

氏名(本籍)	こばやしひでゆき 小林秀行 (岡山県)
学位の種類	農学博士
学位記番号	博乙第293号
学位授与年月日	昭和61年2月28日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	BIOCHEMICAL STUDIES ON THE MILK-CLOTTING ENZYME FROM <i>IRPEX LACTEUS</i> (<i>Irpex lacteus</i> の凝乳酵素に関する生化学的研究)
主査	筑波大学教授 農学博士 村上和雄
副査	筑波大学教授 農学博士 田淵武士
副査	筑波大学教授 農学博士 安井恒男
副査	筑波大学教授 農学博士 清水寛一

論文の要旨

チーズ製造には哺乳中の仔牛の胃から調製される仔牛レンネットが昔から広く用いられている。しかし食肉資源の確保のためと、チーズ消費量の増大によりその代替品を検索する努力がなされ、現在微生物起源の代替品としては *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Endothia parasitica* の酵素が工業的に利用されている。しかし、これらも完全なものではないので、良質な代替品の開発が望まれている。

河合らは担子菌を用い代替酵素の検索を行い、*Irpex lacteus* の酵素が有望である事を報告したが、その酵素化学的性質とチーズの品質について十分に明らかにされていない。

そこで本研究では、*Irpex lacteus* の酵素を精製し、その酵素化学的性質を明らかにするとともに、実際にチーズを製造し、本酵素の仔牛レンネット代替品としての評価を行った。

〔I〕 *Irpex lacteus* の凝乳酵素の精製と性質

著者は既に酸性プロテアーゼの特異的阻害剤である pepstatin A 及びその N-アシル基の異なる pepstatin をリガンドとする affinity chromatography を用いた仔牛キモシン及び *M. miehei*, *E. parasitica* の凝乳酵素の大量簡易精製法を開発している。しかし *I. lacteus* の酵素は、これらリガンドに対する親和性が高いためにカラムから安定な状態では溶出されない。そこで阻害活性が pepstatin A の $\frac{1}{100}$ である dehydroacetylpepstatin をリガンドとする affinity chromatography を含む方法によ

り、本酵素の精製を行った。

その結果、2種の凝乳酵素A、Bが単離された。分子量は共に36,000、等電点はAが4.9、Bが5.3であり、カゼイン分解の至適pHはAが3.0、Bが2.9であり、凝乳の至適温度は45°Cであった。両酵素ともpH 6.0、50°C、20分処理でほぼ失活し、他の凝乳酵素と比較して中性域で不安定であった。

A、Bは共に酸性プロテアーゼの阻害剤であるpepstatin、DAN(diazoacetyl-D, L-norleucine methylester)、EPNP(1,2-epoxy-3(*p*-nitrophenoxy)propane)により阻害され、A、Bともにキモシンや他の微生物凝乳酵素と同様に、活性中心に2つのカルボキシル基が存在する事が示唆された。

また、A、Bは共に凝乳活性とプロテアーゼ活性の比が、微生物凝乳酵素の中で最も高い*M. pusillus*、*M. miehei*の酵素と同程度の値を示した。

〔II〕 *Irpex lacteus*の凝乳酵素のinsulin B鎖に対する基質特異性

*I. lacteus*の主凝乳酵素である酵素Bはinsulin B鎖のLeu(11)-Val(12)、Ala(14)-Leu(15)、Phe(24)-Phe(25)、Thr(27)-Pro(28)結合を切断した。また酵素Bの特異性は他の微生物凝乳酵素とは異なっており、キモシンやペプシンよりも厳密な特異性を示した。酵素Bの特徴は、他の酸性プロテアーゼによっては殆ど切断されないThr(27)-Pro(28)結合をかなりの速度で加水分解する事である。

〔III〕 *Irpex lacteus*の凝乳酵素の α_{s1} -caseinに対する基質特異性

キモシンの α_{s1} -caseinに対する特異性は明らかにされているが、微生物凝乳酵素の特異性はまだ確立しておらず、 α_{s1} -caseinに対する特異性を知る事は仔牛レンネット代替品としての性質を知る上で重要である。そこで酵素Bの α_{s1} -caseinに対する基質特異性を検討し、キモシンの特異性と比較した。

凝乳酵素は α_{s1} -caseinの分解パターンから2つのグループに分けられる。第1のグループはキモシンと*M. miehei*の酵素であり、 α_{s1} -caseinから α_{s1} -Iのみを生成する。第2のグループは*I. lacteus*と*E. parasitica*の酵素であり、 α_{s1} -Iの他にいくつかの分解生成物を生じる。第1のグループは第2のグループよりも蛋白分解力が弱く、厳密な特異性をもっているといえる。

酵素Bとキモシンの α_{s1} -caseinに対する特異性はかなり異なっており、唯一の共通な切断点はPhe(23)-Phe(24)であった。酵素Bはキモシンと同様に α_{s1} -caseinのPhe(23)-Phe(24)を水解して α_{s1} -I [Phe(24)-Trp(199)]を生成するが、次の切断点はLys(103)-Tyr(104)でありTyr(104)-Trp(199)を生成し、更にそのPhe(153)-Tyr(154)を水解する。

これらの結果から、キモシンは、必ずP₁サイトにPhe、Leuのような疎水性アミノ酸を要求し、一方酵素BはPhe(23)-Phe(24)やPhe(153)-Tyr(154)のような2つの疎水性アミノ酸からなるペプチド結合に対して、特異性を示すことがわかった。

〔IV〕 *Irpex lacteus*の凝乳酵素の κ -及び β -caseinに対する基質特異性

キモシンを含む凝乳酵素による凝乳は、まず κ -caseinのPhe(105)-Met(106)が水解され、生成

したpara- κ -caseinがCaイオンの存在下、他のカゼイン画分とともに沈澱するためにおこる事が知られている。またチーズ製造上問題となる苦味は、主に β -caseinの加水分解により生成するとされており、特に β -caseinのArg(202)-Val(209)はカフェインの250倍の苦味をもつペプチドである。仔牛レンネット代替品としては苦味を生成しない事が最も重要であり、 β -caseinに対する特異性を検討する必要がある。そこで酵素Bの κ -casein及び β -caseinに対する特異性を検討した。

酵素Bを κ -caseinに作用させるとPyrGlu(1)-Phe(105)とMet(106)-Val(169)が高収率で生成し、酵素Bによる凝乳も他酵素と同様に、 κ -caseinのPhe(105)-Met(106)結合が水解されるためにおこる事が示された。

β -caseinに対して酵素Bは、*M. miehei*の酵素と同じ分解パターンを示した。*E. parasitica*の酵素は全く異なった分解パターンを示し、キモシンは使用条件では β -caseinを殆ど分解しなかった。

酵素Bとキモシンの β -caseinに対する特異性を比較すると、酵素BによるSer(142)-Trp(143)の切断とキモシンによるLeu(139)-Leu(140)の切断を除いて共通であった。 β -caseinに対する両酵素の切断点は類似していたが、分解パターンは異なっており、これは両酵素による β -caseinの切断順序が異なるために、異なる分解パターンを示したものと思われる。

[V] *Irpex lacteus*の凝乳酵素のチェダーチーズ試作による仔牛レンネット代替品としての評価

本酵素の凝乳活性とプロテアーゼ活性の比が、工業的に利用されている*Mucor*属の酵素と同程度である事、苦味ペプチドの生成源である β -caseinに対しキモシンと類似した特異性を示した事は、本酵素が苦味を生成しにくい良質な凝乳酵素である事を示している。それを確認するために、dehydroacetylpepstatinカラムによる凝乳酵素画分を用いチェダーチーズの試作を行った。

その結果、チーズの収量、タンパク収率、脂質収率に関し、仔牛レンネットで試作したチーズとの間に差はみられなかった。チーズ熟成中のタンパク分解は、*Irpex*の酵素の方が仔牛レンネットに比べてわずかに高かったが、両チーズとも6ヶ月熟成後も苦味及び酸敗臭の生成はなかった。

一方、*I. lacteus*の粗酵素中には凝乳酵素以外に 10^{-4} Mのpepstatinにより阻害されない蛋白分解力の強い酸性プロテアーゼが存在する。この酵素をdehydroacetylpepstatinカラム、chymostatinカラムを用い単離した。本酵素のヘモグロビン分解の至適pHは2.8であり、凝乳活性とプロテアーゼ活性の比は*Irpex*の凝乳酵素の $\frac{1}{4}$ であった。このために粗酵素からこのプロテアーゼを除いた凝乳酵素画分で、良質のチーズ製造が可能となったと思われる。

以上述べたように、*I. lacteus*の凝乳酵素を用い良質のチーズが製造できる事から、粗酵素中の不用なプロテアーゼが簡単な処理で除去できるなら、*I. lacteus*の凝乳酵素はチーズ製造用レンネット代替品として有望と思われる。

審 査 の 要 旨

本論文は、*Irpex lacteus*の凝乳酵素の酵素化学的性質として基質特異性をとりあげ、通常用いられるインシュリンB鎖のみならず、ミルク中の主要タンパク成分である $\alpha 0 D 1 9^1$ -, β -カゼインに対する切断点を同定し、キモシンの特異性と詳細に比較したものである。微生物凝乳酵素の各カゼイン成分に対する特異性の報告はなく、多くの新しい知見を提供した。

凝乳酵素の性質上、各カゼイン成分に対する基質特異性の解明こそ意味があり、本酵素がチーズ製造用レンネット代替品として優れたものである事を明らかにしたことは高く評価できる。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。