

# 麴菌のペプチダーゼについて

## 特に数菌種間の比較

佐藤正一・大内 毅・赤塚尹巳・平松 昭

### On the Peptidases of *Aspergillus*.

With Special Reference to the Comparison Among Several Species.

MASAKAZU SATO, TAKESHI OUCHI, TADAMI AKATSUKA and AKIRA HIRAMATSU

## I 緒 言

麴菌の蛋白質分解酵素特に proteinase に関する研究は現在までその報告は極めて数多い。しかしながら peptidase system に関する研究は極めて少いようである。

1934年 Johnson<sup>(1)</sup> は *Aspergillus parasiticus* を供試菌として用い、proteinase の外に所謂 aminopoly-peptidase (基質 DL-leucyl-glycyl-glycine), carboxypolypeptidase (基質 chloroacetyl-L-tyrosine), dipeptidase (基質 DL-leucyl-glycine) の4つの component について指摘し、その後 Berger, Johnson<sup>(2-3)</sup> 等は一般的糸状菌の蛋白質分解酵素即ち前記の4つの component の他に glycylglycine 水解酵素及び triglycine 水解酵素を附加して報告している。

最近に至り Crewther<sup>(4)</sup> は glycyl glycine dipeptidase について検討して報告した。我が国では井口<sup>(5)</sup> 等が *Aspergillus sojae* とその人工変異種を用いて数種のペプチッドに対する活性について比較検討した報告があるに過ぎない。

著者等はペプチダーゼに関する比較生化学的研究<sup>(6)</sup>の一環として *Aspergillus* 数株を選びこれらのペプチダーゼの特異性を検討すべく8種の合成基質(即ち L-leucine amino-peptidase の特異基質として L-leucinamide, DL-leucyl-glycine, DL-leucyl-diglycine 又 glycyl glycine dipeptidase の基質として glycyl-glycine, glycyl-L-leucine dipeptidase の基質として, glycyl-L-leucine, L-alanyl-glycine 水解酵素の基質として DL-alanyl-glycine, carboxypeptidase 或は acylase 系水解酵素の基質として chloroacetyl-L-leucine, そして triglycine 水解酵素或は所謂 aminopolypeptidase 様酵素の基質として triglycine) に対する水解の難易について比較実験した。以下これらの結果について述べる。

本実験に当り供試菌株を分譲戴きました東大応用微生物研究所、飯塚広主任に対し厚く感謝致します。

又菌の培養について種々御便宜を与えられました第一

醸造株式会社工場長、土屋 弘 氏並びに木谷正敏氏に対し又合成基質用精製アミノ酸を戴きました味の素株式会社土屋義夫氏に対し厚く御礼申し上げます。

尙実験に協力された井上昌男君に謝意を表します。

## II 実 験 法

(A) 供試菌株 供試菌株として下記のものを使用した。

<i>Aspergillus oryzae</i>	RO-0129A-2,
<i>Aspergillus oryzae</i>	KB,
<i>Aspergillus Sojae</i>	SH 10-1,
<i>Aspergillus tamarii</i>	23-5,
<i>Aspergillus flavus</i>	M,
<i>Aspergillus melleus</i>	IFO 4339,
<i>Aspergillus oryzae</i>	No. 1

(B) 菌の培養 5% glucose を含む 3% skim milk 溶液をつくり NaOH 溶液 (10%) で pH 7.0 に調整し 500cc. の三角フラスコに 80cc. 宛分注し、蒸気殺菌を3回繰返し行つた後常法により菌を接種して 30° の恒温器内で7日間静置培養した。

(C) 酵素液の調製 菌体を取り出し菌蓋の裏面を蒸溜水で洗滌した後大型濾紙の間にはさみ、附着した水分を除き菌体重量の  $\frac{1}{10}$  g の海砂を加え、菌体乾物量の10倍量になるように水を加えて乳鉢中で充分磨砕するか、或は菌体を細碎し、homogeniser にかけて後 pH 7.0 に調整し三角フラスコに移し 30° の恒温器内に2時間保つて酵素を抽出した。(実験結果の(1)参照)

次で15分間遠心分離 (3000. r. p. m.) にかけて微黄色の上澄液を濾過し酵素液とした。

(D) 基質の合成 DL-alanyl-glycine (Ala-Gly), DL-leucyl-glycine (Leu-Gly), DL-leucyl-diglycine (Leu-Gly-Gly), chloroacetyl-L-leucine (Cl-Act-Leu) は E. Fischer 法<sup>(7)</sup>により L-leucinamide (Leu-NH<sub>2</sub>) は E. L. Smith 法<sup>(8)</sup>により, glycyl-glycine (Gly-Gly), glycyl-L-leucine (Gly-Leu) 及び triglycine (Gly-Gly-Gly) は phthalyl 法<sup>(9)</sup>により合成した。

今これらの基質の合成過程の要点のみを摘記すれば次の如くである。

(i) DL-alanyl-glycine の合成

市販 propionic acid  $\xrightarrow{\text{減圧蒸溜}}$  精製 propionic acid (収量 70~80% 以下カッコ内は理論値に対する収量%を示す)

精製 propionic acid  $\xrightarrow{\text{Br}_2, \text{P}}$   $\alpha$ -bromopropionic acid (70%)  $\xrightarrow{\text{PCl}_3}$   $\alpha$ -bromopropionyl-chloride (65%)  $\xrightarrow{\text{glycine, NaOH}}$   $\alpha$ -bromopropionyl-glycine (71%)  $\xrightarrow{\text{NH}_3}$  DL-alanyl-glycine (50%)

(ii) DL-leucyl-glycine, DL-leucyl-diglycine の合成

市販 isobutylalcohol  $\xrightarrow{\text{減圧蒸溜}}$  精製 isobutylalcohol (70~80%)  $\xrightarrow{\text{Br}_2, \text{P}}$  isobutylbromide (64%)  $\xrightarrow{\text{Na, malonic acid diethylester}}$  isobutylmalonic acid diethylester (74%)  $\xrightarrow{\text{alcoholic KOH}}$  isobutylmalonic acid (74%)  $\xrightarrow{\text{脱 CO}_2}$  isocaproic acid (89%)  $\xrightarrow{\text{Br}_2, \text{P}}$   $\alpha$ -bromoisocaproic acid (90%)  $\xrightarrow{\text{PCl}_3}$   $\alpha$ -bromoisocaproyl chloride (90%)  $\xrightarrow{\text{glycine, NaOH}}$   $\alpha$ -bromoisocaproyl-glycine (85%)  $\xrightarrow{\text{NH}_3}$  DL-leucyl-glycine (50%)

$\alpha$ -bromoisocaproyl chloride  $\xrightarrow{\text{diglycine, NaOH}}$   $\alpha$ -bromoisocaproyl-diglycine (53%)  $\xrightarrow{\text{NH}_3}$  DL-leucyl diglycine (67%)

(iii) chloroacetyl-L-leucine の合成

monochloroacetic acid  $\xrightarrow{\text{Pcl}_3}$  chloroacetylchloride (65%)  $\xrightarrow{\text{D-leucine, NaOH}}$  chloroacetyl-L-leucine (70%)

(iv) L-leucinamide hydrochloride の合成

L-leucine  $\xrightarrow{\text{alcohol, HCl}}$  L-leucine ethylester hydrochloride (74%)  $\xrightarrow{\text{alcohol, NH}_3}$  L-leucinamide hydrochloride. (48%)

(v) glycylglycine, glycyl-L-leucine, triglycine の合成

glycine  $\xrightarrow{\text{phthalic anhydride}}$  phthalylglycine (93%)  $\xrightarrow{\text{SOCl}_2}$  phthalylglycylchloride (88%)  $\xrightarrow{\text{glycine, or L-leucine, NaHCO}_3}$  phthalylglycyl-gly-

cine or phthalylglycyl-L-leucine (76~83%)

$\xrightarrow{\text{alcoholic hydrazine}}$  glycylglycine or glycyl-L-leucine (85~90%)

phthalylglycyl chloride  $\xrightarrow{\text{diglycine, NaHCO}_3}$  phthalylglycyl-diglycine (60%)  $\xrightarrow{\text{alcoholic hydrazine}}$  glycyl-diglycine (80%)

(E) 分解基質溶液の調整法

glycyl-glycine, glycyl-L-leucine, L-leucinamide, chloroacetyl-L-leucine の場合は 0.1 モル溶液としその他の racemic peptides の場合には 0.2 モル溶液とし ammonia ammonium chloride buffer で pH 8.0 に調整した溶液を基本溶液として用いた。即ち

- (1) 0.1 M peptide + 0.09 M NH<sub>3</sub> + 0.25 M NH<sub>4</sub>Cl in 1000cc.
- (2) 0.2 M peptide + 0.15 M NH<sub>3</sub> + 0.25 M NH<sub>4</sub>Cl in 1000cc.

(F) 酵素による分解力測定法

消化操作及び滴定法は K. Linderström-Lang 及び佐藤の考案した semimicro 法<sup>(10)</sup> によつた。即ち消化混液の全容は 5cc. で消化前後にその 2cc. 宛をとつて N/20 KOH 酒精液で thymolphthaleine を指示薬として滴定し、消化前後の滴定差を以つて酵素力を表した。又酵素濃度は C<sub>E</sub> で表わし、消化混液 2cc. 中に含まれる酵素蛋白の mg-N で表した。

### III 実験結果

(1) 酵素の抽出時間による各種ペプチド水解力

酵素の抽出については Johnson<sup>(2)</sup> の報告によれば室温で6時間 pH 7.0 で放置後、遠心分離した上澄液を酵素液として用いているが、私共は当教室で分離した第1表 酵素の抽出時間と数種ペプチドの水解力

基質	抽出時間	水解力			消化時間
		2 hr.	4 hr.	6 hr.	
Leu-NH <sub>2</sub>		0.10	0.28	0.08	0.5hr.
Leu-Gly		0.84	0.70	0.54	0.5 "
Ala-Gly		1.00	0.64	0.34	0.5 "
Gly-Gly		0.30	0.12	0.14	1 "
Gly-Leu		1.30	0.78	0.14	1 "
Cl-Act-Leu		0.30	0.30	0.26	1 "

消化条件 : pH 8.0, 40°C, C<sub>E</sub>=0.4cc.

*Aspergillus oryzae* No. 1 を用いて酵素の抽出を pH 7.0 に調整し toluene を上層して 30°C, 2, 4, 6 時間保つた後前述の方法で酵素液を得て、次の如き数種のペプチッド水解力について検討した結果第 1 表の通りである。

以上の結果によれば Leu-NH<sub>2</sub> の水解力が 4 時間抽出の場合に極大を示した以外はすべて時間の経過と共に酵素の活性が徐々に減少する傾向を示している。従つて本報告における今後の結果は抽出条件を pH 7.0 で 30°C

2 時間で実験を行つた。即ち前述の酵素液の調製法の通りである。

(2) *Aspergillus* 数種の各種ペプチッド水解力

蛋白質分解酵素 (proteinase) の比較的強力な菌株数種を選び、前述の方法により酵素を抽出し 8 種の合成基質に対する水解の難易を調べた結果第 2 表の通りである。

第 2 表 *Aspergillus* による各種ペプチッドの水解力

番号	菌株	基質	水 解 力							C <sub>E</sub> , mg-N	
			Leu-NH <sub>2</sub>	Leu-Gly	Leu-Gly-Gly	Ala-Gly	Gly-Gly	Gly-Leu	Gly-Gly-Gly		Cl-Act-Leu
No. 1	<i>A. oryzae</i> RO-0129A-2		0.14	1.80	0.70	0.51	0.73	1.55	—	0.57	1.06
2	<i>A. oryzae</i> KB		0.27	1.87	1.52	1.66	0.70	1.46	—	0.43	0.81
3	<i>A. flavus</i> M		0.10	1.71	0.75	1.71	0.25	0.70	0.34	0.69	1.32
4	<i>A. sojae</i> SH10-1		0.18	0.51	0.83	0.50	0.19	0.45	0.20	0.29	0.84
5	<i>A. tamaris</i> 23-5		0.04	1.10	0.80	0.63	0.07	0.26	0.48	0.55	0.76
6	<i>A. melleus</i> IFO4339		0.26	0.16	0.40	0.22	0.07	0.32	0.12	0.82	1.12

消化条件： pH 8.0, 40°C,

消化時間は Leu-NH<sub>2</sub>, Leu-Gly, Leu-Gly-Gly, Ala-Gly の場合は30分で行い、他の場合は60分で行つた。

第 2 表の結果から次のことが解つた：—

(1) 8 種の合成基質に対する水解力は *Aspergillus* の各菌株によりその差が著しかった。今菌株による水解力の最小値と最大値とを摘記表示すれば次の如くである。

第 3 表

基 質	最 小 値		最 大 値		消化時間
	菌株 No.	水解力	菌株 No.	水解力	
Leu-NH <sub>2</sub>	5	0.04	2	0.27	0.5hr.
Leu-Gly	6	0.16	2	1.87	0.5 "
Leu-Gly-Gly	6	0.40	2	1.52	0.5 "
Ala-Gly	6	0.22	3	1.71	0.5 "
Gly-Gly	5,6	0.07	1	0.70 ~0.73	1 "
Gly-Leu	5	0.26	1	1.55	1 "
Gly-Gly-Gly	6	0.12	5	0.48	1 "
Cl-Act-Leu	4	0.29	6	0.82	1 "

(2) 従前提唱された L-leucine aminopeptidase の基質である Leu-NH<sub>2</sub>, Leu-Gly 及び Leu-Gly-Gly に対

する水解力に関しては麴菌の場合には各菌株により、個々の基質に対し著しく大小の差があるのみならず三基質に対する水解力の比にも著しい差が認められた。従つて L-leucine aminopeptidase の作用的単一性 “Wirkung-Einheitlichkeit” に関しては少くとも麴菌の場合には更に検討すべきであろう。

文 献

- 1) Johnson, M. J. (1934). Z. physiol. chem : 224, 163
- 2) Berger, J., Johnson, M. J. and W. H. Peterson (1936). J. Biol. chem: 117, 429
- 3) Johnson, M. J. and W. H. Peterson (1936). Ibid.; 112, 25
- 4) Crewther, W. G. and F. G. Lennox (1954). Aust. J. Biol. Sci.; 6, 410, 428
- 5) 井口, 山本 (1955). 農化; 29, 394
- 6) 佐藤, 赤塚, 昭和31年3月農化大会講演
- 7) Fischer, E. (1919). Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide and Proteine; I, II,
- 8) Smith, E. L. (1948). J. Biol. Chem : 176, 835
- 9) Grassmann, W. and E. S. Webbing (1950).

Chem. Ber.; **83**, 244

- 10) M. Sato. (1931). Compt. rend. Lab. Carlsberg;  
**19**, No. 1

### Summary

1) We synthesized eight peptides and studied on the peptidases of *Aspergillus* with special reference to the comparison among six species and the results obtained were shown on the table 1 and 2.

2) The hydrolytic powers of these peptides were greatly different according to the several species of *Aspergillus* used.

The minimum and maximum values of hydrolysis of these peptides caused by these species were abstracted and shown on the table 3.

3) With regard to the hydrolysis of substrates of the so-called L-leucine aminopeptidase, leucinamide, leucyl-glycine and leucyl-diglycine, the hydrolytic powers were not only individually different according to the species of *Aspergillus* but the ratios of the hydrolyzing powers of these three peptides were also markedly varied according to the species mentioned. For this reason, further investigation should be required on the "Wirkung Einheitlichkeit" of the L-leucine aminopeptidase, at least in the case of *Aspergillus*.