Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

一般論文 Regular Articles

Rhizopus japonicus NR 400 の産生する菌体外リパーゼ

鈴木 満，水柿道直
東北大学医学部附属病院薬剤部*

Some Properties of an Extracellular Lipase Produced by Rhizopus japonicus NR400

MITSU SUZUKI and MICHINAO MIZUGAKI
Department of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University Hospital*

(Received May 18, 1987)

Immunotitration experiments using the specific antibody which was raised against the intracellular lipase purified from *Rhizopus japonicus* NR400 (M. Suzuki and M. Mizugaki: J. Biochem., 100, 1207 (1986)) demonstrated the existence of another lipase in the lipase preparation from the same microorganisms. The extracellular lipase, which was mainly found in the culture filtrate, had an optimum pH between 4 and 6. About 75% of its activity remained after the heat treatment at 50°C for 15 minutes at pH 7.2, and its activity slightly increased in the presence of 1 mM ferrous ion. The extracellular lipase as well as the intracellular lipase had such suitable properties as a component of digestive drugs.

Keywords——*Rhizopus japonicus* NR400; extracellular lipase; ferrous ion; immunotitration; pH dependency; heat stability

Rhizopus japonicus (*R. japonicus*) NR400 が産生する菌体内リパーゼは，アルカリ性条件下で容易に抽出され，しかもかなり安定なところから数種類の市販消化酵素製剤の構成成分として採用されている．著者らは先にこの菌体内リパーゼの精製単離を行い，その性状を明らかにした[1,2]．これをすでに報告されている *R. japonicus* KY521[3] の菌体外リパーゼの性状と比較したところ，次のような相違が認められた．すなわち至適 pH は NR400 では酸性側に，KY521ではアルカリ側に存在し，二価の鉄イオンにより，NR400では酵素活性は阻害されないが KY521 では 90% 酵素活性が阻害される．次に，単離した菌体内リパーゼの特異抗体を作製し，本リパーゼ製剤について免疫滴定を行ったところ，滴定後もリパーゼ活性の約20%が残存していることが観察され，この残存活性は NR400 の産生する他のリパーゼに依ることが示唆された．そこで NR400 の培養を行って検討した結果，その培養ろ液中に別種のリパーゼが放出されることが判明した．

今回，この菌体外リパーゼの性状について検討を加え NR400菌体内リパーゼと比較を行うと共に，KY521由来の菌体外リパーゼの性状と比較した結果を報告する．

実験の部

1. 試料，試薬

R. japonicus NR400 の菌体及び本菌体の製剤であるリパーゼサイケンとオリパーゼは大阪細菌研究所から提供を受けた．寒天末，牛肉エキス(極東)，ポリペプトン(大五栄養)，酵母エキス (Difco)，日局オリブ油 (保栄薬工) は市販品をそのまま用いた．その他の試薬は市販の特級を用いた．

2. 培養

Table 1 に示す組成の培地を用いた．初めにAの組成の寒天平板培地に滅菌蒸留水で希釈した菌体を移植し，22°C で増殖させる．形成した菌集落をBの組成の液体培地[4] に移植し，27°C で振とう培養を行った．

3. 粗酵素液の調製

48時間培養後，吸引ろ過によりろ液を分取した．ろ液

* 仙台市星陵町1-1; 1-1, Seiryomachi, Sendai, 980 Japan

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

Table 1. Culture Medium

A.	Meat extract	1.0 g
	Yeast extract	0.5 g
	Peptone	1.0 g
	NaCl	0.3 g
	Agar	1.5 g
		in 100ml
B.	Glucose	1.0 g
	Peptone	3.0 g
	KH_2PO_4	0.2 g
	KCl	0.05 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05 g
	Soybean lecithin	0.2 g
		in 100ml at pH 5.5

は一部を残して $(NH_4)_2SO_4$ 85%飽和とし，生じた沈殿を少量の水に溶解し，Diaflo ultrafiltration membrane (Amicon) を用いて脱塩濃縮し，菌体外リパーゼ試料液とした．吸引残渣（菌体）7 gに N/20 Na_2HPO_4 50ml を加え，30分間攪拌後ろ過し，ろ液は同特異抗体による免疫滴定用の菌体内リパーゼ試料とした．

*R. japonicus*N R400 のろ液を各 pH の McIlvaine 緩衝液で10倍に希釈し，希釈直後及び24時間後 0.1M リン酸緩衝液（pH 7.2）で10倍に希釈してリパーゼ活性を測定した．リパーゼサイケン及びオリパーゼは pH 7.2, 5 mM のリン酸緩衝液でそれぞれ 12.5mg/ml, 0.3 g/ml 濃度として抽出を行い，抽出液は各pH の McIlvaine 緩衝液で10倍に希釈後，25°C に放置し，各 pH によるリパーゼ活性の変化を検討した．

4. 菌体内リパーゼ特異抗体の作製

前報[1] に従い，本菌体の生産する菌体内リパーゼ精製品を家兎に免疫し，特異抗体を得，DEAE-cellulose（生化学工業）カラムクロマトグラフィに付しIgG画分を得た．

5. リパーゼ活性測定法

基質は超音波（Tomy Seiko, UR-200P）処理により，10%オリーブ油エマルジョンを調製して用いた．基質 0.5ml，緩衝液 0.4ml を含む反応液に酵素液 100μl あるいは 150μl を加えて 37°C で30分酵素反応を行った．リパーゼ活性測定は Rhodamin 6G 法[5] を主に用い，一部は中和滴定法（免疫化学的特性における残存活性測定）により行った．中和滴定法は酵素反応 30 分後，アセトン，エタノール（1：1）の混液2mlを加え酵素反応を止めてから 0.05N NaOH 1ml を加え，1%フェノールフタレンを指示薬として 0.05N HCl で逆滴定を行った．

結果及び考察

1. *R. japonicus* NR400 の培養の経時変化

R. japonicus NR400 を培養した場合の培養液の pH，及び菌体の湿重量の経時的変化を Fig. 1 に示した．24時間後から対数増殖期に入り，72時間後にはピークに達した．培養液の pH は 5.5 から 48 時間後には 5.0 に下降し，その後72時間後には 7.8 まで上昇した．

2. 免疫化学的検討

R. japonicus NR400 菌体外及び菌体内リパーゼの相違を明らかにするため，菌体内リパーゼの特異抗体を用い免疫滴定を行った．その結果を Fig. 2 に示したが，免疫滴定の結果，培養菌体よりアルカリ抽出を行った粗酵

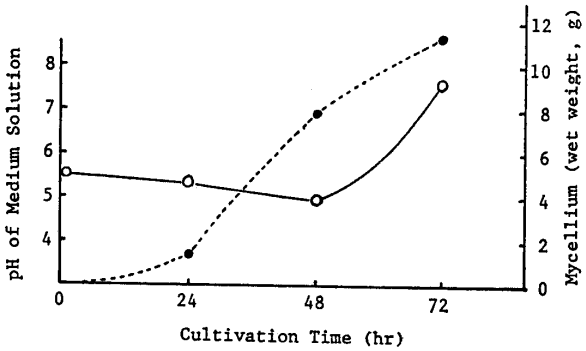

Fig. 1. Lipase Production and pH Changes in Relation to Growth of *Rhizopus japonicus* NR400

mycelial growth measured by wet weight ……●……, pH ——○——

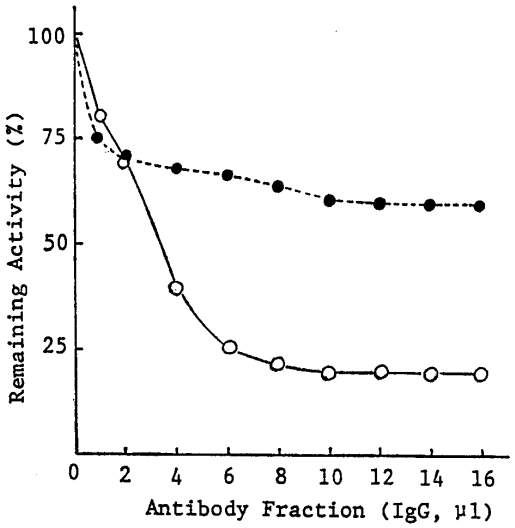

Fig. 2. Immunotitration of Lipase Activity from *Rhizopus japonicus* NR400

intracellular lipase ——○——
extracellular lipase ……●……

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

素標品の活性は同抗体8μlまでは徐々に低下し，約20%でプラトーに達した．一方，ろ液中のリパーゼ活性は初めの2μlの抗体で30%低下したが，以後抗体量を増やしても数%の低下に留まり，残存活性は約60%でプラトーに達した．すなわち，*R. japonicus* の菌体より抽出したリパーゼ試料には，著者らがさきに精製を行った菌体内リパーゼ[1]と免疫化学的に交差しないリパーゼが約20%存在し，ろ液中の菌体外リパーゼ試料には40%の菌体内リパーゼが存在していることが示唆された．

3. 菌体外リパーゼの至適pH及び二価鉄イオンの影響

R. japonicus NR400 培養ろ液の各 pH 処理後におけるリパーゼ活性を測定し，結果を Fig. 3 に示した．至適 pH は 4.0 ないし 5.0 付近に認められたが，pH 7.0 ないし 8.0 においても至適 pH の60～70%のリパーゼ活性を示した．

これまで著者らは種々のリパーゼ製剤に関して二価鉄イオンの存在によりリパーゼ活性が上昇することを報告してきた[6,7]．そこで二価鉄イオンの影響を検討するために硫酸第一鉄溶液（最終濃度 1 mM）を反応系に加えたところ，いずれの pH においてもわずかながら活性の上昇が認められた．

4. 菌体外リパーゼの熱安定性

R. japonicus KY521 由来の菌体外リパーゼは，pH 6.5 で 50°C に15分保温するとその酵素活性の80%が失われたと報告されている[3]．そこで *R. japonicus* NR 400 の培養ろ液を pH 7.2 で 50°C に15分保温し酵素活性を測定したところ，75%の活性が残存しており，NR 400 由来の菌体外リパーゼも菌体内リパーゼと同様に熱に対し比較的安定であることが示された．したがって，NR400 株と KY521 株では同じ菌体外酵素でも熱安定性が異なることが判明した．

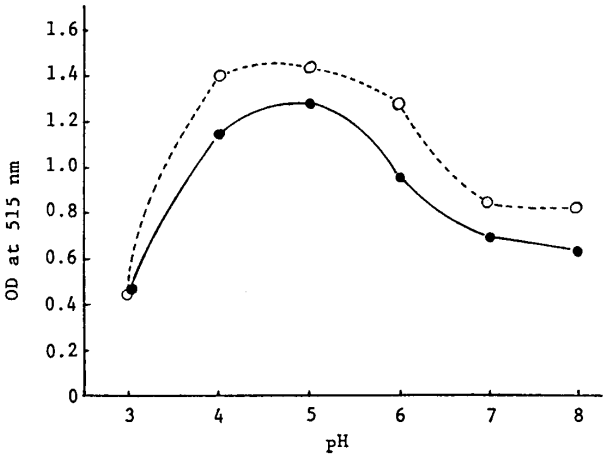

Fig. 3. Effect of pH and Ferrous Ion on Lipase Activity of *Rhizopus japonicus* NR400

lipase activity in the presence of $FeSO_4$ ……○……

lipase activity in the absence of $FeSO_4$ ——●——

5. *R. japonicus* NR400 菌体外リパーゼ及び *R. japonicus* 由来リパーゼ含有酵素製剤の pH 安定性

R. japonicus NR400 ろ液中のリパーゼ活性に対する pH の影響を検討した．結果を Table 2 に示した．各緩衝液に希釈直後はいずれの pH においても高い活性を示した．24時間後には，pH 3.0 に放置した場合のみ著しく活性は低下したが，他の pH において活性の低下は認められなかった．

R. japonicus NR400 由来のリパーゼを含有するリパーゼサイケン及びオリパーゼ抽出液のリパーゼ活性に対する pH の影響を測定した結果を Table 3 に示した．この場合も各 pH に修正直後はいずれの pH でも高いリパーゼ活性を示した．しかし，24時間後には pH 3.0 及び 8.0 において活性は著しく低下した．リパーゼサイケンの場合は pH 4.0 で，またオリパーゼの場合は pH 5.0

Table 2. Extracellular Lipase Activity in the Culture Filtrate of *Rhizopus japonicus* NR400

pH	Time (hr) 0	24
3	1.13	0.19
4	1.54	1.56
5	1.90	1.99
8	1.97	2.02

Table 3. Intracellular Lipase Activity of *Phizopus japonicus* NR400

	pH	Time (hr) 0	24
Lipase "Saiken"	3	0.77	0.09
	4	1.70	1.17
	5	1.64	0.90
	8	1.55	0.04
Olipase	3	0.86	0.21
	4	1.18	0.51
	5	1.52	0.68
	8	1.00	0.09

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

で最もよく活性が保持され，それぞれ69%，55%の活性が残存していた．

なお，ろ液中に約40%混入している菌体内リパーゼは，ろ液中では pH 4.0 以上においてほとんど失活せずに安定に存在することが示された．

結　論

1. *R. japonicus* NR400 が産生し，ろ液中に放出される菌体外リパーゼの至適 pH は，4.0から6.0の酸性側に存在する．

2. ろ液中のリパーゼ活性のうち約40%は，その免疫化学的挙動から著者らが精製単離した菌体内リパーゼによるものと考えられる．

3. NR400より得られるリパーゼ製剤にはさきに単離された菌体内リパーゼ（約80%）の他にマイナーな成分として菌体外リパーゼ（約20%）が含まれるが，後者も経口用製剤として適した性状を有している．

謝辞 オリパーゼ及びリパーゼサイケンを供与いただいた大阪細菌研究所に深謝する．

引用文献

1) M. Suzuki, H. Yamamoto, M. Mizugaki: J. Biochem., **100**, 1207 (1986).
2) 鈴木　満，水柿道直：薬剤学，投稿中
3) K. Aisaka, O. Terada: J. Biochem., **89**, 817 (1981).
4) K. Aisaka, O. Terada: Agr. Biol. Chem., **44**, 799 (1980).
5) M. Anderson, R. McCarty: Anal. Biochem., **45**, 260 (1972).
6) 金久保好男，鈴木　満，迫　光子，山口裕子：病院薬学，**8**, 201 (1982).
7) 金久保好男，鈴木　満，迫　光子，山口裕子：病院薬学，**8**, 206 (1982).

NII-Electronic Library Service