

氏 名（本籍） つじ た よ し お
辻 田 代 史 雄

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 1 9 7 号

学位授与年月日 昭和 5 6 年 2 月 1 2 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 *Aspergillus oryzae* の酸性プロテアー
ゼに関する研究

論文審査委員（主 査）

教授 志 村 憲 助 教授 高 橋 甫

教授 松 田 和 雄

論文内容要旨

緒言

古くから清酒や味噌等の醸造に利用されてきた黄麹菌 Aspergillus oryzae は、多くの加水分解酵素を生産しその一部は消化酵素剤や、消炎酵素剤として医薬にも利用されている。

そのうち、酸性プロテアーゼは代表的なものの一つであり、上記食品の醸造過程やタンパク性食物の消化等に重要な役割を果している。このような重要性にもかかわらず、本酸性プロテアーゼの研究は従来十分に行なわれておらず、分子種の数、分子量および基質特異性をはじめとする酵素化学的性質が不明のままであった。

本研究では上述の諸点を解明することを第1の目的として、固体培養および液体培養で細胞外に生産される A. oryzae の酸性プロテアーゼの精製と諸性質の検討を行なった。その結果、本酵素の一部は多糖体を著量に含んでおり、その多糖体の不均質性が本酵素の不均質性の原因となっていることを明らかにした。さらに、本酵素のタンパク質—多糖体間の結合様式が非共有結合であることを証明した。

A. oryzae をはじめとするカビ類は種々の酵素を細胞外に分泌することが知られているが、それらの分泌機構については、従来全く研究されていなかった。本研究では、本菌の酸性プロテアーゼの分泌機構解明の手掛かりを得る目的で、細胞内に存在する酸性プロテアーゼを追跡し、その実体を明らかにすることを第2の目的とした。その結果、細胞内には細胞外酵素とほとんど同じ性質を有する細胞内可溶性酸性プロテアーゼの他に、粗面および滑面ミクロソーム中に、2種類の酸性プロテアーゼが微量存在することを発見した。次いでこれらの酵素を精製し、それらの諸種の酵素化学的性質では細胞外酵素との間に差異が認められないにもかかわらず、膜結合酵素は界面活性剤により活性化を受けるという特異な性質を有することを明らかにした。

また、以上の研究結果から、本研究で発見された膜結合および細胞内可溶性酸性プロテアーゼが、本酵素の生合成および分泌過程にある前駆体である可能性を推定した。

第 I 編 細胞外酸性プロテアーゼ

第 1 章 固体培養で生産される酸性

プロテアーゼの精製と性質

タカチアスターゼ (*A. oryzae* の穀培養抽出液から得た市販品) から 2 種の酸性プロテアーゼ (A_1 および A_2) を精製した。

両酵素の至適 pH は、カゼインおよびチトクローム c を基質とした場合ともに 3.0 であり、ヘモグロビンの場合は 4.2 であった。両酵素とも酸性領域でトリプシノーゲンを活性化し、低濃度の sodium lauryl sulfonate 処理で失活した。熱安定性は A_1 が A_2 よりも若干高かった。

Table 1. Summary of physical and chemical properties of *A. oryzae* acid proteases A_1 and A_2 .

Properties	A_1	A_2
$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280nm	5.9	11.1
Elementary analysis (%):		
N	6.3	13.4
C	44.2	48.3
H	6.7	7.1
Carbohydrate content (%)	49	0.3
Isoelectric points	3.15, 3.50	3.90
Sedimentation constant, $S_{20,w}$ (S)	3.93	3.16
Diffusion constant, $D_{20,w}$ (cm^2/s)	$5.65 \cdot 10^{-7}$	$8.61 \cdot 10^{-7}$
Partial specific volume, v (ml/g)	0.73	0.73
Molecular weight	63,000	32,000

Table 1 に示すように沈降定数、拡散定数および偏比容から求めた分子量は A_1 が 63,000、 A_2 が 32,000 と著しい差があるにもかかわらず、両者のアミノ酸組成には差が認められず、しかも免疫学的にも交叉性を示した。次いで酸性プロテアーゼ A_2 はほとんど糖を含まないのに反し、 A_1 はグルコース、ガラクトースおよびマンノースを主成分とする糖を 49% も含んでいることを明らかにした。

以上の結果から、酸性プロテアーゼ A_1 のタンパク質部分は A_2 のそれと同一であ

ると結論した。

第2章 固体培養で生産される酸性プロテアーゼA₁の糖部分の性質

酸性プロテアーゼA₁のように中性糖のみで構成される糖を50%も含む例は、未だに報告されていない。そこで、本酵素に結合している糖部分の物理的および化学的性質を検討した。

焦点電気泳動により酸性プロテアーゼA₁は、それぞれ49%の糖を含む主成分A_{1a}と微量成分A_{1b}の2成分に、さらに分割された。A_{1a}とA_{1b}の両成分をプロナーゼで完全に水解後、得られた糖部分のゲル濾過の成績から、Table 2に示すようにA_{1a}はグ

Table 2. Carbohydrate compositions of polysaccharide fractions from pronase digest of acid proteases A_{1a} and A_{1b}.^(a)

After digestion of enzyme samples by pronase, polysaccharide fractions (A, B, C and D) were obtained from gel filtration on Sephadex G-100 and hydrolyzed with HCl followed by carbohydrate analysis.

Carbohydrate residue	A _{1a} (molar ratio)			A _{1b} (molar ratio)
	A	B	C	D
Glucose	0.27	0.38	0.75	52.2
Galactose	3.77	2.62	9.82	9.95
Mannose	1.0	1.0	1.0	1.0
Fructose				5.84
Xylose				2.74

(a) The values are expressed as mole of residue per mole of mannose.

ルコース、ガラクトースおよびマンノースから成る3種の多糖体と結合していること、およびA_{1b}は上記3種の糖の他にフラクトースとキシロースを構成成分とする

1種の多糖体と結合していることを明らかにした。

次に以下の実験事実から、酸性プロテアーゼ A_1 における糖-タンパク質間の結合はかなり強固であるにもかかわらず、非共有結合であることを明らかにした。すなわち、

- (1) A_1 をプロナーゼで消化して得られた多糖体中にアミノ酸が検出されなかった（従来知られている糖タンパク質の例では全てアミノ酸が検出されている）。
- (2) A_1 を冷トリクロル酢酸、8 M 尿素あるいは6 M 塩酸グアニジン等で処理しても多糖体はタンパク質部分から離れなかったが、50%酢酸処理（37°C，48時間）により完全に解離した（Table 3）。
- (3) 一方、通常の糖タンパク質を50%酢酸で同様に処理した場合には、それらのN-グリシコルまたはO-グリコシル結合は解裂しなかった。

以上の実験結果より、*A. oryzae* の酸性プロテアーゼ A_1 は、多糖体が非共有結合でタンパク質部分に結合している極めてユニークな構造を有することが示された。

Table 3. Effect of 50% acetic acid, 8 M urea, and 6 M guanidine hydrochloride on the protein-carbohydrate association of acid protease A_1 of *A. oryzae*.^(a)

Acid protease A_1 was made up to 50% acetic acid, 8 M urea, or 6 M guanidine hydrochloride and incubated for 48 h at 37°C. Then, the mixture was treated with trichloroacetic acid (TCA) and TCA soluble and insoluble fractions were obtained by centrifugation.

Treatment with	Carbohydrate (%)		Protein (%)	
	Supernatant	Pellet	Supernatant	Pellet
50% Acetic acid	92.0	1.6	7.1	82.3
8 M Urea	93.0	2.0	89.0	4.1
6 M Guanidine-HCl	89.1	3.2	87.4	5.1
Control	99.3	1.6	88.3	6.2

(a) The values are expressed as percent of the original carbohydrate or protein.

第3章 液体培養により生産される

酸性プロテアーゼの多様性

A. oryzae を液体培養して得た培養濾液から精製した酸性プロテアーゼは、Sephadex G-100で分子量の異なるE₁, E_{1a}, E_{1b} およびE₂の4分子種に分かれた (Table 4)。しかもE₁およびE_{1a}の2分子種は焦点電気泳動でさらに3-5成分に分画された。

Table 4. Molecular weight, carbohydrate content and sugar composition of extracellular acid proteases of A. oryzae.

	Acid protease fraction			
	E ₁	E _{1a}	E _{1b}	E ₂
Molecular weight	60,000	55,000	49,000	42,000
Carbohydrate content (%)	43.0	38.8	30.5	18.9
Sugar composition ^(a)				
Glucose	0.23	0.32	0.29	0.86
Galactose	3.91	2.92	1.37	0.78
Mannose	1.0	1.0	1.0	1.0

(a) After digestion of enzyme samples by pronase, carbohydrate-containing fractions obtained were hydrolyzed with HCl followed by carbohydrate analysis. The values are expressed as mole of residue per mole of mannose.

これら4分子種の至適pH、基質特異性およびアミノ酸組成等の酵素化学性質は全て第1章で述べたA₁およびA₂と同じであり、しかも免疫化学的にも交叉性を示し、また、これら4分子種は全て糖を含有し、固体培養で生産されるA₂のような糖を全く含まない分子種は見出されなかった。これらの糖部分は全てグルコース、ガラクトースおよびマンノースの3種の6炭糖から構成されていたが、各糖の絶対量および各糖の組成比は4分子種の間で各々異なっていた (Table 4)。また糖の一

部分はガラクトサンおよびマンサンのようなホモポリマーとして結合していることが明らかとなった。

以上の実験結果から、A. oryzae の酸性プロテアーゼは、その糖含量および組成が生育条件により変動し、液体培養で生産される酵素が多成分に分画されるいわゆる microheterogeneity を示すのは、結合している糖の不均質性に起因するものと結論した。

第II編 膜結合酸性プロテアーゼ

第1章 膜結合酸性プロテアーゼ

の発見と可溶化

微生物は多くの加水分解酵素を細胞外に分泌している。しかし、これらの酵素が細胞内で合成された後にどのような機構で細胞外に分泌されるかについては不明の点が多い。

筆者は A. oryzae の酸性プロテアーゼを題材に、カビの細胞外酵素の分泌機構を解明する研究の一環として、細胞内、特に膜画分に着目した。その結果、破碎菌体中に微量の酸性プロテアーゼ活性が検出され、しかもその15%は膜画分（ $500 - 105,000 \times g$ 遠心分離のペレット）に回収されることを発見した（残り85%は $105,000 \times g$ 遠心分離の上清に存在）。

膜結合酸性プロテアーゼは Triton X-100 やデオキシコール酸等の界面活性剤で完全に可溶化された。また、ホスホリパーゼAやカタツムリ消化管抽出液等によっても一部可溶化されたが、リゾチーム、セルラーゼおよびプロテアーゼ類等によってはほとんど可溶化されなかった。

第2章 膜結合酸性プロテアーゼ

の精製と性質

大量の A. oryzae の若い菌体を磨碎し、得られた膜画分（ $500 - 105,000 \times g$ 遠

心分離のペレット) から Triton X-100 による可溶化, アセトン洗浄および Bio-Gel A-15m によるゲル濾過により, 2 種の膜結合酸性プロテアーゼ (M_1 および M_2) をディスク電気泳動的に単一に精製した。SDS-ディスク電気泳動法で求めた分子量は M_1 が約 150,000 および M_2 が約 60,000 であった。

これらの膜結合酵素は, 至適 pH, トリプシノーゲンの活性化および阻害剤の影響

Table 5. Activation of acid proteases M_1 and M_2 by various lipids and Triton X-100.

The reaction mixture (150 μ l) contained 35 μ l of water, 50 μ g of lipids suspended in 5 μ l of methanol (or 5 μ l of 7% Triton X-100), 10 μ l of purified enzyme solution and 100 μ l of 1% milk casein (pH 3.0). Enzyme samples used in these experiments were treated with acetone in order to eliminate Triton X-100 prior to use.

Lipid	Activity of acid protease (% of control)	
	M_1	M_2
Control	100	100
Phospholipids		
phosphatidyl ethanolamine	120	275
phosphatidyl serine	95	260
phosphatidyl inositol	125	260
phosphatidyl choline	150	260
lysophosphatidyl choline	120	255
phosphatidyl glycerol	125	270
Monoglycerides		
monopalmitin	140	280
monoolein	130	270
monostearin	165	340
monocaprin	150	320
monolinolein	140	340
Diglycerides		
1,2-dipalmitin	160	300
1,2-diolein	110	210
1,2-distearin	130	210
1,3-dipalmitin	105	130
Cerebroside	115	170
Cholesterol	130	300
Triton X-100	865	370

響等から、細胞外酵素とほぼ同じ酵素化学的性質を有し、かつ細胞外酵素 A_2 の抗血清と交叉性を示した。また、 M_1 および M_2 ともにグルコース、ガラクトースおよびマンノースから成る多糖体を著量 (M_1 は 80.5%, M_2 は 52.5%) 含んでいた。

以上のように膜結合酵素は細胞外酵素と共通する諸性質を有するが、他方では膜結合酵素特有の性質を持っていることが明らかとなった。すなわち、Table 5 に示すように、 M_1 および M_2 とも界面活性剤 (Triton X-100) でその酵素活性は 4-9 倍活性化にされた。特に M_1 は界面活性剤が存在しないと凝集する性質を示した。

第 3 章 膜結合酸性プロテアーゼ の細胞内局在

次に A. oryzae の膜結合酸性プロテアーゼ M_1 および M_2 の細胞内局在性を検討した。若い菌体を Bacillus circulans (WL-12) 株とカタツムリ消化管抽出液の溶菌酵素で処理して得られるスフェロプラストから膜画分を集め、蔗糖密度勾配遠心法により調べた結果、 M_1 の大部分は粗面ミクロソーム (密度 1.19 g/ml) に局在することが明らかとなった。また M_2 の大部分は細胞質膜に、残りは粗面ミクロソーム中に分布していることが示された。電子顕微鏡による観察結果、ミクロソーム画分のピューロマイシン処理実験の成績およびマーカー酵素の分布状況と RNA 含量の成績も上述の結論を支持した。

第Ⅲ編 細胞内可溶性酸性 プロテアーゼ

第Ⅱ編、第 1 章で述べたように A. oryzae の菌体の破碎抽出液中に検出される酸性プロテアーゼ活性の約 85% は可溶画分に回収された。本酵素活性はゲル濾過により 2 成分に分画され (F_1 および F_2)、両分子種とも種々の酵素化学的性質が細胞外酵素と一致した。

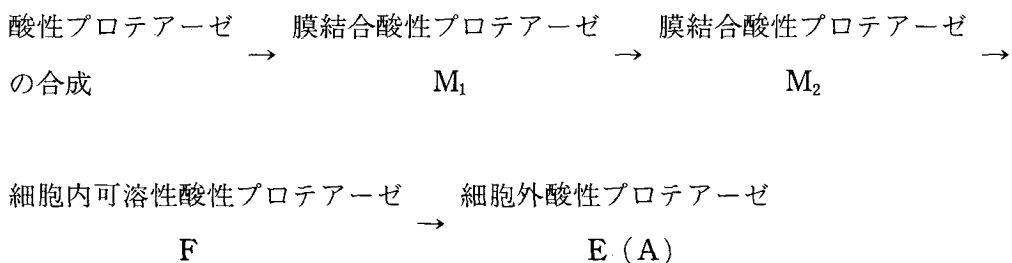
なお、本酵素は界面活性剤、極性脂質により全く活性化を受けない点で、膜結合

酵素と明らかに異なっていた。また機械的破碎法だけでなく溶菌酵素処理によっても F_1 および F_2 は菌体から遊離する事実から、これらが細胞壁中ではなく、ペリプラスミク・スペース中に存在するものと推定した。

総 括

以上の研究により A. oryzae の生産する細胞外酸性プロテアーゼの性質と実体はほぼ解明された。従来の諸研究がこれらの点を十分追究し得なかった最大の原因は、本酵素が数種の分子種から成る (Table 2 および 6) という特徴を有することにあつたものと考えられる。本酵素に結合している多糖体は本酵素のいわゆる microheterogeneity の原因となっている事実、およびこの多糖体が非共有結合でタンパク質部分と結合していること (Table 3) は、特に注目すべき興味深い事実である。

A. oryzae の細胞内には、細胞外酸性プロテアーゼとほとんど同じ性質を示す細胞内可溶性酵素 F (Table 6) の他に、2 種の膜結合酵素 (M_1 および M_2) が存在し、これらは種々の性質が細胞外酵素と類似しているにもかかわらず (Table 6)、界面活性剤や脂質で活性化される特異な性質を示した (Table 5)。主として粗面ミクロソームに局在する M_1 が、界面活性剤存在下でも十分な活性を示し得ないこと、および主として滑面ミクロソームに局在する M_2 が、界面活性剤存在下ではじめて細胞外酵素と同じ活性を示す事実は、これら膜結合酵素のコンホメーションが細胞外酵素と異なっていることを示すものである。これらの関係を模式的に表わすと次のようになる。



すなわち, A. oryzae の酸性プロテアーゼは, リボソームで合成され細胞膜を経て分泌される過程で, 次第にコンホメーションが変化し, ついに細胞外酵素と同じコンホメーションを有する細胞内可溶性酵素Fになり, 細胞外酵素E (A) へと分泌されるものと考えられる。

Table 6. Summary of properties of acid proteases in A. oryzae.

Acid protease A, extracellular acid protease from solid bran culture;
acid protease E, extracellular acid protease from liquid culture;
F, intracellular soluble acid protease (partially purified);
M, membrane-bound acid protease.

	Acid protease									
	A		E				F		M	
	A ₁	A ₂	E ₁	E _{1a}	E _{1b}	E ₂	F ₁	F ₂	M ₁	M ₂
Optimum pH (Hemoglobin)	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
(Cytochrome c)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.2	3.2
Activation of trypsinogen (nmol/acid protease unit)	12.6	10.6	9.4	10.5	12.2	10.6	11.2	10.4	9.7	10.8
Inactivation by sodium dodecyl sulfonate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Activation by Triton X-100	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Specific activity (units/mg protein)	660	815	590	621	572	644	62	80	(140)	240(867) ^a
Cross-reactivity against anti-A ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Molecular weight ($\times 10^{-3}$)	63	32	60	55	49	42	60	42	150	60
(Protein portion, $\times 10^{-3}$) ^b	32	32	34	34	34	34			29	29
Carbohydrate content (%)	49.0	0.3	43.0	38.8	30.5	18.9			80.5	52.2

^a Values in parentheses represent enzyme activity measured in the presence of 0.7% Triton X-100. ^b Molecular weight (MW) of protein portion = $MW - \frac{MW \times \text{carbohydrate content (\%)}}{100}$

審 査 結 果 の 要 旨

古くから清酒や味噌等の醸造に利用されてきた黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、多種類の加水分解酵素を生産し、その一部は消化酵素剤や消炎酵素剤として医薬にも多量使用されている。中でも酸性プロテアーゼは代表的なものの一つで、上記食品の醸造過程や食物の消化等に重要な役割を果たしているにもかかわらず、その詳細な研究は行われておらず、分子種の数、分子量、基質特異性等をはじめとする酵素化学的性質は不明であった。

本研究は、上述の諸点を解明することを第一の目的として行われたもので、まず、*A. oryzae* の固体培養により細胞外に生産される酸性プロテアーゼを分離・精製し、その諸性質を検討した。2種類の酸性プロテアーゼ A_1 および A_2 が得られ、 A_2 はほとんど糖を含まないのに対し、 A_1 は中性糖を主成分とする糖を 49% も含むという著しい差異のあることを明らかにした。さらに、この多量の糖と蛋白質の結合様式を詳細に検討し、多糖体が非共有結合によって蛋白質と複合体を形成しているという極めて珍しい構造である事実を明らかにした。

さらに、*A. oryzae* を液体培養して培地中に酸性プロテアーゼを産生させ、3～5成分の酵素分子種を分画した。それらは何れも糖を含有し、糖含量により分子種の microheterogeneity が生ずることを明らかにした。

ついで著者は、これらの酸性プロテアーゼの分泌機構を解明する研究の一環として、細胞内より酸性プロテアーゼを分離することを試み、細胞内可溶性酵素 F および 2種の膜結合性酵素 M_1 および M_2 を新しく分離することに成功した。これらの酵素の諸性質より、リボソーム系で合成された酸性プロテアーゼは、 $M_1 \rightarrow M_2 \rightarrow F$ の分子形態を経て細胞外プロテアーゼに移行するものと推定した。

以上のように本論文は *A. oryzae* の酸性プロテアーゼに関し詳細な研究を行い、さらにその分泌機構にも新しい知見を加えたもので、酵素化学分野のみならず、応用面においても寄与するところが大きい。著者に農学博士の学位を授与するに十分な価値があると判定する。