



Aspergillus ochraceus WILHELM の蛋白分解酵素について（第2報）：酵素活性とCa⁺⁺との関係（其の1）

三宅，捷
吉村，貞彦
岸田，忠昭

(Citation)

兵庫農科大学研究報告．農芸化学編, 4(1):23-26

(Issue Date)

1959-12

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLDOI)

<https://doi.org/10.24546/81008200>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81008200>



Aspergillus ochraceus WILHELM の蛋白分解酵素について

(第 2 報)

酵素活性と Ca^{++} との関係 (其の 1)

三宅 捷・吉村 貞彦・岸田 忠昭

Studies on the Proteinase of *Aspergillus ochraceus* WILHELM (Part II)

Relation between enzymatic activity and Ca ion (1)

Suguru MIYAKE, Sadahiko YOSHIMURA and Tadaaki KISHIDA

緒 言

前報¹⁾に於て紫外線照射を施した *Aspergillus ochraceus* より結晶状に蛋白分解酵素を取出すことに成功し併せてその性質の一部につき報告したが、本酵素はその特徴の 1 つとして透析により、速に失活を起すが Ca^{++} 又は CN^- イオンは酵素活性の回復をもたらすことを指摘した。

微生物の生産する蛋白分解酵素のうちには、それらの活性促進或いは失活保護に対し Ca^{++} イオンは他の金属イオンに比べ、特異的に有効であることが可成り多数に指摘されており²⁾、 Ca^{++} イオンの意義については甚だ興味深い様に考えられる。著者等は、供試菌の蛋白分解酵素に対する Ca^{++} イオンの動向を更に知らんとして次の実験を行った。

実 験 法

1) 酵素液：紫外線照射を施した *Aspergillus ochraceus* WILHELM 4069 を使用し、前報¹⁾の操作で結晶化した酵素標品を更に 2 回再結したものを水で溶解し、後溶液中の Ca^{++} を除去する為 5°C で透析を行い、目的に応じ適宜希釈して使用した。

2) 酵素活性の測定：主として前報^{1,3)}で採用した ANSON 法に準ずる銅 FOLIN 呈色法⁴⁾を用いた。但し本法による呈色値が正確を期し得ない場合にはカゼイン—275m μ 法によった。即ち、カゼイン液、酵素液からなる混合液を 35°C で正確に 10 分間反応させた後、その最終濃度が 0.2M となる様に三塩化酢酸（以下 TCA と略記）液を加えて反応を停止させると共に、更に同温度で 30 分間放置し、未反応のカゼインを沈澱させて後濾過する。この濾液について波長 275m μ での吸光度を日立製 BECKMAN DU 型分光光度計で測定し、Blank の示す値との差をもつて便宜上活性の比較を行った。

3) pH の測定：ガラス電極（日立製 pH メーター）及び東洋濾紙株式会社製 pH 試験紙を使用した。

実 験 結 果

1. 酵素の熱失活に対する金属イオンの保護作用

前報¹⁾に於て本酵素活性に及ぼす 2・3 の有機及び無機試薬の影響を検討し、 Ca^{++} 及び CN^- イオンは酵素作用を促進することを指摘したが、本酵素が熱失活時金属イオンその他により活性の破壊が保護されぬかを知らうとして次の様な実験を行った。

酵素液（14 時間透析）1cc 及び第 1 表に掲げた試薬溶液（最終濃度 10^{-2}M ）、M/5 Tris-(hydroxymethyl)-amino methane M/10 塩酸緩衝液⁵⁾（以下 Tris 緩衝液と略記）各 2cc 宛からなる混合液を 55°C、5 分間加熱処理を施し、急冷後 35°C で 4% カゼイン 1cc を加え 10 分間反応させた後、0.8M TCA 液 2cc を加えて反応を停止し、275m μ 法での吸光度を測定し、更に同一組成で加熱処理を行わないものが同一操作で示す吸光度と比較し

第 1 表 酵素の熱失活に対する金属イオンの保護作用

金属イオン（最終濃度 10^{-2}M ）	無 処 理	55°C 5分 処 理	残存活性
			無添加
無 添 加	1.040	0.378	100.0%
Ca^{++} ($\text{Ca}(\text{Ac})_2$)	0.770	0.471	168.6
CN^- (KCN)	1.050	0	—
As^{++} (Na-Arsenate)	1.040	0.157	41.6
Li^{++} (LiSO_4)	1.050	0.245	64.2
Cd^{++} (CdSO_4)	0.288	0.028	26.7
Mg^{++} (MgSO_4)	0.791	0.193	67.2
Cu^{++} (CuSO_4)	0.725	0.010	3.9
Fe^{++} (FeCl_2)	0.840	0.070	22.9
Mn^{++} (MnSO_4)	0.430	0.150	96.1
Zn^{++} ($\text{Zn}(\text{Ac})_2$)	0.168	0.013	21.2

pH 7.52, カゼイン—275m μ 法

第2表 Ca^{++} 濃度と残存活度との関係

活	Ca^{++} 濃度(M)	(標準)	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
性	加熱前	0.740	0.622	0.745	0.730
度	加熱後 (55°C 5分)	0.359	0.507	0.626	0.603
残 存 活 度 (%)		48.5	81.5	84.3	82.6

pH 7.52, カゼイン-275m μ 法

た。その結果を第1表に示した。

それによれば、実験に供した各種試薬のうちで、熱失活を保護せず逆に破壊を促進するものは、その強度の順からみて、 Cu^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} , Cd^{++} , As^{++} , となっており Li^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} の順になっている。これに対し熱失活を保護すると認められたものは、表に掲げた試薬のうちでは Ca^{++} だけである。即ち実験した条件下で標準の残存活度は加熱前の約36%であるに対し、 Ca^{++} を加えた場合のそれは約61%を示し、従って両者を比較した場合失活保護率は68%と顕著な効果を示している。

蛋白分解酵素については、 Ca^{++} が効果的に作用する例は可成り報告されており²⁾、その作用は、それらの活性促進が熱失活保護のいずれか1つに限られるものが多い様であるが、本酵素の場合この様に、活性の促進及び酵素蛋白の熱失活保護と両作用を有するものは比較的少ない様である。

尙、 CN^- イオンは透析により一部失活を起した本酵素の活性回復をひき起す効果をもつことは、すでに指摘したが酵素が熱により破壊される際には何らの保護作用を認めることが出来ず、上述 Ca^{++} とは異った役割を果すものと考えられる。

次に、 Ca^{++} ($\text{Ca}(\text{Ac})_2$ を使用した) イオンの濃度と加熱時の本酵素の活性残存との関係を知らんとし、 Ca^{++} の濃度が 10^{-2} , 10^{-3} , 及び 10^{-4}M となる如く上記と全く同一操作で実験を行った。その結果を第2表に示した。

表によると Ca^{++} の濃度が高い時には幾分保護作用は低濃度の場合に比べ劣る様である。それにも拘らず Ca^{++} を含まないものに比べ上記条件下では標準より約70%以上も多く活度は残存する。実験した条件下で熱失活を最小ならしめるに必要な Ca^{++} の濃度は 10^{-3} 乃至 10^{-4}M 附近にあるものと認められた。

2. 酵素の熱処理時に於ける Ca^{++} の保護作用と pH との関係

第3表 熱失活酵素の活性回復

		保 存 時 間		
		0	1	6
35°Cで保存	Ca^{++} 含	0.08	0.043	0.035
	無	0.028	0.019	0.02
5°Cで保存	Ca^{++} 含	0.08	0.052	0.042
	無	0.028	0.025	0.010

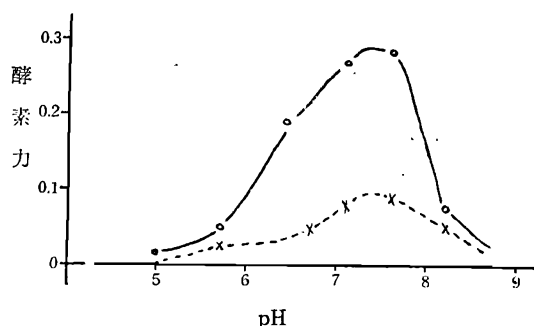
1に於て熱処理酵素に対し Ca^{++} は保護的に作用することが判明したが、その場合 Ca^{++} が如何なる pH 域に於て最も酵素作用を保護するかを究明しようと試みた。

酵素液 (24時間透析したもの) 1cc 及び $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ (最終濃度 10^{-3}M)、緩衝液 (SÖRENSEN 枸橼酸ソーダー苛性ソーダー緩衝液⁶⁾ 及び TRIS 緩衝液⁵⁾ を使用した) 各 2cc 宛からなる混合液を55°C 5分間加熱処理を行い、急冷後35°Cで4%カゼイン 1cc を加えて10分間反応させた後、0.8M の TCA 液で反応を停止させ沈澱を除去した濾液につき 275m μ 法で吸光度を測定した。その結果は第1図の如く、 Ca^{++} を含有した方は pH 7~8 即ち作用最適附近に於て顕著に酵素作用を保護することが認められた。換言すれば pH 7.5附近に於ける残存活度は、標準 (Ca^{++} を含有しないもの) の約3.22倍となっている。

3. 熱失活酵素の活性回復について

前報¹⁾に報告した通り本酵素は $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ により賦活されることは明らかであるが、熱失活した酵素が Ca^{++} の存在下でその活性を回復することがある種の酵素に於て認められているが²⁾、本酵素についてもこのことにつき実験を試みた。

酵素液 (48時間透析) を55°C 5分間加熱処理を施し急冷後、この酵素液、 $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ 液 (最終濃度が 10^{-3}M となる様に) 及び TRIS 緩衝液を1:4:4の割合で混合し35°C 及び氷室中 (5°) に保存し、一定時間毎に1cc宛とり、カゼイン-銅 FOLIN 法により吸光度を測定した。同時に前記被加熱酵素液に Ca^{++} を添加しない ($\text{Ca}(\text{Ac})_2$ の代りに蒸留水を用いた) のものについても実験した。その結果は第3表に示す通り35°及び5°に長時間被検液を保つても活性度は殆んど変化せず Ca^{++} は熱失活酵素の回復に役立たぬことを認めた。



第1図 処理時に於ける Ca^{++} の保護作用と pH との関係

55°C 5分処理 ○——○ Ca^{++} 添加
M/1000 $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ ×……× 標準

Ca^{++} により酵素の安定性及び / 又は活性度の維持又は促進される酵素は知られている⁷⁾が、 Ca^{++} が活性を促進するに拘らずその安定性を保護せぬ場合も又知られて居り⁸⁾、この保護作用を営むイオンはいくつか知られている。本酵素の場合も熱失活が Ca^{++} 以外のイオンにより保護されるか、否かについては別に実験を行う予定である。

4. EDTA の濃度と阻害作用との関係

以上のことによつて Ca^{++} は本酵素に対し賦活作用並びに熱失活保護作用を有することが判明したのであるが、 Ca^{++} が果して本酵素の Active center の正規の構成成分であるか、或いは酵素蛋白の安定に役立つものかを明らかにしようとして、先ず酵素の阻害実験で主として2価の金属イオンの有する機能を判断する手段として広く採用される EDTA が如何なる行動をとるかを確かめようとした。

先ず酵素活性が EDTA の存在によつて減少する場合その濃度により如何に変動するかを究明した。

EDTA, Tris 緩衝液 (pH 7.52) の各2cc宛の混合液を35°Cで5分間 Preheat し酵素液 (蒸留水 (5°) で24時間透析) 1ccを入れた後、4%カゼイン1ccを入れ常法通り10分間反応させ、0.8M TCA 液 2ccで反応を停止させ、沈澱を除去した濾液につき 275m μ 法で吸光度を測定した。その結果を第4表に示した。

これによると、EDTA M/1000以下の濃度に於ては本酵素は87%前後で活性を残存している。又一方、M/100以上の濃度に於ては活性の残存率の減少が非常に少なくなっている。EDTA 濃度 M/1000~M/100 に於ては残存活性が急激に減少していることから、本酵素は EDTA 濃度と残存活性との間に密接なる関係を有しているもの

第4表 EDTA の濃度と阻害作用との関係

EDTA最終濃度	吸光度	吸光度 / 標準
(標準)	0.416	100.0 (%)
M/10	0.110	26.4
M/30	0.136	32.7
M/50	0.138	33.2
M/100	0.143	34.4
M/500	0.310	74.5
M/1000	0.365	87.7
M/5000	0.360	86.5
M/10000	0.362	87.0
M/50000	0.367	88.2

pH 7.52 カゼイン —275m μ 法

と推察される。

EDTA 濃度 M/10 の高濃度の場合に於ても尚活性を残存することは本酵素の Active center の一部と考えられる Ca^{++} の中でも EDTA によつて容易に捕獲されないものと、そのままの状態に於ては EDTA により比較的捕獲され難いものとの2種類の Ca^{++} があると考えられ、後者が茲で EDTA M/10 に於ても尚活性を残存せしめている原因の Ca^{++} であつて、これは適当な処理 (例えば、加熱処理等) によつて始めて EDTA に捕獲され活性を失うものと考えられる。

5. 酵素の熱処理時に於ける EDTA の影響

前実験で示した様に本酵素は EDTA 最終濃度 M/10 でも尚完全に失活せず可成りの活性を残すが加熱により失活を引起した酵素に EDTA が如何に影響するかを知らんとした。この場合、酵素液は24時間及び48時間透析したものを実験に供した。

この様な酵素液夫々1cc宛を分取後、それらに各々 Tris 緩衝液、第5表に掲げた濃度になる様 EDTA 液を各2cc宛を加え、この様な混合液を55°5分間加熱処理を施し急冷後、4%カゼイン1ccを加えて35°で10分間反応させた後 0.8M TCA 液 2ccを加えて反応を停止し、生じた沈澱を除去した濾液につき常法通り銅 Folin 法 (波長 660m μ) で測定し、同一組成で加熱処理を行わないものが同一操作で示す吸光度と比較してみた。その結果は第5表の如くである。

これによると、加熱処理を施した酵素は EDTA により速に活性を失うことを示している。このことは熱処理により尚完全に破壊されない酵素蛋白も多少変性を起しているか、又はその後の処理により変性を起しやすくな

第5表 酵素の熱処理時に於ける EDTA の影響

EDTA 最終濃度	透析時間 (時間)	加熱前	55°C 5分 加熱処理
標準	24	0.436	0.200
	48	0.335	0.138
10 ⁻² M	24	0.176	0.012
	48	0.115	0
10 ⁻³ M	24	0.386	0.013
	48	0.302	0
10 ⁻⁴ M	24	0.425	0.015
	48	0.333	0.005

pH 7.52, 銅 FOLIN 法

つているかにより酵素分子の中に介在するか、或いは正規の酵素分子と結合して安定化に役立っていると考えられる因子（金属イオン？）が EDTA により容易に捕獲されて失活は促進される為と推察される。

総 括

本酵素は Ca⁺⁺ により熱失活保護作用並びに活性促進作用を受けたが、逆に Cu⁺⁺, Fe⁺⁺, Zn⁺⁺, Cd⁺⁺ 及び As⁺⁺ 等の2価金属イオンによつて阻害作用を認めた。又 Ca⁺⁺ は熱失活酵素の活性回復には役立たなかつた。

前報に於て CN⁻ イオンは透析によつて一部失活した本酵素の活性回復をひき起す効果を確め得たが、本実験に於て熱失活保護作用は認め得なかつた。

EDTA は本酵素の失活を引き起すが、然し、完全に失活を齎らさなく、一部残存していた。然し、加熱処理時に於て EDTA は失活を特に著しくする。

（食飼、応用微生物学講座、昭34. 8. 29受理）

引 用 文 献

- 1) 三宅 捷他：兵庫農大研報，**3**（農化編），147（1958）.
- 2) R. T. O' BRIEN, L. L. CAMPBELL: *Arch. Bioch. Biophys.*, **70**, 432 (1957).
土井 新次他：農化，**33**, 613 (1959).
福本寿一郎他：農化，**33**, 9 (1959).
- 3) 三宅 捷他：兵庫農大研報，**3**（農化編），143 (1958).
- 4) 赤堀四郎他：酵素研究法，**1**, 166 (1956).
- 5) 江上不二夫他：標準生化学実験，660（文光堂）（1953）.
- 6) 吉村 寿人：pH の理論と測定法，214 (1950).
- 7) GORINI, L : *Biochim et Biophys. Acta.* **6**, 237 (1950) (cf) *C. A.*, **45**, 6244 (1950).
- 8) 三宅 捷他：兵庫農大研報，**4**（農化編），27 (1959).

Summary

The properties of alkaline proteinase secreted by a strain of *Aspergillus ochraceus* were studied, and following results were obtained;

1) The heat-stability of this enzyme was remarkably protected by calcium ion at its optimum pH. On the contrary, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Fe⁺⁺, Cd⁺⁺ and As⁺⁺ ions promoted the destruction of this enzyme.

2) Heat-treated proteinase was more easily lost its enzymatic activity than intact one by addition of EDTA.

Accordingly, it seems that the factor—which seems to be usefull to the enzymatic stability—was easily captured by EDTA, and that, as a result, the inactivation of this enzyme was remarkably accelerated.

(Laboratory of Food Chemistry and Applied Microbiology)