

琉球大学学術リポジトリ

クロレラ菌体抽出液中のパパインインヒビターとその性質(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 当山, 清善, 石原, 昌信, 松元, 靖, 与那覇, 和雄, Toyama, Seizen, Ishihara, Masanobu, Matsumoto, Yasushi, Yonaha, Kazuo メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3924

クロレラ菌体抽出液中のパパイン インヒビターとその性質

当山清善 *・石原昌信 *・松元 靖 **・与那覇和雄 *

Seizen TOYAMA, Masanobu ISHIHARA, Yasushi MATSUMOTO and
Kazuo YONAHARA : Presence and partial characterization of papain
inhibitor in the extracts of *Chlorella* cells

Summary

The presence and partial characterization of a papain inhibitor of the extracts of *Chlorella* cells has been investigated. The inhibitory activity was detected in the boiled extracts of freshly harvested *Chlorella* cells and spray-dried powder *Chlorella* cells which were cultured in the acetic acid-containing medium by using large-scale pond culture plant. The inhibitor was non-dialyzable and seemed to be protein-like substance. The inhibitor was found to be heat-stable (98°C, 20 min) at pHs ranging from pH 2 to 9. The inhibitor also inhibited chymopapain and ficin, but it did not have inhibitory activity against trypsin and α -chymotrypsin.

結 言

クロレラは光合成能を有する単細胞緑藻の一種で、太陽エネルギーの利用効率及び単位面積当りの藻体生産量が高く、蛋白含量も多いことから微生物蛋白の生産手段としての大量培養法が検討されてきた^{2,20)}。クロレラは有機炭素源でも増殖が可能であり、酢酸を炭素源としたクロレラの開放培養法が開発されて以来、大量培養法が確立され^{3,4,6,8,9,16)}、現在、酢酸含有培地を用いた日照射下での屋外開放培養法によりクロレラ藻体の生産が行われている。しかし、工業的に生産されるクロレラ藻体の生産費が高く、安価な蛋白給源としての生産目的の達成には至っていない。

クロレラ藻体成分に微生物あるいは動物に対して生長促進効果等の生理活性物質の存在が認められて以来、クロレラ藻体から生理活性作用を有する成分の検索と単離が行われつつある^{11,17,18,21)}。筆者らは、クロレラ菌体(藻体)成分による酵素反応阻害活性を調べた結果、クロレラ菌体の抽出液がパパインの反応を阻害することを認めた。

本報では、クロレラ菌体からパパイン阻害画分(インヒビター)の抽出法と本インヒビターの性質について調べた結果を報告する。

*琉球大学農学部農芸化学科

**沖縄県経済農業協同組合連合会

実験方法

(1) **クロレラ菌体**：供試生クロレラ菌体（藻体）は、酢酸-尿素含有培地を用い直径40mの培養池で屋外開放攪拌方式により培養されたクロレラで、遠心分離により収穫し洗浄した菌体である。乾燥粉末クロレラ菌体は、洗浄生クロレラ菌体をスプレイドライヤーにより噴霧乾燥（90°C）された粉末クロレラである。

(2) **インヒビターの調製**：クロレラ菌体からのインヒビター液の抽出は、洗浄生菌体（水分60%）及び乾燥粉末クロレラ（水分10%）に4倍量の0.01Mリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）を加えて加温処理（37°C）、超音波処理及び煮沸処理を行なったのち、遠心分離により菌体残渣を分別して調製した。クロレラ菌体抽出液を上記緩衝液に対して一夜透析を行ない、不溶性物質を遠心分離により除去したのち得られる上澄液をインヒビター溶液として用いた。

(3) **パパイン活性の測定**：パパイン活性の測定に用いた基質のスルファニール酸-アゾアルブミンは Tomarellis らの方法²²⁾に準じて調製した。パパイン活性の測定は、アゾアルブミンを基質とした反応で生成するアゾ色素に由来する440nmの吸光度を測定するアゾアルブミン法^{5,22)}により次の如く行なった。酵素反応混液の組成は、1.25%アルブミン液 0.5 ml, 0.5Mトリスマレイト緩衝液（pH8.5）0.2 ml, 0.1Mシステイン塩酸塩溶液 0.1 ml, 0.05Mエチレンジアミン四酢酸液（EDTA）0.1 ml 及びパパイン（Sigma type IV）で、総量 1.0 ml とした。酵素反応は37°C, 20分間行ない、0.4M三塩化酢酸 2.0 ml を加えて反応を止め、37°Cで20分間加温したのち遠心分離により沈澱と上澄液を分別した。上澄液の440 nm における吸光度を測定し、コントロールとの差をもってパパイン活性とした。トリプシ（Sigma type III）及び α -キモトリプシン（Sigma type II）の酵素反応は、反応混液からシステイン及びEDTAを除いて行なった。反応混液中の酵素量は、反応後の上澄液の吸光度が0.3~0.4の範囲になるように調整した。

(4) **パパインインヒビター活性の測定**：インヒビター溶液によるパパイン活性の阻害反応は、パパイン溶液にインヒビター溶液を加え37°Cで10分間保ったのちパパイン活性の測定に従って行なった。阻害反応後の吸光度（B）を求め、インヒビターを含まない反応系の吸光度（A）に対する阻害度（I）を次式により求めた。 $I = (A - B) / A \times 0.5$ インヒビター活性の1単位は、パパイン活性を50%阻害するインヒビター量（ml, あるいは蛋白量 mg）とし、比活性は蛋白 mg 当りの単位で示した。蛋白質の定量は Lowry ら¹²⁾の方法に準じて行なった。

実験結果

1. パパイン活性に及ぼす生クロレラ菌体抽出液の影響

酢酸-尿素含有培地で培養された生クロレラ菌体抽出液のパパイン阻害活性を調べるため、収穫直後の洗浄菌体（水分、60%）に4倍量の0.01Mリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）を加えて加温処理（30°C, 60分間）及び煮沸処理（98°C, 10分間）して菌体抽出液を調製した。加温処理及び煮沸処理抽出液のパパイン活性に対する影響を調べたのが Fig. 1 である。

生クロレラ菌体を加温処理して得られる抽出液にはパパイン阻害活性はみられないが、煮沸処理抽出液に阻害活性が認められ、抽出液量の増加に伴ないパパイン活性が減少し、クロレラ液体内にパパインインヒビターが存在することが明らかとなった。本インヒビター活性は生クロレラ菌体を海砂とともに磨砕して得られる抽出液にも存在し、抽出液を煮沸処理しても活性が認められた。クロレラ菌体抽出液を透析処理してもインヒビター活性の低下はみられず、抽出液の紫外部吸収スペクトルは280nm付近に吸収極大を有していることから、本インヒビターは高分子の蛋白様インヒビターであることが示唆された。

2. 乾燥粉末クロレラ菌体抽出のパパイン阻害活性

生クロレラ菌体の抽出液中にパパイン阻害活性が存在することが明らかになったので、次に噴霧乾燥粉末菌体抽出液の阻害活性を調べた。菌体の抽出液は乾燥粉末クロレラ菌体（2 g）に4倍量の0.01Mリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）を加えて加温処理（30°C, 60分間）、超音波処理（10°C, 10分間）及び煮沸処理（98°C, 10分間）して調製した。各抽出液を上記緩衝液に対して一夜透析したのちインヒビター溶液として用いた。Table 1は、各処理で得られた抽出液の総蛋白質量、インヒビター比活性及び全インヒビター活性を調べた結果である。乾燥粉末菌体中のインヒビター活性は加温処理及び超音波処理抽出液にも存在し、高いインヒビター活性は煮沸処理抽出液で得られた。乾燥粉末液体中のインヒビターは煮沸処理で完全に抽出された。

Fig. 2は、乾燥粉末菌体を煮沸処理して得られる抽出液のパパイン活性に及ぼす影響を調べた結果である。パパイン活性は、反応混液に加える抽出液の蛋白量の増加に伴って減少している。インヒビターとパパインとの反応時間を調べた結果、酵素反応途中で抽出液を加えることによりパパイン活性の低下がみられ、このことはインヒビターによるパパイン阻害反応が短時間に進行することを示している。

3. インヒビターの熱及びpH安定性

乾燥粉末クロレラ菌体を煮沸処理して得られる抽出液をインヒビター溶液として用い、pH 2, 7及び11で各温度に20分保ったのち急冷して標準酵素反応条件下で残存パパイン阻害活性を測定したのがFig. 3である。120°C処理は、インヒビター溶液をオートクレーブを用いて加圧蒸煮して行なった。インヒビターは、pH 7では比較的安定で、120°C処理でも70%の活性が残存した。インヒビターは、60°CまではpH 2及び11における処理でも安定であったが、80°C以上では失活がみられ、特に、pH11では急激に失活した。Fig. 4は、インヒビター溶液を各pHで5分間煮沸したのちの残存パパイン活性を測定した結果である。インヒビターはpH 2~10で煮沸処理しても安定であったが、pH 1及びpH11では失活がみられた。本インヒビターは、短時間処理では各温度及び各pHで安定であるが、強酸性及び強アルカリ性条件

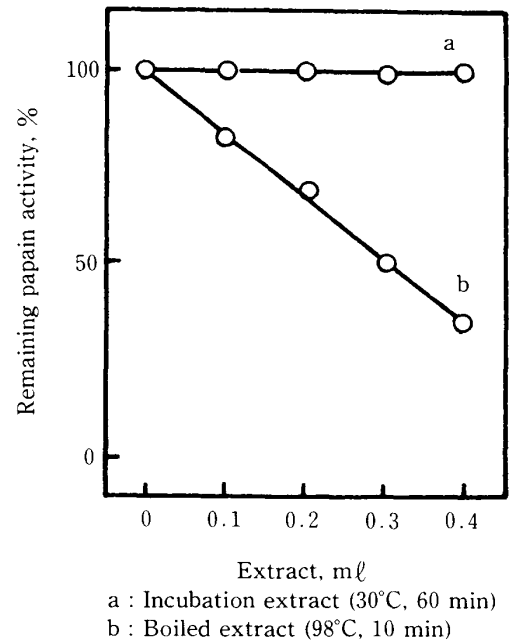


Fig-1 Inhibition of papain by the extracts of freshly harvested *Chlorella* cells

Freshly harvested *Chlorella* cells and spray-dried powder *Chlorella* cells (g/4ml) were suspended in 0.001M potassium phosphate buffer, pH 7.0. The suspension was incubated at 30°C for 60 min and boiled for 10 min in a water bath. The incubated extract and boiled extract were isolated by centrifugation, and then dialyzed against the same buffer. The dialyzed extracts were used as the inhibitor solution. The papain inhibitory activity of the extract was determined by the azoalbumin method as follows. The reaction system contained 0.5 ml of 1.25% azoalbumin, 0.1 ml of 0.1M cystein hydrochloride, 0.1 ml of 0.05M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.2 ml of Tris-maleic acid buffer (pH 8.5), inhibitor solution, and papain in final volume of 1.0 ml. The reaction was incubated at 37°C for 20 min and terminated by the addition of 2 ml of 0.4M trichloroacetic acid. The precipitated protein was removed by centrifugation, and the absorbance of the supernatant fraction was read at 440nm. The residual papain activity was determined by measuring the absorbance change. The rate of inhibition (I) is expressed as follows: $I = (A-B)/A \times 0.5$ where A = change in absorbance at 440nm for the uninhibited sample and B = change in absorbance at 440nm for the inhibited sample. One unit of the inhibitory activity is equivalent to 50% inhibition of the papain used.

下、高温で長時間処理することにより失活することが明らかとなった。

4. 各種プロテアーゼに対する阻害効果

クロレラ菌体から調製した抽出液中にパパインを阻害するインヒビターが存在することが明らかになったが、次に本インヒビターがトリプシン等のプロテアーゼも阻害するかどうかを調べた。乾燥粉末クロレラ菌体の煮沸処理抽出液をインヒビター溶液としてトリプシン、 α -キモトリプシン、キモパパイン及びフィシン (Sigma 2x cryst) に対する阻害効果を調べたのが Fig. 5 である。本インヒビターは、キモパパイン及びフィシンに対して阻害効果が認められ、インヒビター量に依存してプロテアーゼ活性が減少した。特に、本インヒビターは、フィシンに対してはパパインと同じく高い阻害を示した。しかし、トリプシン及び α -キモトリプシンに対する阻害効果は認められなかった。

Table 1 The papain inhibitory activities of the extracts prepared by different methods from dried powder *Chlorella* cells

Extracts	Total protein (mg)	Specific activity	Total inhibitory activity
Incubated extract	51.3	1.48	75.9
Sonicated extract	42.9	1.62	69.5
Boiled extract	58.2	1.90	110.6

The cell suspension (2g/8ml) was incubated at 30°C for 60 min, sonicated at 10°C for 10 min by using a 19 KC oscillator, and boiled at 98 °C for 10 min. The dialyzed extracts were used as the inhibitor solution. Protein was assayed according to the Lowry method. Specific inhibitory activity was expressed as units per mg of protein. Other conditions were as in Fig. 1.

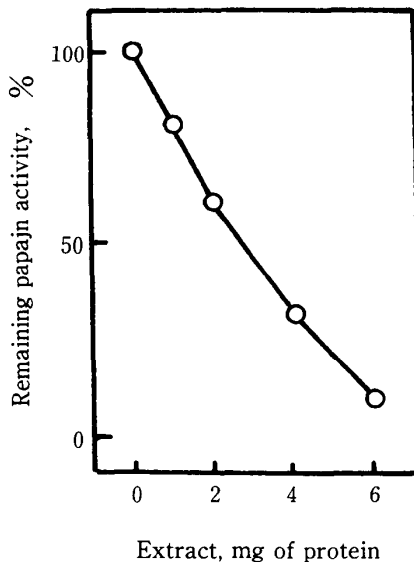


Fig. 2 Inhibition of papain by the boiled extract of dried powder *Chlorella* cells

The boiled extract was prepared from dried powder *Chlorella* cells as described in Table 1 and assayed for papain inhibitory activity as described in Fig. 1.

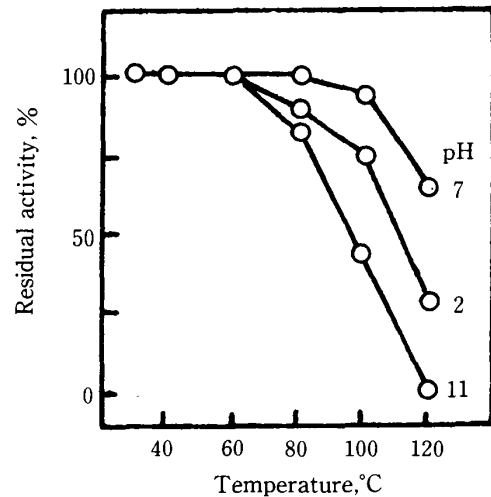


Fig. 3 Effect of temperature and pH on the stability of papain inhibitor

The boiled extract was prepared from dried powder *Chlorella* cells as described in Table 1. The boiled extract was incubated at the temperature on the abscissa for 20 min at pH 2, 7 and 11, then cooled and neutralized, and residual inhibitory activity was estimated as described in Fig. 1.

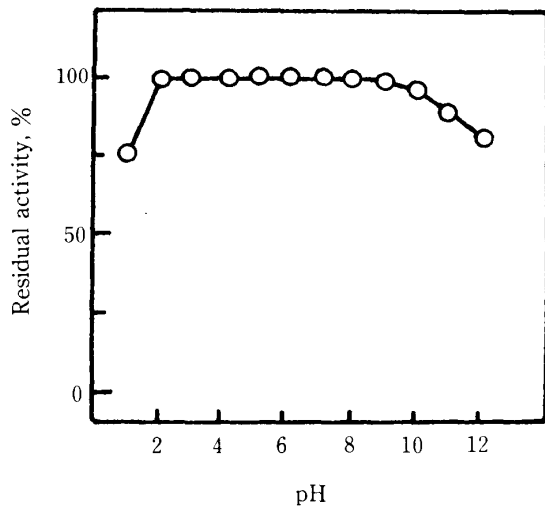


Fig. 4 Effect of pH on the stability of papain inhibitor

The boiled extract was prepared from dried powder *Chlorella* cells as described in Table 1. The extract was boiled at the pHs indicated on the abscissa for 5 min, then cooled and neutralized, and residual inhibitory activity was estimated as described in Fig. 1.

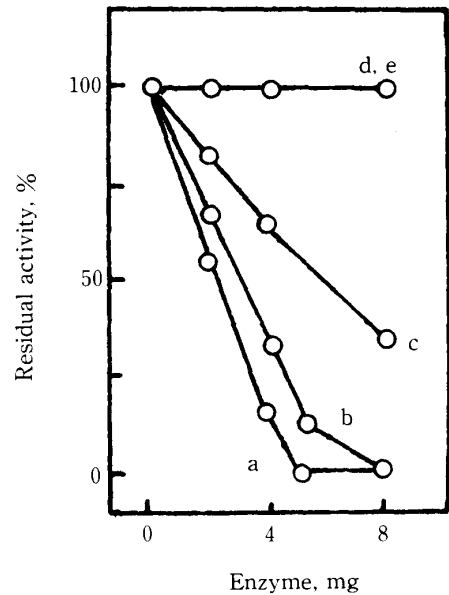


Fig. 5 Inhibitory activities against various proteases

The boiled extract prepared from dried powder *Chlorella* cells as described in Table 1 was used as the inhibitor solution. Protease and inhibitory activities were measured by the same procedure as described in Fig. 1 except that EDTA and cysteine hydrochloride were removed from the reaction system in the case of trypsin and α -chymotrypsin.

考 察

酵素反応を阻害する物質、インヒビターは動物、植物及び微生物に広く存在し、各種インヒビターが単離され、その性質が解明されつつある^{1,7)}。プロテアーゼインヒビターについては、1936年 Kunitz らによって膵臓塩基性トリプシンインヒビターが発見されて以来、動植物界から多くのインヒビターが単離されている¹⁰⁾。一方、微生物にもプロテアーゼインヒビターが存在し、各種の微生物からインヒビターが単離され、その構造と活性、微生物における生理的意義及び薬理作用等の解明が行われつつある^{1,14,15,19,24)}。しかし、クロレラ菌体におけるプロテアーゼインヒビターについての報告はみられない。

クロレラ菌体成分による酵素反応阻害活性の検索過程で、クロレラ菌体抽出液中にパピインインヒビターの存在が確認された。本インヒビターは、酢酸を炭素源とした培地を用い屋外で培養した収穫直後の生クロレラ菌体と生クロレラ菌体を噴霧乾燥した粉末菌体に存在することが確かめられた。本インヒビターは、生クロレラ菌体を煮沸処理することによって抽出されたが、乾燥菌体からは加温処理 (30°C) でも抽出された。生クロレラ菌体を乾燥処理 (90°C) することによりインヒビター画分が抽出されやすくなり、乾燥粉末菌体の加温処理抽出液にインヒビター活性が存在するものと考えられる。しかし、乾

乾燥粉末菌体中のインヒビター画分を完全に抽出するためには、菌体の煮沸処理が必要であった。

微生物起源のプロテアーゼインヒビターには、低分子のペプチド性インヒビターと高分子の蛋白性インヒビターが知られている^{1,10,19,24})。クロレラ菌体抽出液中のインヒビター画分は非透析性で、紫外部スペクトルで280nm付近に吸収極大を有することから蛋白性インヒビターであることが示唆される。本インヒビターはpH 2～9の範囲で煮沸処理しても安定で、pH 7で120°C、20分間処理したのちでも約70%の活性が残存し、耐熱性インヒビターであることが明らかになった。しかし、本インヒビターは強酸性(pH 1以下)及び強アルカリ性(pH11以上)条件下で煮沸処理することにより失活した。一般に、カビ及び酵母等の真核微生物が生産するプロテアーゼインヒビターは耐熱性を有する蛋白質であることが知られている^{14,15})。

パパインを阻害する蛋白性インヒビターが *Aspergillus* 等のカビから単離され、その阻害スペクトル等の性質が明らかになりつつある^{13,15})。クロレラ菌体の煮沸処理抽出液中のインヒビターはパパインとともにキモパパイン及びフィシンに対しても阻害効果を示したが、トリプシン及び α -キモトリプシンに対する阻害効果は全く認められなかった。現在、本インヒビターの蛋白化学的性質及び阻害作用特性等を明らかにするため、クロレラ菌体からインヒビターの単離・精製が進められている。また、クロレラの培養条件と菌体内及び菌体外パパインインヒビターの生産との関係が明らかになりつつある²³)。

要 約

酢酸含有培地を用い屋外培養池で培養された収穫直後の生クロレラ菌体及び噴霧乾燥粉末クロレラ菌体の抽出液中にパパインインヒビター活性が認められた。本インヒビターはクロレラ菌体を煮沸処理することによって抽出された。本インヒビターはpH 2～9の範囲で98°C、20分間処理しても安定で、非透析性の蛋白様物質であった。本インヒビターはパパインとともにキモパパイン及びフィシンに対して阻害効果を示したが、トリプシン及び α -キモトリプシンに対する阻害効果は認められなかった。

実験に当たり、生クロレラ菌体及び乾燥粉末菌体を提供して下さった八重山殖産(株)及び沖縄クロレラ製造(株)〔現、沖縄サンクロレラ製造(株)〕に対し感謝致します。

引 用 文 献

1. 青柳高明 1979 “酵素阻害物質” 共立出版
2. Burler, J.S. 1953 “Algal culture”, Carnegie Institution of Washington Publication
3. Burrell, R.E., Inniss, W.E., Mayfield, C.I. 1984 Development of an optimal heterotrophic growth medium for *Chlorella vulgaris*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 20 : 281-283
4. Burrell, R.E., Mayfield, C.I., Inniss, W.E. 1984 Biomass production from green algae *Chlorella vulgaris* and *Ankistrodesmus braunii* cultured heterotrophically, Biotechnol. Lett., 6 : 507-510
5. Charney, J., Tomarelli, R.M. 1947 A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice, J. Biol. Chem., 171 : 501-505
6. Endo, K., Nakajima, K., Chino, R., Shiota, M. 1974 Growth characteristics and cellular components of *Chlorella reglaris*, heterotrophic fast growing strain, Agric. Biol. Chem., 38 : 9-18
7. Jain, M.K. 1982 “Handbook of enzyme inhibitor”, John Wiley & Sons
8. 比嘉義邦, 山下勇, 当山清善 1974 沖縄における環流攪拌法によるクロレラの大量培養, 日本農芸化学会関西支部・西日本支部合同大会, 要旨集 P. 53

9. 比嘉義邦 1978 クロレラ生産の現況と展望, 食品工業 21: No. 3, 34-45
10. Kassel, B. 1970 Naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes, *Methods Enzymol.*, 19: 839-906
11. 小島瑞, 猪野茂, 高瀬信夫, 穴戸教治, 小林精三郎, 土橋陸夫, 渡辺兼男 1972 クロレラより抽出される活性多糖体と網内系機能貧食能におよぼす効果について, 農化 46: 373-380
12. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275
13. Matsushima, K. 1979 A note on a novel fungal alkaline proteinase inhibitor form *Aspergillus oryzae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90: 1142-1146
14. 村尾澤夫 1981 微生物の生産する酵素および生理活性物質に関する研究, 農化 55: 503-513
15. North, M.J. 1982 Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms, *Microbiol. Rev.*, 46: 308-340
16. 尾崎浅一郎 1974 酢酸を原料とするSCPの生産, 醸協誌, 32: 287-295
17. 村上哲男, 山田友紀子, 飯塚義富, 三宅英夫, 岡本耕道 1982 クロレラ抽出物の降圧成分について, 昭和57年度日本農芸化学大会要旨集 P.523
18. 篠園彦 1980 クロレラの細胞壁とその多糖体, *New Food Industry* 22: No. 7, 18-32
19. 杉野弘, 垣沼淳司 1978 微生物の生産するタンパク性プロテアーゼインヒビター, 生化学 50: 569-576
20. 武智芳郎 1971 “クロレラ—その基礎と応用” 学習研究社
21. 田島修, 富金原孝 1979 クロレラ抽出液よりヌクレオシドの分離について, 農化 53: 131-133
22. Tomarell, R.M., Charney, J. 1949 The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity, *J. Lab. Clin. Med.*, 34: 428-433
23. 当山清善, 与那覇和雄, 石原昌信, 松元靖 1982 クロレラのプロテアーゼインヒビター, 昭和57年度日本農芸化学会西日本支部大会要旨集 P.24 農化 57: 112 (1983)
24. Wingender, W. 1974 Proteinase inhibitors of microbial origin, a review, *Bayer-Symposium 5 “Proteinase Inhibitors”* 548-559