casein solution. Buffers used were 0.05M phosphate buffer (pH7.0) and 0.01M borex-NaOH buffer (pH10.0, 11.0). The mixture was incubated for 10 min at various of temperature.

Proteolytic activity was assayed by the method as described in Materials and Methods. Δ , pH7.0, \bullet , 10.0, \circ , 11.0

要約

自然界から分離の *Tricholoma* sp. W510 の菌糸体培養によって培養液中に得られる 2 種のプロテアーゼを硫酸塩析, DEAE-Cellulose イオン交換クロマトグラフィー, Sephadex G-75 ゲル濾過, Butyl-Toyopearl 650M 疎水性クロマトグラフィー, 再ゲル濾過により精製を行った。最終精製品は、比活性で約 15 倍を示し、SDS 電気泳動による分子量の測定結果 29,000 であった。本酵素は、PMSF などのセリンプロテアーゼ阻害で強く阻害された。また、アミノ酸分析の結果からグリシン含量が高く、次いでアラニン、セリン、アスパラギン

酸含量も高く、システイン、メチオニンの存在は、ほとんど認められなかった。

文献

- 1) 寺下隆夫, バイオサイエンスとインダストリー, 50, 759-765 (1992)
- 2) 寺下隆夫, 1996 年版きのこ年鑑, p187-197 (1996)
- 3) 川合正充, きのこの利用, 築地書館, (東京), p10-132 (1988)
- 4) Kobayashi, H., Kusakabe, I. and Murakami, K., *Agric. Biol. Chem.*, 47, 551-558 (1983)
- 5) Kobayashi, H., Kim, H., Itoh, T., Kasamo, K., Kusakabe, I. and Murakami, K., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 440-441 (1994)
- 6) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951)
- 7) Hagihara, B., *Ann. Rep. Fac. Sci. Osaka Univ.*, 2, 35-79 (1954)
- 8) Laemmli, U. K., *Nature*, 227, 680, (1970)
- 9) 寺下隆夫, きのこの科学, 1, 161-77, (1994)
- 10) 橋本洋一, キノコの化学・生化学 (水野卓・川合正充編), 学会出版センター (東京), P197-204, (1992)

担子菌 *Tricholoma sp.* の生産するプロテアーゼの精製と特性

Table 2. Effect of Inhibitors on proteolytic Activity

Compound	Concentration* (mM)	Remaining activity(%)			
		<i>Tricholoma sp.</i> Protease	Trypsin	Chymotrypsin	Subtilisin
None	—	100	100	100	100
PCMB	2.0	100	—	—	—
Monoiodoacetate	2.0	100	—	—	—
EDTA	5.0	100	—	—	—
HgCl ₂	2.0	44	—	—	—
PMSF	0.5	10	85	0	10
NPGB	0.5	25	9	21	89
Limabean	0.06(%)	89	14	48	100

Reaction mixture each contained 0.025ml of 0.1M Tris-HCl buffer (pH7.2), 0.025ml of enzyme solution and 0.05ml inhibitor. Reaction was performed at 30°C pH7.2 for 10min.

* Concentration in the first incubation mixture.

Abbreviations: PCMB, p-chloromercuribenzoic acid; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid;

PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; NPGB, p-Guadinobenzoste HCl.

Table 3. Amino acid composition of *Tricholoma sp.* W510 protease

Amino acid	<i>Tricholoma sp.</i> W510 Protease	<i>Bacillus subtilis</i> Subtilisin Carlsberg	<i>Streptococcus</i> Streptokinase
Asp	11.23 Mol%	10.22 Mol%	16.11 Mol%
Thr	10.87	6.93	7.13
Ser	13.46	11.68	5.75
Glu	1.09	4.38	11.10
Pro	2.89	3.38	4.80
Gly	16.68	12.77	4.99
Ala	15.67	14.96	5.37
1/2 Cystine	0.18	0.00	0.00
Val	6.37	11.31	5.49
Met	0.18	1.82	0.61
Ile	3.82	3.65	5.31
Leu	6.22	5.84	9.61
Tyr	4.17	4.74	4.84
Phe	1.76	1.46	3.59
Lys	1.50	0.36	0.26
His	2.16	3.28	7.99
Arg	1.75	1.82	2.14
Trp	—	1.46	4.91