

Corticium rolfssii の酸性 proteinase

三好敏夫, 上原 哲, 梶 明, 佐藤優行

ACID PROTEINASE FROM *CORTICIUM ROLFSII*

Toshio MIYOSHI, Satoshi UEHARA, Akira KAJI and Masayuki SATO

On the basis of screening *Corticium* species, acid proteinase was found to be produced by all 13 strains used. *Corticium rolfssii* IFO 4878 was selected for the enzymatic study and cultured in a medium containing defatted soybean powder. Acid proteinase was partially purified about 68-fold from the culture fluid by a combination of various column chromatography. The isoelectric point lied at pH 4.33 and the molecular weight was estimated to be 27,500. The enzymatic activity was found to be maximum at pH 2.5 toward milk casein and at 2.0 toward hemoglobin-HCl. The enzyme was stable between pH 1.0 and 5.0. At pH 1.0, the enzyme lost less than 10% of its activity during a 72-hr period at 4°C. The enzymatic activity was inhibited by pepstatin, 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy) propane, CN⁻ and Hg²⁺, but stimulated by Mn²⁺. The enzyme had an optimal pH for milk-clotting activity between 5.3 and 5.5. The partial purified acid proteinase was demonstrated by its ability to hydrolyze various native proteins.

Corticium 属のスクリーニングの結果、用いた13菌株のすべてが酸性プロテアーゼを生産した。この中から *Corticium rolfssii* IFO 4878 を選択し、脱脂大豆粉末を培養基として培養した。培養液より酵素を約68倍に部分精製した。酵素の等電点は pH 4.33、分子量は約27,500であった。酵素の作用至適 pH はミルクカイゼンが基質の場合は約2.5、ヘモグロビン-HCl の場合は約2.0であった。酵素は pH 1.0から5.0において安定であり、微生物起源の acid proteinase では最も耐酸性に属する。酵素活性はペプスタチン、1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)-propane, CN⁻, Hg²⁺ によって阻害されたが、Mn²⁺ によって賦活された。ミルク凝固活性の至適 pH は5.3から5.5にあり、天然蛋白質に対して広い基質特異性を示した。

緒 言

カビの acid proteinase (EC 3.4.23) については *Aspergillus* 属⁽¹⁻⁵⁾ のカビを中心に、多くのカビにその生産が報告されている。本実験に使用した *Corticium rolfssii* の属する担子菌類では *Trametes sanguinea*⁽⁶⁾ の報告がある。

我々の研究室では *Corticium rolfssii* の生産する耐酸性酵素群に関する一連の研究過程ですでに、酸性領域に作用至適 pH を持つ耐酸性 proteinase の存在を報告した^(7,8)。本論文においては、*C. rolfssii* proteinase の生産条件、精製ならびにその性質について報告する。

材料および実験方法

1. 使用菌および培養法

Corticium rolfssii はシュウ酸生産性の植物病原菌で、Table I に示すように、他の学名も使われている。菌株は大阪発酵研究所、農林省農業技術研究所、本学部植物病理学研究室から分譲されたものである。

菌は 1 l の脱イオン水中に脱脂大豆50g, KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, FeCl₃ 0.006g を含む培地 1 l を 3 l 容振とうフラスコに入れて培養した。スクリーニングおよび培地組成の検討に関する実験においては 1 l の脱イオン水中に炭素源20g, ペプトン10g, NH₄NO₃ 0.5g, KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, FeCl₃ 0.006g を

含む培地50m^lを500m^l容振とうフラスコに入れて培養を行なった。ただし、スクリーニング試験においては炭素源のかわりに脱脂大豆を用い、窒素源の影響を調べる実験においては炭素源にペクチンを、ペプトンとNH₄NO₃の代わりに各種の窒素源を用いた。菌の生育は27°Cで10日間往復振とう培養機上にて行なった。

2. 酵素の精製

培養液から遠心分離により菌体を除去した後、上清に硫酸を0.9飽和になるように添加して一夜4°Cにて攪拌放置した。生じた沈殿を遠心分離によって集めた。沈殿蛋白質を0.01M McIlvaine 緩衝液、pH 5.0、に溶解後、同じ緩衝液に対して4°Cにて透析した。透析液を0.01M McIlvaine 緩衝液、pH 5.0、であらかじめ緩衝化したDEAE-Sephadex A-50のカラムに吸着させ、同じ緩衝液中のNaCl濃度を0から0.2Mまでは段階的に、0.2Mから0.6Mまでは連続的に上げて溶出した後、続いて0.6MのNaCl濃度にて十分に溶出した。活性画分を合わせて、コロジオンバックにて濃縮後、0.1M NaClを含む0.1M McIlvaine 緩衝液、pH 2.8、に対して透析した。透析液を0.1M NaClを含む0.1M McIlvaine 緩衝液、pH 2.8、にてあらかじめ緩衝化したペプスタチン-アミノヘキシルアガロースゲルカラムに添加した後、同じ緩衝液にて溶出した。ペプスタチン-アミノヘキシルアガロースゲルカラムは村上ら⁽⁹⁾の方法に従って調製した。活性画分を合わせてコロジオンバックで濃縮後、0.01M McIlvaine 緩衝液、pH 5.0、に対して透析した。透析液を0.01M McIlvaine 緩衝液、pH 5.0、にてあらかじめ緩衝化したDEAE-セルロースカラムに吸着させた後、まず0.2M NaClを含む同上の緩衝液にて溶出し、続いてNaCl濃度を0.2Mから0.6Mまで連続的に上げて溶出した。活性画分はダイアフロメンブレンUM 2 (Amicon)を用いて濃縮後、0.01M リン酸緩衝液、pH 5.2、に対して透析した。

3. 酵素活性の測定

Acid proteinase 活性は次の様な方法で測定した⁽¹⁰⁾。0.05M 乳酸緩衝液、pH 2.5、に溶解した0.6%ミルクカゼイン溶液2.5m^lと酵素液0.5m^lから成る反応液を30°Cで10分間反応させた後、0.44M トリクロル酢酸2.5m^lを添加して反応を停止させた。混液を30°Cで20分間保持した後、濾紙で濾過し、得られた濾液中のチロシン量をFolin法にて測定した。酵素の1単位は上記の条件下で1分間に1μgのチロシンを遊離させる酵素量とした。

ミルク凝固活性は以下のような方法で測定した⁽¹¹⁾。0.01M CaCl₂を含む0.02M 乳酸溶液に溶解した10%スキムミルク溶液2.5m^lを30°Cで10分間保った後、酵素液0.5m^lを添加した。反応液中にカードの微粒が生成するまでに要する時間をストップウォッチで測定した。ミルク凝固活性の1単位は上記の条件下でSoxhletの定義⁽¹²⁾に従って、30°Cで40分間に基質1m^lを凝固させる酵素量とした。

蛋白質のペプチド結合加水分解度は以下の様な方法で測定した⁽¹³⁻¹⁵⁾。0.1M HClに溶解し、0.1M 酢酸ソーダーHCl 緩衝液にてpH 2.5に調整した1.2%の各蛋白質溶液2.5m^lと酵素液0.5m^lから成る反応液を30°Cで一定時間保持した後、0.44M トリクロル酢酸-1.0% (W/V) 珪タングステン酸溶液2.5m^lを添加して反応を停止させた。酵素作用によって遊離されたα-アミノ基はニンヒドリン法で比色定量した。各ペプチド結合加水分解度は各々の蛋白質のアルカリによる加水分解度に対する百分率で表わした。

4. 基質および阻害剤

ミルクカゼイン、大豆カゼイン、小麦グルテン、ゼラチン、硫酸プロタミン、ヘモグロビン、フィブロインは和光純薬(株)から、卵白アルブミン、牛血清アルブミンは島久薬品(株)から、ツェインは半井化学薬品(株)から、牛血清α-グロブリンはICN pharmacautials社から、コラーゲンおよびヒストンはSigma社から、スキムミルクは森永乳業(株)からそれぞれ購入した。ロイペプチンおよびペプスタチンは株式会社ペプチド研究所から、1,2-エポキシ-3-(*p*-ニトロフェノキシ)-プロパンはEastman社から、ポテトトリプシンインヒビターはSigma社から、モノヨード酢酸および6-アミノカプロン酸は半井化学薬品(株)からそれぞれ購入した。

5. 蛋白質測定法

牛血清アルブミンを標準蛋白質としてLowryら⁽¹⁶⁾の方法で測定した。

6. 分子量測定法

Andrews⁽¹⁷⁾の方法に従い、Sephadex G-75を使用するゲル濾過クロマトグラフィーにより酵素の分子量を測定した。

7. 焦点電気泳動法

Vesterbergら⁽¹⁸⁾の方法に従い、土井ら⁽¹⁹⁾の考案した30m^l容泳動管中、1%濃度のcarrier ampholyteを用いてpH 4から6の範囲で4°Cのもと最初は500Vで20時間、続いて800Vにてさらに47時間泳動した。泳動後1m^l

づつ分画し, それぞれのpH, OD₂₈₀ および酵素活性を測定した。

実験結果

1. 酵素の生産

(1) スクリーニング

Table I に示すように, 使用した *Corticium* 属のすべての菌株が acid proteinase を生産した。 *C. rolfssii* IFO 4878 が最もよく酵素を生産したのでこの菌株を以後の実験に使用した。

(2) 炭素源の影響

Table II に示すように, 脱脂大豆粉末で最も良好に酵素が生産された。ペクチンおよびフスマ抽出液も有効であった。

(3) 窒素源の影響

Table I. Production of Acid Proteinase by 13 strains of *Corticium rolfssii*

Strain	Acid proteinase activity (units/ml of culture fluid)
<i>Corticium rolfssii</i>	
IFO 4476 (<i>Hypochmus centrifugus</i>)	162
IFO 4878 (<i>Sclerotium rolfssii</i>)	198
IFO 5253 (<i>Corticium centrifugum</i>)	92
IFO 5926	154
IFO 6142 (<i>Corticium centrifugum</i>)	78
IFO 6146 (<i>Corticium centrifugum</i>)	186
K 2	164
C 10-2-1	176
C 10-2-2	100
C 10-2-3	146
C 10-2-4	190
C 10-2-5	126
<i>Corticium centrifugum</i> IAM 9028	98

Table II. Effect of Carbon Sources on Production of Acid Proteinase

Carbon source (5%)	Acid proteinase activity (units/ml of culture fluid)
Glucose	20
Pectin	63
Soluble starch	11
Wheat bran extract	55
Potato extract	24
Defatted soybean powder	198

脱脂大豆粉末, 大豆カゼイン, ミルクカゼイン, アルブミンは良好な窒素源であったが, NH₄Cl, NaNO₃ などの無機窒素源は酵素生産を阻害した (Table III)。

(4) 窒素源添加の影響

脱脂大豆粉末 5% を含む培地に各種の窒素源を添加して酵素生産に及ぼす影響を調べた結果, 脱脂大豆とミルクカゼインの添加によってのみ多少の酵素生産の増加がみられた。

(5) 培養経過

以上の培地組成の検討により, acid proteinase 生産用の培地として設定された脱脂大豆粉末を主要培養基とする標準培地にて菌を培養したところ, 酵素生産量および培地内蛋白質量とも培養12日目に最大に達した。この

Table III. Effect of Nitrogen Sources on Production of Acid Proteinase

Nitrogen source (1%)	Acid proteinase activity (units/ml of culture fluid)
None	55
Casamino acid	63
Albumin (Egg-white)	118
Yeast extract	90
Polypeptone	64
Milk casein	134
Soybean casein	135
Gluten	66
Gelatin	69
Wheat bran	55
Defatted soybean powder	166
Urea	8
NH ₄ NO ₃	6
NaNO ₃	6
NH ₄ Cl	2
CH ₃ COONH ₄	0

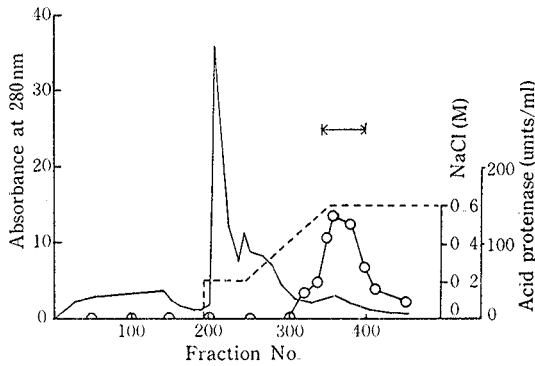


Fig. 1. DEAE-Sephadex Column Chromatography. The enzyme solution, 1310 ml, containing 13.7 g protein, was applied to a DEAE-Sephadex A-50 column (2.6×34.5cm), which had been equilibrated with 0.01 M McIlvaine buffer, pH 5.0. After eluting inactive proteins with the same buffer, and following with the same buffer containing 0.2 M NaCl, elution was carried out with a linear gradient of NaCl concentration from 0.2 M to 0.6 M in the same buffer. And then, elution was continued further with the same buffer containing 0.6 M NaCl. Elution was carried out at a flow rate of 40 ml/hr, and 10 ml fractions were collected. Fractions No. 344 to 400, indicated by arrows, were combined. —, absorbance at 280 nm; ○—○, acid proteinase activity; - - - - -, NaCl concentration.

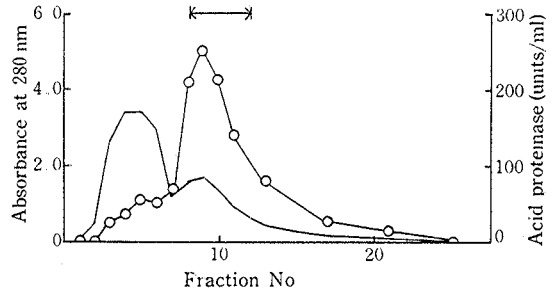


Fig. 2. Pepstatin-aminohexylagarose Gel Column Chromatography.

The column(1.8×6.2cm)had been equilibrated with 0.1 M McIlvaine buffer, pH 2.8, containing 0.1 M NaCl. After the application of the enzyme solution, 40 ml, containing 350 mg protein, elution was carried out with the same buffer at a flow rate of 30 ml/hr, and 10 ml fractions were collected. Fractions No. 8 to 12, indicated by arrows, were combined. —, absorbance at 280nm; ○—○, acid proteinase activity.

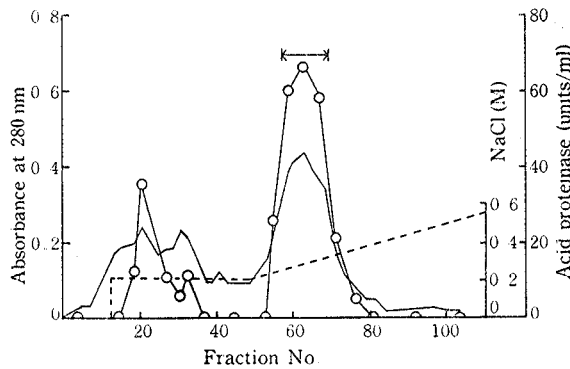


Fig. 3. DEAE-Cellulose Column Chromatography. The column (1.8×11.5cm) had been equilibrated with 0.01 M McIlvaine buffer, pH 5.0. After the application of the enzyme solution, 123 ml, containing 221 mg protein, the column was washed with the same buffer containing 0.2 M NaCl, and followed with a linear gradient of the NaCl concentration from 0.2 M to 0.6 M in the same buffer. Elution was carried out at a flow rate of 30 ml/hr, and 5 ml fractions were collected. Fractions No. 57 to 69, indicated by arrows, were combined. —, absorbance at 280 nm; ○—○, acid proteinase activity; - - - - -, NaCl concentration.

Table IV. Summary of Purification of Acid Proteinase

Step	Protein (mg)	Total activity ($\times 10^2$ units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)
1. Culture filtrate	208700	2429	1.2	1.0
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ppt (90%)	13700	1087	7.9	6.8
3. DEAE-Sephadex	703	454	64.6	55.7
4. Pepstatin-amino-hexylagarose Gel	221	177	80.0	69.0
5. DEAE-Cellulose	97	79	81.0	69.8

時の培養液の pH は約3.2であった。

2. 酵素の精製

DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーの結果は Fig. 1 に示されている。活性画分は NaCl 濃度が0.6M の時カラムより溶出された。活性画分を濃縮透析後、ペプスタチン-アミノヘキシルアガロースゲルカラムに添加した。活性は 0.1M NaCl を含む 0.1M McIlvaine 緩衝液, pH 2.8, で主要蛋白質ピークより遅れて溶出された (Fig. 2)。活性画分は合わせて濃縮、透析後、DEAE-セルロースカラムにてさらに分離精製された (Fig. 3)。NaCl 濃度0.3M で溶出される活性画分を濃縮後0.01M リン酸緩衝液, pH 5.2, に対して透析した。

全体の精製操作の結果は Table IV に要約されている。以上の操作により酵素は培養液から比活性で68倍に精製された。

3. 酵素の性質

(1) 分子量

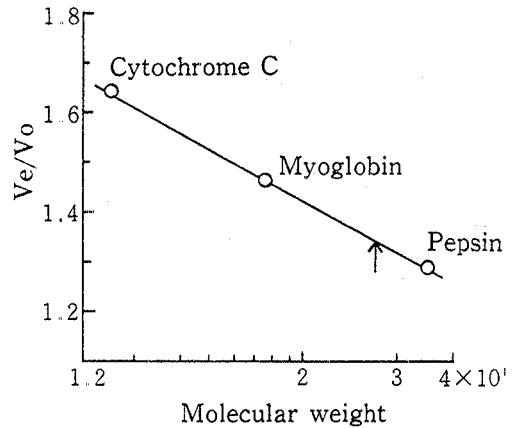


Fig. 4. Estimation of Molecular Weight of Acid Proteinase by Gel Filtration.

Chromatography was carried out on a Sephadex G-75 column (1.8 x 90.8cm) with 0.01 M McIlvaine buffer, pH 5.0, after the column had been equilibrated with the same buffer, and 2 ml/fractions were collected. Ve, the elution volume; Vo, the void volume.

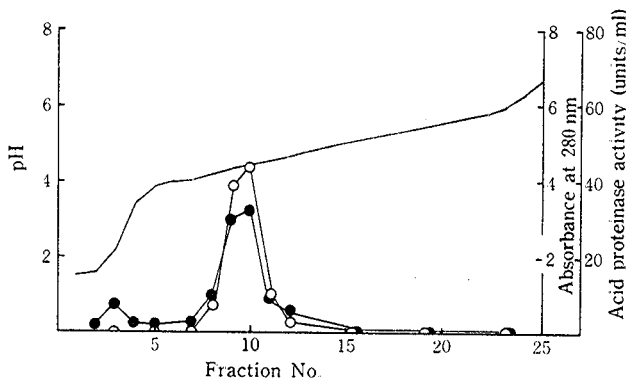


Fig. 5. Isoelectric Focusing.

The electrophoresis was performed with a carrier of pH 4-6 at 500 V for 20 hr and followed further at 800 V for 47 hr at 4°C. After the electric run, the ampholine solution was fractionated to 1 ml, followed by measurement of pH and the activity.

—, pH; ●—●, absorbance at 280 nm; ○—○, acid proteinase activity.

精製酵素の分子量は Sephadex G-75 を用いるゲル濾過クロマトグラフィーによって約 27,500 と推定された (Fig. 4).

(2) 等電点

焦点電気泳動法により精製酵素は等電点が pH 4.33 の酸性蛋白質であることが示された (Fig. 5).

(3) 酵素の活性と安定性に及ぼす pH の影響

Fig. 6 に示すようにミルクカゼインを基質とした場合には酵素活性の作用至適 pH は約 2.5 にあり、pH 1.0 でも最高値の 30% の酵素活性を示した。ヘモグロビン-HCl を基質とした場合には作用至適 pH は約 2.0 にあり、pH 1.0 においても最高値の 65% の酵素活性を示した。4°C にて 72 時間、酵素を各 pH のもとの保持した場合、酵素は pH 1.0 から 5.0 の間で安定であった (Fig. 7).

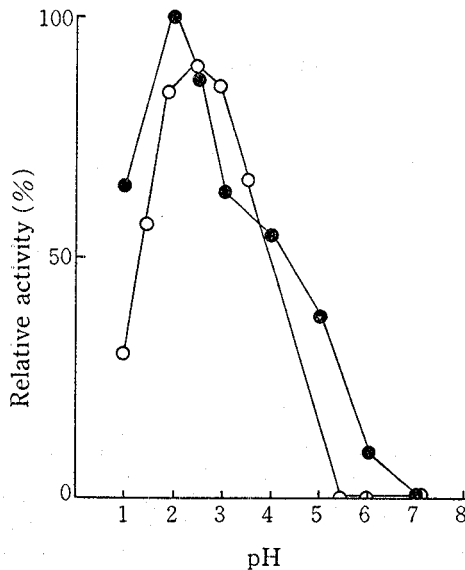


Fig. 6. Effect of pH on Activity of Acid Proteinase.

The enzyme activity was measured by the standard assay method in the following buffers: 0.2 M sodium acetate-HCl buffer (pH 0.65-4.0), 0.1 M McIlvaine buffer (pH 5.0-7.0).

○—○, enzyme activity for milk casein;
●—●, enzyme activity for Hemoglobin-HCl.

Table V. Effect of Salts on Acid Proteinase Activity

Salt	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	—	100
NaCl	100	100
ZnSO ₄	1	79
FeCl ₃	1	90
MnCl ₂	1	187
NiSO ₄	1	127
CdSO ₄	1	79
HgCl ₂	1	55
KCN	1	0

(4) 酵素の安定性に及ぼす熱の影響

酵素を pH 4.0 のもとの各温度に 10 分間保持したところ、酵素活性は 40°C にて急激に失活した。

(5) 酵素活性に及ぼす金属塩の影響

Table V に示す濃度で各金属塩を含む 0.05M 乳酸-NaOH 緩衝液、pH 2.5, 中で酵素を 20°C 20 分間前処理した後、一定量を基質溶液に添加して酵素活性を測定した。酵素活性は CN⁻によって完全に阻害され、Hg²⁺ Zn²⁺, Cd²⁺ によって部分的に阻害された。一方、Mn²⁺ は酵素活性を強く賦活し、Ni²⁺ も部分的に賦活効果を示した。

(6) 酵素活性に及ぼす proteinase inhibitor の影響

Table VI. Effect of Proteinase Inhibitors on Activity of Acid Proteinase

Proteinase inhibitor	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	—	100
MIAA	1	92
PCMB	0.1	100
EDTA	1	100
6-Amino-caproic acid	1	100
Anilin	1	47
SDS	5	0
	1	40
	0.5	80
	0.1	88
EPNP	0.01	0
Pepstatin	1 × 10 ⁻⁶ μg/ml	0
Leupeptin	500 μg/ml	82
PTI	200 μg/ml	100

MIAA, monoiodo acetic acid;
PCMB, *p*-chloromercuribenzoate;
EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid;
SDS, sodium lauryl sulfate;
EPNP, 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)-propane;
PTI, potato-trypsin inhibitor.

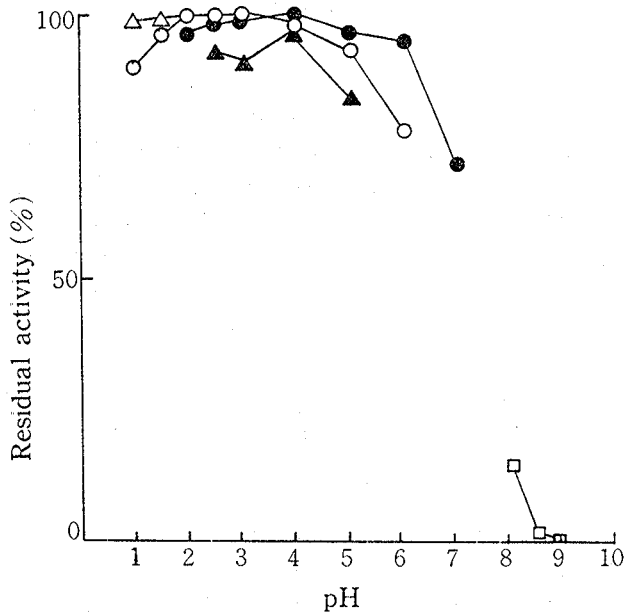


Fig. 7. Effect of pH on Stability of Acid Proteinase.

The enzyme solution, 0.2 ml containing 0.84 mg of protein of acid proteinase, was kept at 4°C for 72 hr with 0.2 ml of each buffer, and then the residual activity was assayed. Buffers used were:

- , 0.2 M sodium acetate-HCl buffer; ●—●, 0.1 M McIlvaine buffer; △—△, 0.1 M lactic acid-HCl buffer; ▲—▲, 0.1 M lactic acid-NaOH buffer; □—□, 0.1 M Na₂CO₃-H₂CO₃-KCl buffer.

金属塩の影響を調べた場合と同様な方法で各 proteinase inhibitor の影響を調べた (Table VI). その結果, 本酵素活性は Sodium lauryl sulfate, 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)-propane およびペプスタチンによって強く阻害されることが示された.

(7) ミルク凝固活性に及ぼす pH の影響

pH 5.3~5.5の狭い範囲においてのみ強いミルク凝固活性が認められた.

(8) 酵素の基質特異性

各種の蛋白質の1%溶液に酵素を添加し, 30°C で各時間保持した. 遊離されてくる α-アミノ基をニンヒドリン法で測定した. 本酵素はヘモグロビン, 大豆カゼイン, 卵白アルブミン, ミルクカゼイン, 牛血清アルブミンの順に良く作用し, 広い基質特異性を示した (Table VII).

考 察

Aspergillus saitoi, *A. usamii* は脱脂大豆を用いると酸性 proteinase をよく生産することが報告されてい

Table VII. Hydrolysis of Various Proteins by *C. rolfsii* Acid Proteinase

Substrate	Hydrolysis of peptide bonds (%)		
	Incubation time (hr)		
	1	24	48
Milk casein	1.2	8.0	8.7
Hemoglobin	9.9	21.0	21.0
Gelatin	1.5	2.9	3.6
Soybean casein	4.1	12.2	15.7
Albumin (Egg-white)	1.2	11.8	13.4
Albumin (Bovine)	0.9	6.4	8.6
Gluten	0.7	4.0	4.3
Fibroin	1.4	1.8	1.9
Protamine	1.7	3.4	4.4
Collagen	0.4	1.2	1.3
α-Globulin	0.4	2.3	2.7
Histone	0.2	1.4	1.4
Zein	1.7	3.3	3.5

る⁽⁴⁾。 *C. rolfssii* においても同様の結果が得られた。 Ichishima ら⁽⁴⁾ は *A. saitoi*, *A. usamii* においては、脱脂大豆基本培地に無機窒素源の NH_4Cl や NaNO_3 を0.5%以上添加すると酸性 proteinase 生産は高まり、有機窒素源の脱脂大豆の添加では逆に多少低下することを報告している。一方、*A. oryzae*, *A. sojae*, *A. melleus* のように、酸性 proteinase と同時にセリン proteinase や metalloproteinase を生産する菌においては、無機窒素源を添加すると、酸性 proteinase の生産が減少し、他の proteinase の生産が増加すると報告されている⁽⁴⁾。 *C. rolfssii* においては、無機窒素源が培地に添加されると、酸性 proteinase の生産は低くなり、脱脂大豆やカゼインなどの有機窒素源を添加した時には生産は多少高くなる結果が得られた。永田ら⁽²⁰⁾が報告しているように *C. rolfssii* では有機窒素源の方が無機窒素源よりシュウ酸の生産に良好であること、および培地の最終 pH が3.2~3.6の場合に酵素の生産が良いという本実験の結果から、*C. rolfssii* において、有機窒素源が無機窒素源より酵素生産に有効である原因は、有機窒素源がシュウ酸生産に好影響を与え、そのことが酸性 proteinase 生産における pH 調節に良好に作用することにあると考えられる。

各種の微生物起源の酸性 proteinase の作用至適 pH はそれぞれ、*A. saitoi*⁽²⁾が pH 2.9~3.3, *Trametes sanguinea*⁽⁶⁾ が pH 2.3~2.5, *Acrocylium* sp. が pH 2.0, *A. niger*⁽⁶⁾ が pH 2.0である。*C. rolfssii* の酵素の作用至適 pH はミルクカゼインを基質とした場合には pH 2.5, ヘモグロビン-HCl を基質とした場合には pH 2.0であった。

ブタの pepsin⁽²²⁾ は pH 1.0~6.0において安定であり、微生物起源の酸性 proteinase は一般に pH 2.0~6.0で安定である。*C. rolfssii* の酵素はブタの pepsin と同様に pH 1.0でも安定であることから、微生物起源の中では最も強い耐酸性酵素に属しており、この特性はその応用面を考える時に有用なものと思われる。

セリン proteinase の特異的阻害剤、potato-trypsin inhibitor やロイペプチン、SH proteinase の特異的阻害剤、モノヨード酢酸や *p*-chloromercuribenzoate, ならびに metalloproteinase の阻害剤である ethylene diamine-tetra-acetic acid によっては本酵素活性は阻害されなかったが、酸性 proteinase の特異的阻害剤であるペプスタチンおよび1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)-propane によって本酵素活性は強く阻害された。これらの試薬は酸性 proteinase の活性中心にあるアスパラギン酸由来のカルボキシル基を特異的に修飾することから^(23,24)、*C. rolfssii* の酵素も活性中心にカルボキシル基を持つことが示唆される。

以上のように、本酵素が低い作用至適 pH を持ち、耐酸性であるとともに、酸性 proteinase の特異的阻害剤によって強く阻害された結果は、*C. rolfssii* の proteinase が酸性 proteinase であることを強く支持している。

本酵素は1966年に梶、大崎が見出したとおり(未発表)、強いミルク凝固活性を示すが、その作用 pH が5.3~5.5の範囲に限られている点で、天然の牛乳、pH 6.5、にレンニン代替酵素として用いるには適当と考えられない。

References

- (1) YOSHIDA, F. and NAGASAWA, M., *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, **20**, 262 (1956).
- (2) YOSHIDA, F., *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, **20**, 252 (1956).
- (3) ICHISHIMA, E. and YOSHIDA, F., *Agric. Biol. Chem.*, **26**, 547 (1962).
- (4) ICHISHIMA, E. and YOSHIDA, F., *Agric. Biol. Chem.*, **26**, 554 (1962).
- (5) KOAZE, Y., GOI, H., EZAWA, K., YAMADA, U. and HARA, T., *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 216 (1964).
- (6) TOMODA, K. and SHIMAZONO, H., *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 770 (1964).
- (7) KAJI, A. and TAGAWA, K., *Nippon Nogei-kagaku Kaishi* **40**, 325 (1966).
- (8) YOSHIHARA, O. and KAJI, A., *Fourth Intern. Ferm. Symp. Abs.*, 241 (1972).
- (9) MURAKAMI, K. and INAGAMI, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 757 (1975).
- (10) HAGIWARA, B., *Koso Kenkyuho*, **2**, 240, Tokyo, Asakura Book Co. (1962).
- (11) ARIMA, K., IWASAKI, S. and TAMURA, G., *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 540 (1967).
- (12) SOXHLET, *Milchzeitung*, **6**, 495, 513 (1877).
- (13) FUKUMOTO, J., TSURU, D. and YAMAMOTO, T., *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 710 (1967).
- (14) YEMM, E. W. and COCKING, E. C., *Analyst*, **80**, 209 (1955).
- (15) MCGRATH, R., *Analytical Biochem.*, **49**, 95 (1972).
- (16) LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 263 (1951).
- (17) ANDREWS, P., *Biochem. J.*, **96**, 595 (1965).
- (18) VESTERBERG, O., *Methods in Enzymology*, **XXII**, 389-412, New York and London Academic Press Inc. (1971).
- (19) DOI, E. and OHTSURU, C., *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1747 (1974).

- (20) NAGATA, Y. and HAYASHI, *Nippon Nogei-kagaku Kaishi* **30**, 86 (1956).
- (21) UCHINO, F., KURONO, Y. and DOI, S., *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 428 (1967).
- (22) RYLE, A. P., *Methods in Enzymology*, **XIX**, 316-336, New York, N. Y., Academic Press Inc. (1970).
- (23) MORIHARA, K., *Tanpakushitsu · Kakusan · Koso*, **22**, 1259 (1977).
- (24) CHEN, K. C. S. and TANG, J., *J. Biol. Chem.*, **247**, 2566 (1972).

(1981年5月30日受理)