

# Paecilomyces tenuipesの生産する菌体外エステラーゼについて

誌名	名城大学農学部学術報告
ISSN	09103376
著者	服部, 真季 磯村, 茂樹 横山, 英之 氏田, 稔 原, 彰
巻/号	40号
掲載ページ	p. 45-52
発行年月	2004年3月

*Paecilomyces tenuipes* の生産する菌体外エステラーゼについて

服部 真季\*・磯村 茂樹\*\*・横山 英之\*\*  
氏田 稔\*・原 彰\*

---

Extracellular Esterases Produced by *Paecilomyces tenuipes*.  
Maki HATTORI\*, Sigeki ISOMURA\*\*, Eiji YOKOYAMA\*\*, Minoru UJITA\*  
and Akira HARA\*

---

## Summary

A kind of esterases, P-1 and P-2, from the culture supernatant of *Paecilomyces tenuipes* was purified by the procedures of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation, chromatography on DEAE Bio-Gel Agarose and gel-filtration with Superdex 200pg and their properties were examined. P-1 was purified 60-fold with 4.1% yield and P-2 was did 74-fold with 1.3% yield. The optimum temperature of two enzymes was 40°C but P-2 showed a lower stability above 30°C than P-1.

Two enzymes had the highest activity for *p*-nitrophenyl hexanoate among *p*-nitrophenyl esters of fatty acids tested. Even if chain length of fatty acid was longer or shorter than hexanoic acid, the activity of the enzymes for those decreased greatly. They did not hydrolyze triacylglycerol or monoacylglycerol, indicating that these are not a general lipase. Two enzymes were inhibited strongly by E-600, weakly by  $\text{CuSO}_4$  and PCMB, and activated slightly by cysteine. The purified P-1 gave several bands for protein staining and a single band for activity staining on the SDS-PAGE gel. The N-terminal amino acid sequence of the activity part of P-1 showed high homology with those of plant cutinases.

## 緒 言

冬虫夏草とは、糸状菌の一種である冬虫夏草菌が昆虫などに寄生し、子実体を形成したものである。本来の名称は、コウモリガの幼虫に子囊菌類核菌綱バクカクキン目バクカクキン科の *Cordyceps sinensis* が寄生したものを指すが、広義には、様々な昆虫に糸状菌が寄生し、特有な形態を形成したものを含み、クモ類、植物又は菌類への寄生体をも加えている。より専門的には、完全世代の *Cordyceps* 属、*Torrubiella* 属、*Neocordyceps* 属等に限定する考え方<sup>1)</sup>もある。

我々が研究材料としている *Paecilomyces tenuipes* (ハナサナギタケ) は、愛知県では最も普遍

的に発見される不完全世代菌であるが、その完全世代は *Cordyceps takaomontana* (ウスキサナギタケ) である。著者らは *C. takaomontana* を見つけることは極めてまれであるため、愛知県において採取した *P. tenuipes* の 22 株について、交配型遺伝子座の構造を検討したところ、いずれの株も交配型遺伝子座の部分的な欠失が認められた。このことから、*P. tenuipes* は本来はホモタリックであったが、交配型遺伝子座が欠損してヘテロタリック性を示すために、結果的に有性生殖による完全世代の発生が少なくなっていると推論した<sup>2)</sup>。

冬虫夏草菌が感染し、宿主体外殻を破って侵入し、増殖するには、様々な酵素類を分泌すると考えられる。*P. tenuipes* はコロイダルキチンを炭素源と

\* 生物化学研究室 \*\* 農学ハイテク・リサーチ・センター  
受理：平成 15 年 10 月 31 日

して培養すると、プロテアーゼ、キチナーゼおよび *N*-アセチルグルコサミンナーゼを生産した<sup>3,4)</sup>。このうち、プロテアーゼはスクロースを炭素源として培養しても生産されたが、コイダルキチン培地においてより多量に分泌された。これらは感染特異的酵素であると思われるが、我々は昆虫外殻のクチクラの構成成分である脂質の分解酵素についても探索を試みた。基質として *p*-nitrophenyl octanoate を用いて、*P. tenuipes* の培養液中の活性測定を行ったところ、分解活性が認められた。そこで、この酵素の昆虫への感染・増殖における役割を明らかにすることを目的として実験を進めた。その結果、分離した酵素は、triacylglycerol, monoacylglycerol に対して活性が全く認められなかったため、リパーゼではなくエステラーゼの一種であると推定した。

本論文は、*P. tenuipes* の生産するエステラーゼの精製と性質について調べた結果を報告する。

## 実験材料および方法

### 1. 実験材料および機器

キチンはナカライテスク社製を使用した。ペプトンおよび酵母エキスは Difco 社製を使用した。陰イオン交換体 DEAE Bio-Gel Agarose は BIO-RAD 社製、疎水クロマトグラフィー用担体 TOYOPEARL Phenyl-650 M は東ソー社製、ゲルろ過カラム HiLoad 20/60 superdex 200 pg は Amersham 社製を使用した。

### 2. 使用菌株および培養方法

*P. tenuipes* (BCMU IJ-02) は、愛知県瀬戸市岩屋町の岩屋堂において採集した菌株の分生子を寒天培地上で培養し、単一のコロニーとして得た。コロニーから取り出した菌体を液体培養後、10% グリセロール中に封じ、使用するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

前培養培地は、2% スクロース、0.5% ペプトン、0.3% 酵母エキス、0.2%  $\text{NaNO}_3$ 、0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05%  $\text{KCl}$ 、0.001%  $\text{FeSO}_4$  を含む溶液を pH 6.0 に調整して使用した。

本培養培地は前培養培地成分のスクロースを 0.3% コイダルキチンとした以外は同様の組成とした。コイダルキチンは粉末状キチンを用いて、常法<sup>5)</sup>により調製した。

前培養は前培養培地 100 ml に *P. tenuipes* の 10% グリセロールストックを植菌し、 $25^{\circ}\text{C}$ 、3 日間の振とう (110 strokes/min) 培養を行った。本培養

は 100 ml の培養液を含む 500 ml の坂口フラスコに前培養液 5 ml を加え、 $25^{\circ}\text{C}$ 、4 日間の振とう (110 strokes/min) 培養を行った。

### 3. エステラーゼの活性測定

エステラーゼ活性は、0.4 ml の 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)、0.4 ml の  $\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 ml の 1 mM *p*-nitrophenyl octanoate を含む溶液を  $30^{\circ}\text{C}$ 、5 分間インキュベートした後、適宜希釈した酵素液 0.1 ml を添加し反応を開始した。酵素液添加直後と一定時間反応させた後の 400 nm における吸光度をそれぞれ測定し、それらの吸光度差を活性とした。エステラーゼの 1 単位は上記条件下で 1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の *p*-nitrophenol を遊離する酵素量として定義した。

### 4. タンパク質の定量

タンパク質の定量は BIO-RAD 社の Protein Assay 系によって行い、標準曲線は  $\gamma$ -グロブリンを用いて作成した。クロマトグラムでは、タンパク質量は 280 nm における吸光度で表示した。

### 5. エステラーゼの精製

*P. tenuipes* を 0.3% のコイダルキチンを含む培地で 4 日間本培養を行った後、遠心分離 (8000 rpm, 10 min) し、ろ液 1402 ml を得た。培養ろ液に 90% 飽和となるように硫酸アンモニウム (928.1 g) を加えた。混合液を一夜放置後、遠心分離 (8000 rpm, 20 min) を行い、生じた沈殿を 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, 以下 A 緩衝液とする) に溶かした後、同緩衝液に対して透析した。透析内液を A 緩衝液で平衡化した DEAE Bio-Gel Agarose カラム (2.5  $\times$  30 cm) にアブライした。150 ml の A 緩衝液で洗浄後、A 緩衝液および 0.6 M  $\text{NaCl}$  を含む A 緩衝液による  $\text{NaCl}$  の直線的濃度勾配 (全量 800 ml) によって溶出した。エステラーゼは主に 2 つの活性ピークとして分離され、P-1 (フラクション Nos. 72-77) および P-2 (フラクション Nos. 90-110) の活性画分として集めた。

P-1 または P-2 に 1.2 M となるように硫酸アンモニウムを加えた後、それぞれ 1.2 M 硫酸アンモニウムを含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, B 緩衝液) で平衡化した TOYOPEARL Phenyl-650 M カラム (2.0  $\times$  23 cm) にアブライした。50 ml の B 緩衝液で洗浄後、B 緩衝液および A 緩衝液による硫酸アンモニウムの下降的濃度勾配 (全量 600 ml) によ

り溶出し、最終的に A 緩衝液 200 ml により溶出した。P-1, P-2 とともに 1 つの活性ピークとして溶出された。

得られた活性画分を、それぞれイオン交換水に対して透析を行った後、凍結乾燥した。乾燥粉末を 0.1 M NaCl を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, C 緩衝液) 2 ml に溶かし、C 緩衝液で平衡化した HiLoad 26/60 Superdex 200 pg カラム (2.6×60 cm) にアプライし、同緩衝液によってゲルろ過を行った。その結果、P-1, P-2 のいずれも 1 つのピークとしてはほぼ同じ位置で溶出された。これらを最終酵素標品として諸性質の実験に供した。

## 6. エステラーゼの諸性質

エステラーゼの最適温度、温度安定性、基質特異性、 $K_m$  値、阻害剤および活性化剤の影響をそれぞれ調べた。最適温度については、反応液を 20–70℃ の異なる温度でインキュベートすることにより調べた。温度安定性については、酵素を 20–70℃ に 10 分間放置後、活性を測定することにより調べた。基質特異性および  $K_m$  値については、様々な *p*-nitrophenyl 脂肪酸誘導体を用いて活性を測定することにより調べた。阻害剤および活性化剤の影響については、E-600 (diethyl 4-nitrophenyl phosphate), PCMB (4-Chloromercuribenzoic acid), cysteine および  $\text{CuSO}_4$  のそれぞれに酵素液を加え、4℃ に 1 時間放置後、活性を測定することにより調べた。

## 7. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli の方法<sup>6)</sup> に準じて行ったが、ゲルを活性染色するために、2-メルカプトエタノールを除いた。泳動は 12.5% ポリアクリルアミドゲル (PAGEL NPU 12.5 L, アトー社製) で、電極液には 0.1% SDS を含む 25 mM Tris-192 mM glycine 緩衝液を用いて行った。20 mA の定電流で泳動を行った後、タンパク質はクーマシーブリアントブルー-R-250 (CBB-R 250) で染色した。

## 8. SDS-PAGE ゲルの活性染色

SDS-PAGE ゲルの活性染色は、 $\alpha$ -naphthyl acetate を用いてアゾ色素法<sup>7)</sup> で行った。ゲルを 2% Triton X-100 溶液に浸漬し、数回溶液を変えながら 1 時間処理することにより SDS を除去した。次いでゲルを  $\alpha$ -naphthyl acetate, 0.1 M リン酸塩緩衝

液, Fast blue B 塩を含む溶液に 10 分間浸漬した。反応により生じた  $\alpha$ -naphthol とジアゾニウム塩との間で形成されたアゾ色素の黒色活性バンドを確認した後、イオン交換水で洗浄して反応を停止させた。

## 9. エレクトロブロットティング

SDS-PAGE を行った P-1 の活性染色位置に相当するゲル部分を、ブロットティング緩衝液 (25 mM Tris, 40 mM 6-aminohexanoic acid, 20% methanol, 0.02% SDS) に 10 分間浸漬し、セミドライ型ブロットティング装置を用いて、PVDF 膜に対し定電流 100 mA で 2 時間ブロットティングを行った。ブロットティング終了後、CBB 染色液 (0.2% CBB-R 250, 15% acetic acid, 25% isopropanol) で 1 分間染色した。次に脱色液 (60% methanol, 40%  $\text{H}_2\text{O}$ ) でバンドが鮮明になるまで液を適宜交換し、振とうしながら脱色した。その後、PVDF 膜を風乾させ、バンドを切り出した<sup>8)</sup>。

## 10. N 末端アミノ酸配列分析

P-1 のエレクトロブロットティングにより得た PVDF 膜のタンパク質染色バンドの N 末端アミノ酸分析をプロテインシーケンサー PPSQ-21 A (島津製作所) を用いて行った。

## 実験結果

### 1. *P. tenuipes* のエステラーゼ生産

*P. tenuipes* を様々な炭素源を含む培地で培養し、経目的に培養液を取り出して遠心分離後、上清のエステラーゼ活性を測定した。結果を Fig. 1 に示す。炭素源がコロイダルキチン、サナギ粉ではほぼ同様のエステラーゼ生産が見られ、培養 5 日まで生産量は増加し続けた。グリセロール、スクロース培地では、エステラーゼ生産は遅れるものの、5 日後にはコロイダルキチンやサナギ粉と同程度の生産性を示した。一方、合成 triacylglycerol である tricaprylin, trilaurin ではいずれも生産性が低かった。

### 2. エステラーゼの精製

エステラーゼの DEAE Bio-Gel Agarose カラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーの結果を Fig. 2 に示す。吸着画分に 2 つの活性ピークが検出され、P-1 および P-2 画分とした。両画分について、それぞれ TOYOPEARL Phenyl-650 M カラムによる疎水クロマトグラフィーおよび HiLoad 26/60

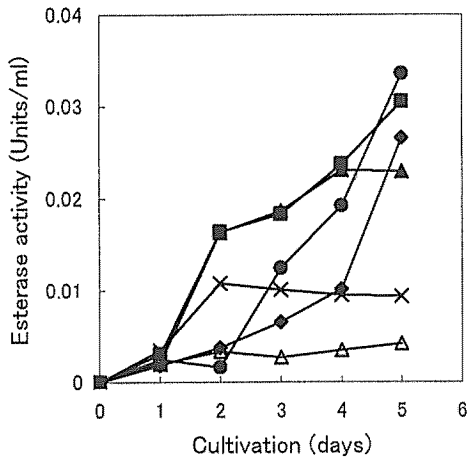


Fig. 1 Effect of carbon sources on the production of esterases from *P. tenuipes*.

*P. tenuipes* was cultured in 100ml of medium (pH6.0) containing 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.2% NaNO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl, 0.0018% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O and various carbon sources of esterases at 25°C. A portion of the culture was collected at the times indicated and centrifuged at 12,000rpm for 1min, and the enzyme activity of the supernatant was measured. ◆, 2% sucrose; ■, 0.3% colloidal chitin; ▲, 2% silkworm pupae powder; ●, 2% glycerol; △, 2% tricaprilyn; ×, 2% trilaurin.

Superdex 200 pg カラムによるゲルろ過を行ったが、両酵素ともそれぞれ1つのピークとして得られ、ゲルろ過による溶出位置はほぼ同じであった。

精製のまとめを Table 1 に示す。P-1 の収率は 8.4% であり、94 倍に精製され、P-2 の収率は 1.3% であり、74 倍に精製された。

### 3. エステラーゼの諸性質

#### 1) 最適温度および温度安定性

P-1, P-2 について最適温度を調べた。両酵素とも最適温度は 40°C であった。しかし 50°C では P-1 は 40°C の 95% の活性を示したのに対し、P-2 は 45% であった。また、温度安定性では、P-1 は 40°C まで安定であったのに対し、P-2 は 30°C 以上の温度ではほぼ直線的に活性が低下し、50°C では 20°C での 15% まで活性が失われた。

#### 2) 基質特異性

P-1, P-2 について基質特異性を調べた結果を Table 2 に示す。両酵素の *p*-nitrophenyl 脂肪酸エステルに対する活性は、ほとんど同じような傾向を示し、*p*-nitrophenyl hexanoate に対して最も高かった。次いで *p*-nitrophenyl butyrate, *p*-nitrophenyl octanoate に対しほぼ同程度の活性を示したが、脂肪酸の炭素数が最も少ない *p*-

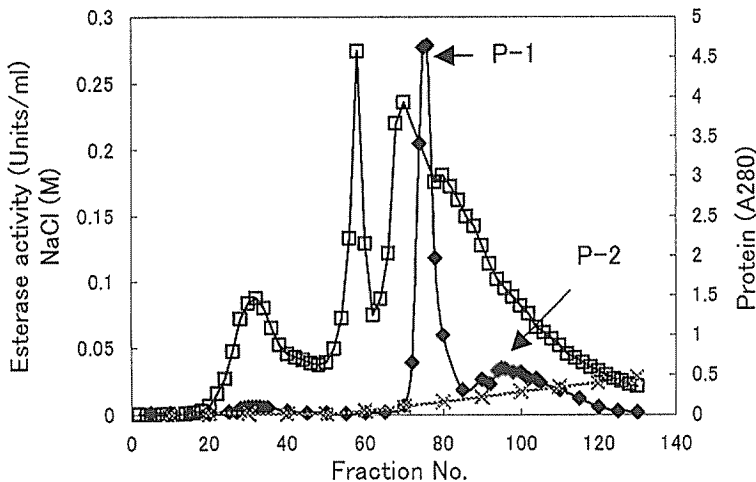


Fig. 2 Chromatography of esterase fraction obtained by ammonium sulfate precipitation on a DEAE Bio-Gel Agarose column.

The esterase fraction (104.2ml) obtained by ammonium sulfate precipitation in 10mM Tris-HCl (pH8.0, Buffer A) was put on a DEAE Bio-Gel Agarose column (2.5×30cm) equilibrated with Buffer A. The column was washed with 150ml of Buffer A, and the proteins were then eluted with a linear gradient of 0 to 0.6M NaCl (total 800ml) in the same buffer. The P-1 fraction (Nos.72-77, 44.5ml) and P-2 fraction (Nos. 90-110, 154.0 ml) were separately collected. ◆, esterase activity; □, protein; ×, NaCl.

Table 1. Summary of purification of esterases from *P. tenuipes*.

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (Units/ml)	Yield (%)
Crude extract	1402.0	589.16	31.92	0.054	100.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitate	104.2	370.91	22.00	0.059	68.9
DEAE Bio-Gel	44.5	37.40	9.37	0.251	29.4
P-1 Phenyl TOYOPEARL	32.5	5.32	4.13	0.776	12.9
Superdex 200 pg	30.5	0.53	2.69	5.075	8.4
DEAE Bio-Gel	154.0	43.60	5.12	0.117	16.0
P-2 Phenyl TOYOPEARL	60.5	2.45	2.71	1.110	8.5
Superdex 200 pg	19.4	0.10	0.40	4.000	1.3

Table 2. Substrate specificity of esterases.

Substrate (0.1 M)	Relative activity (%)	
	P-1	P-2
<i>p</i> NP-acetate	27	33
<i>p</i> NP-butyrate	100	103
<i>p</i> NP-hexanoate	131	133
<i>p</i> NP-octanoate	100	100
<i>p</i> NP-palmitate	15	10

Relative activity for each substrate was shown as % of the activity for *p*NP-octanoate.

Table 3.  $K_m$  values of P-1 toward *p*-nitrophenyl fatty and esters.

Substrate	$K_m$
<i>p</i> NP-acetate	1.05
<i>p</i> NP-butyrate	0.99
<i>p</i> NP-hexanoate	0.067
<i>p</i> NP-octanoate	0.057

Table 4. Effect of chemical reagents on esterase activity.

inhibitors or activators	Relative activity (%)	
	P-1	P-2
Control	100	100
E-600* <sup>1</sup> (10 $\mu$ M)	16	27
E-600 (100 $\mu$ M)	4	5
PCMB* <sup>2</sup> (1 mM)	89	83
Cysteine (1 mM)	116	110
CuSO <sub>4</sub> (1 mM)	75	74

\* 1 : diethyl 4-nitrophenyl phosphate

\* 2 : 4-chloromercuribenzoic acid

nitrophenyl acetate では、*p*-nitrophenyl octanoate に対する活性の 30%に過ぎなかった。なお、両酵素について、monoacylglycerol および triacylglycerol に対する活性を調べたところ、これらの基質には全く活性が認められなかった。

### 3) $K_m$ 値

P-1 について  $K_m$  値を調べた結果を Table 3 に示す。脂肪酸部分の炭素数 6 および 8 個の hexanoate と octanoate は、炭素数 2 および 4 個の acetate と butyrate よりも  $K_m$  値は 1 桁小さい値を示した。

### 4) 阻害剤および活性化剤の影響

P-1, P-2 の阻害剤および活性化剤の影響を調べた結果を Table 4 に示す。どちらの酵素も基質特異性と同様に、ほぼ類似した挙動を示した。E-600 によって強く阻害され、CuSO<sub>4</sub> により 25%程度阻害された。また、システインによって 10%程度の活性化が見られた。

## 4. P-1 の SDS-PAGE および活性染色

P-1 について、SDS-PAGE および活性染色を行った。結果を Fig. 3 に示す。P-1 の SDS-PAGE ゲルは、タンパク質染色によって数本のバンドを与えた。この結果から P-1 は均一に精製されていないことが示唆された。

タンパク質染色と活性染色を比較すると、活性染色はタンパク質染色による約 25 kDa のバンドと一致した。なお、データは示されていないが P-2 の活性染色バンドも P-1 とほぼ同じ位置に検出された。

## 5. N 末端アミノ酸配列分析

SDS-PAGE ゲルにおいて、Fig. 3 に示す活性のあった部位 a に相当するゲル部分のタンパク質を

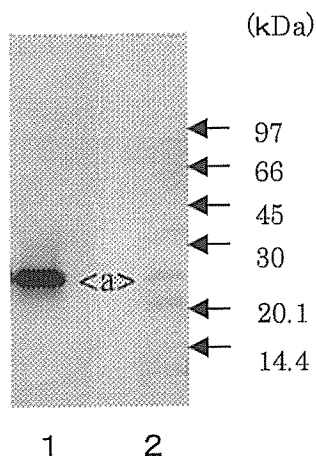


Fig. 3 SDS-PAGE and zymogram analysis of P-1.

SDS-PAGE without 2-mercaptoethanol was performed according to the method of Laemmli in a slab gel containing 12.5% acrylamide of PAGEL NPU-12.5L. The proteins were stained with CBB-R250. The activity staining of esterase was done the azo dye method using SDS-PAGE gel, from which SDS was removed of SDS after PAGE with Triton X-100. The gel was incubated in 20ml of  $\alpha$ -naphthyl acetate (10mg), Fast blue B (50mg) and 0.1M phosphate buffer (pH7.4) for 10 min, and washed with water. The activity was detected as a dark band. <a> indicates the protein band corresponding to the position of the activity staining. Molecular mass markers: 97kDa, phosphorylase b; 66kDa, albumin; 45kDa, ovalbumin; 30kDa, carbonic anhydrase; 20.1kDa, trypsin inhibitor; 14.4 kDa,  $\alpha$ -lactalbumin. Lane 1, activity staining of P-1; lane 2, protein staining.

PVDF膜に転写した。得られたPVDF膜のタンパク質染色バンドを切り出して、プロテインシーケンサーで分析した。その結果、N末端アミノ酸配列はAPLISSYTHINARGTTC PQGと判定された。

## 考 察

昆虫の皮膚は外側から表皮、真皮、基底膜で構成されており、真皮細胞はキチンや脂質などを分泌してクチクラ層を形成し、それらは硬化して外骨格を形成している。昆虫はこの外骨格によって、外敵の体内への侵入や外からの水の浸入を防ぎ、内部からの水の漏出を防止し、内部が乾燥しないように耐水性を備え、生体を守っている<sup>9-12)</sup>。

昆虫寄生菌は、体表から体内へ侵入する際、プロ

テアーゼ、キチナーゼおよびリパーゼ等を分泌し、その分解活性を利用して昆虫へ侵入すると考えられる<sup>13)</sup>。

著者らは *P. tenuipes* (ハナサナギタケ) が、コロイダルキチンを炭素源として培養することにより、プロテアーゼ、キチナーゼおよび *N*-アセチルグルコサミニダーゼを生産することを報告<sup>3,4)</sup>した。これらの酵素はスクロース培地では生産されないか、生産量が少ないことから感染特異的酵素として扱うことができる。酵素の生産性は酵素の種類によって異なり、プロテアーゼやキチナーゼは培養3日後にピークに達するのに対し、*N*-アセチルグルコサミニダーゼは培養5日後でも増加を続けた。

*P. tenuipes* の生産するエステラーゼの生産性を調べた結果、コロイダルキチン、サナギ粉を炭素源とした培地では、酵素を生産し始める時間が2日後と早かったが培養5日後も生産の増加が見られた。スクロース、グルコースを炭素源とした培地では、生産開始は遅かったが、5日後にはコロイダルキチン、サナギ粉を炭素源とした培地とほぼ同程度の生産性を示した。この結果は、プロテアーゼ、キチナーゼおよび *N*-アセチルグルコサミニダーゼとは明らかに異なっていた。また、triacylglycerolである trilaurin および tricaprylin においてはエステラーゼの生産性は低く、また培養液の変化が少ないことから *P. tenuipes* はこれらの triacylglycerol を資化していない可能性がある。

培養液のエステラーゼを精製したところ、DEAE Bio-Gel Agarose による陰イオン交換クロマトグラフィーによって2つの活性画分に分離された。しかし、これらはゲルろ過によってほぼ同じ位置に溶出されること、SDS-PAGEゲルにおいて同じ位置に活性染色バンドが確認されること、基質特異性および阻害剤、活性化剤に対する挙動が一致を示したことからアイソザイムであると考えられる。

一般的にはエステル結合を加水分解する酵素すべてをエステラーゼと総称する。組織化学的に証明できるエステラーゼを、基質特異性のあまりない非特異性エステラーゼ (non-specific-esterase) と、基質特異性を有する特異性エステラーゼ (specific-esterase) とに大別する。前者は酵素作用を抑制する E-600, DFP, PCMB などによる作用の違いにより、arylesterase, carboxylesterase, acetylesterase に分類し、後者は基質特異性によりリパーゼ (lipase), acetylcholin esterase, cholinesterase とに分類される<sup>7,14)</sup>。

<i>Paecilomyces tenuipes</i>	1	APLISS	YTTIINARGTTCPQG	20
<i>Monilinia fructicola</i>	35		TVTFEARGTT	43
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	35		TVTFEARGTT	43
<i>Cryptococcus sp.</i>	43		YVLIINIRGTGEPQG	56

Fig. 4 Comparison of N-terminal amino acid sequences of enzyme (P-1) from *P. tenuipes* with other cutinases.

活性測定に *p*-nitrophenyl ester を基質とする比色法を用いるとエステラーゼとリパーゼの識別ができない。このことから、Triglyceride G Test Wako を用いて本酵素を測定したところ、monoacylglycerol, triacylglycerol に対しては活性が全く認められず、本精製酵素はリパーゼではなく非特異性エステラーゼと考えられた。

そこで、本酵素が arylesterase, carboxylesterase, acetylesterase のいずれに相当するかを明らかにするために、阻害剤と活性化剤の作用を調べた。その結果、Table 2 に示したように、本酵素は 10  $\mu$ M E-600 によって 80% 阻害され、1 mM CuSO<sub>4</sub>, 1 mM PCMB による阻害は僅かであることから、acetylesterase ではなく、また arylesterase よりも carboxylesterase に近いと考えられる。システインによっては、10% 程度の活性化がみられた。

P-1 をプロテインシーケンサーで分析した結果、N 末端アミノ酸配列は APLISSYTTIINARGTTCPQG であった。さらにこの配列と相同性のあるタンパク質をデータベースで検索<sup>15)</sup>したところ、Fig. 4 に示すように *Monilinia fructicola*, *Botryotinia fuckeliana* の生産する cutinase, *Cryptococcus sp.* の生産する cutinase 様のタンパク質と相同性を示した。

*Fusarium solani* の生産する cutinase の  $K_m$  値は *p*-nitrophenyl 誘導体の脂肪酸部分の炭素数が 2 個の場合、最も大きい値となり基質への親和性が小さい。それ以上鎖長が長くなるとほぼ同等の  $K_m$  値で値は小さくなり、親和性は大きくなることが報告<sup>16)</sup>されている。また、*Pseudomonas putida* の生産する cutinase の  $K_m$  値は鎖長が長くなるにつれて大きくなるという報告<sup>17)</sup>もある。本酵素 P-1 の  $K_m$  値は Table 3 に示すように、脂肪酸部分の炭素数が 2 個の *p*-nitrophenyl acetate で最も値が大きく、鎖長が長くなるにつれて値は小さくなったことから、本酵素は *Fusarium solani* の生産する cutinase と類似していた。基質特異性においては、Table 4 に示すように *p*-nitrophenyl hexanoate に対して最も高い活性を示し、次いで *p*-nitrophenyl butyrate, *p*-

nitrophenyl octanoate でこれよりも鎖長が短くても長くても活性は大きく減少した。

cutinase は果実表皮等のワックス成分であるクチンを分解する酵素である。クチンは植物のクチクラを形成し、表面の保護に役立つと考えられる脂状、ロウ状の物質で、単一な物質ではなく、不飽和度の高い脂肪酸類とそのエステル化物である。一方、昆虫では、クチクラは外表から順に上クチクラ、内クチクラ、内クチクラの 3 つの層が区別され、この内方に下クチクラの見られるものもある。上クチクラはロウのほかポリフェノール、クチクリン（基本的には薄いロウセメント層とクチクリン層からなる）などからなるが、植物のクチクラと同様、水分蒸散や生体防御を担っている<sup>18)</sup>。

*P. tenuipes* から精製された酵素が、リパーゼではなく植物のクチクラを形成するクチンを分解する酵素、クチナーゼと高い相同性を示したことから、得られた酵素は昆虫細胞表層の植物クチン類似物質に働いているものと考えられる。そこで、P-1 を用いてカイコサナギの水不溶画分やメタノール抽出画分に作用させ、分解物を ESI-MS を使用して分析を試みているが、現在まで本酵素の真の基質を明らかにするまでに至っていない。

本研究は、農学ハイテク・リサーチ・センターの「微生物の機能を利用した環境制御」の課題研究の一環として行われた。

## 引用文献

- 1) 深津武馬(1999)冬虫夏草と昆虫共生微生物—内部共生の進化と起源への洞察。日菌報, 40: 33-41.
- 2) Yokoyama, E., K. Yamagishi and A. Hara (2003) Structures of the Mating-Type Loci of *Cordyceps takaomontana*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 5019-5022.
- 3) Kawachi, I., T. Fujieda, K. Yamagishi, H. Sato and A. Hara (2001) Purification and Properties of Extracellular Chitinases from the Parasitic Fungus *Isaria japonica*. J. Biosci.



- Bioeng. **92** : 544-549.
- 4) Hara, A., M. Tomita, R. Misaki, M. Hattori, H. Sato, E. Yokoyama and M. Ujita (2003) Purification and Properties of Extracellular *N*-Acetylglucosaminidases from *Paecilomyces tenuipes*. キチン・キトサン研究, **9** : 1-10.
- 5) 滝口泰之 (1988) コロイド状キチンの調製 最後のバイオマスキチン, キトサン, 技法堂出版, p. 13.
- 6) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227** : 680-685.
- 7) Pearse, A. G. E. (1972) *Histochemistry, Theoretical and Applied*. 3rd ed., Vol. 2, p. 796.
- 8) 岡田雅人・宮崎香 (2002) 改訂タンパク質実験ノート (下). 羊土社.
- 9) 名取俊二・野本亀久雄・吉田恵美子・村松繁 (1992) 無脊椎動物の生体防御. 学会出版センター, p. 121-123.
- 10) 小原嘉明 (1995) 昆虫生物学. 朝倉書店, p. 87-88
- 11) 本田計一・本田洋・田村貞洋 (1999) 環境昆虫学. 東京大学出版, p. 220.
- 12) 松香光夫・大野正男・北野日出男・後閑暢夫・松本忠雄 (1992) 昆虫の生物学. 玉川大学出版部, p. 53-55.
- 13) Huber, J. (1958) *Archivfur Mikrobiologie*. Bd. **29**, S : 257-276.
- 14) 武内忠雄・小川和朗編 (1985) 新酵素組織化学. 朝倉書店, p. 225-229.
- 15) BLAST Search <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- 16) Purdy, R. E. and P.E.Kolattukudy (1975) Hydrolysis of Plant Cuticle by Plant Pathogens. Properties of Cutinase I, Cutinase II, and a Nonspecific Esterase Isolated from *Fusarium solani pisi*. *Biochem.* **14**(13) : 2832-2840.
- 17) Sebastian, J. and P. E. Kolattukudy (1988) Purification and Characterization of Cutinase from a Fluorescent *Pseudomonas putida* Bacterial Strain Isolated from Phyllosphere. *Arch. Biochem. Biophys.* **263**(1) : 77-85.
- 18) 山田常雄・前川文夫ら編 (1960) 生物学辞典. 岩波書店, p. 310-311.