

Rhizopus Delemar 中の生理活性物質の精製

児玉 裕敬*, 岩佐 千佐*, 瀬戸 勝男**, 牛越 郁夫***

(高知医大・化学*, 第一生理学教室**, 牛越生理学研究所***)

Purification of Physiologically Active Substance from Rhizopus Delemar

Hiroyuki KODAMA**, Chisa IWASA*, Katsuo SETO** and Ikuo USHIKOSHI***

*Departments of Chemistry and **first physiology, Kochi Medical School, Nankoku-shi ;

***Ushikoshi Research Institute for physiology, Sakura, Chiba

Abstract. The physiologically active substance produced by *Rhizopus delemar* was partially purified by several kinds of column chromatography.

The substance was eluted from a gel filtration column at a position corresponding to a molecular size of about 2.3 KDa which composed of about 25 amino acid residues. The rates of ^{14}C transfer from ^{14}C -1-acetate into estrogen were accelerated by the administration of the substance, and increased with the purification of the substance. PR Unit of the substance purified by HPLC was 312.5.

緒 言

Rhizopus (くものすかび) 属を用いた醸酵生産物は動物実験の結果, 家畜の成育・産卵・肉質・乳質の向上に有効であり, 鶏の睾丸発育因子を生産することを確認していた。その後の研究で, *Rhizopus* 属の生産する生理活性物質は体内に存在し, 培養液中には殆ど放出されない。即ち, 菌体成分として存在し, 有機溶剤不溶性部分で水溶性であり, 菌体の水溶液を蛋白沈澱剤・イオン交換樹脂等で処理すると蛋白質の画分に存在することが明らかとなった¹⁾。また本物質は第二次性徴期後から睾丸の発育・精子の形成を促進し, また本物質を投与した動物の精巣・卵巣のスライスやそのホモジェネートでは ^{14}C -1-酢酸からのエストロゲン, プロゲステロン, テストステロンへの ^{14}C の取り込みが増加し, またこの取り込みは投与量に比例して増加し, ある一定量に達すると一定となり, 増加しなくなる^{2~6)}こと等が明らかにされていた。

本実験では *Rhizopus delemar* に存在する生理活性物質を高速液体クロマトグラフィーを用いて更に精製し、その物理化学的性質について調べた。

材料と方法

Rhizopus delemar の培養：

Rhizopus delemar を麦芽寒天培地のスラントに接種後 4 日間 27°C にて培養する。そのスラント 1 本分を 200ml 殺菌水にサスペンドする。そのサスペンドを、フスマ(2)：大麦(1)：水(1)の比率で混合し、アルミ容器に入れ、高压殺菌した培地に接種する。これを 4 日間 27°C にて培養する。培養後、50°C で 2 日間乾燥し種菌とする。

フスマ(5)：大麦粉(4)：水(6)の比率で混合し、よく攪拌した後、100°C の生蒸気で 1 時間加熱滅菌後、冷却し、モロブタに入れて大量培養の培地とする。これに種菌を接種後、培養室に入れ、24°C で 4 日間培養する。

生理活性物質の抽出と精製：

培養した *Rhizopus delemar* の粉末 3 g を 30ml の蒸留水に懸濁し、ウォーターバスの中で 60°C、30 分間振盪した。その懸濁液を 3,500 r. p. m で 15 分間遠心し、その上清を苛性ソーダ溶液で pH7.0 に調整し、これにエーテルを加えて振盪混和した後、水層を 3～5 ml に減圧濃縮する。その濃縮液を Sephadex G-25 (3×50cm) にかけて、蒸留水で溶出し、2.5ml ずつをフラクションコレクターで集め、それぞれのフラクションについてビュレット反応を行い、その陽性部分を集めて減圧濃縮した。

この濃縮液を Pyridine : AcOH : Propanol : H₂O (20 : 3 : 15 : 12, v/v) で平衡化した CM Sephadex C-25 のカラムにかけて、同溶液で溶出した。溶出液は 3 ml ずつ集め、それぞれのフラクションについて蛋白質の定量を Lowry の方法により行い、その陽性部分を集め、減圧下に濃縮した。

その残査を一定量の蒸留水に溶解し、0.1% TFA の水溶液で平衡化した Chemcosorb 300-7C18-L (4.6×250mm) のカラムにかけて、0.1% TFA を含む 2-propanol : CH₃CN (7 : 3 v/v) で linear gradient により、高速液体クロマトグラフィーにより生理活性物質を溶出した。生理活性物質は 215nm で測定した。分子量は TSK G3000sw を用いて行った。

生理活性物質の活性の測定は¹⁴C-1-酢酸よりの¹⁴C のエストロゲン分画への取り込みにより測定した。^{7, 8)}

結果と考察

雌ウサギおよび雌ダイコクネズミを用いて *Rhizopus delemar* の菌体抽出物の投与が卵巣ステロイドの生成に対して種々の作用をおよぼしていること、また雄ダイコクネズミに本菌体抽出物の静脈内投与が精巣におけるステロイドホルモンの生成を促進すること等がわかっている。⁹⁾

この菌体抽出物中のあるポリペプチドがステロイドホルモンの生成に有効であることが明らかになってきたが、本実験でその生理活性物質を精製し、その物理化学的性質を調べた。

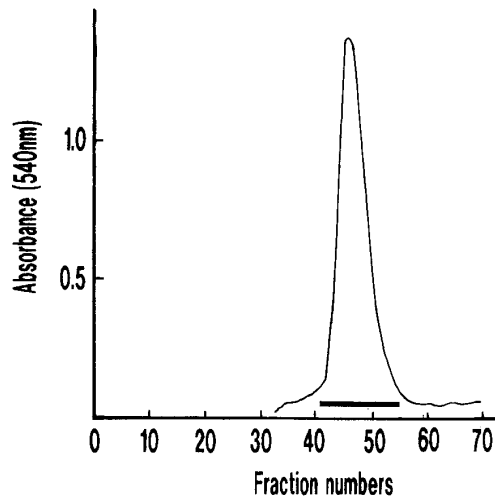


Fig.1. Sephadex G-25 column chromatography of the extract from *Rhizopus delemar*, Sephadex G-25 (3×25cm) equilibrated with water, Elution volume of a fraction was 2.5ml, Fractions were pooled as indicated by bar.

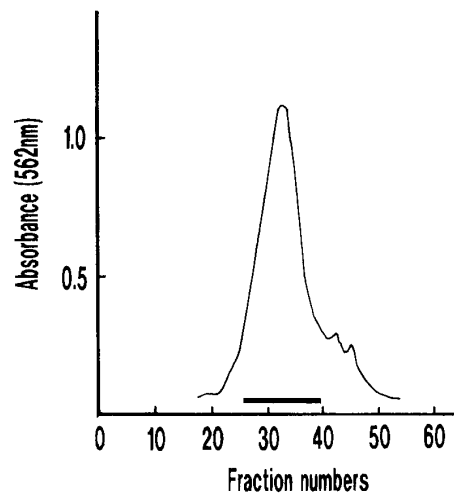


Fig.2. CM Sephadex C-25 column chromatography of physiological active substance obtained by Sephadex G-25 column chromatography.

CM Sephadex C-25 column (3×50cm) equilibrated with pyridine: AcOH: 1-propanol: H₂O (20:3:15:12v/v) Elution volume of fraction was 3.0ml, Fraction were pooled as indicated by bar.

Rhizopus 菌体抽出物を Sephadex G-25 による gel filtration の各々のフラクションをビュレット反応により測定すると、Fig. 1 に示すように一つのピークとして検出された。Fig. 1 のピークのバーで示した部分を集め、その一定量をラットに投与し、¹⁴C-1-酢酸の¹⁴Cのエストロゲンへの取り込みを調べてみると、その濃度に比例してエストロゲンへの¹⁴Cの取り込みは増加した。この結果はフラクション中に生理活性物質が含まれていることを示している。(Table 1-(1)) このフラクション中の生理活性物質を、更に精製するために、Pyridine: AcOH: Propanol: H₂O (20: 3: 15: 12v/v) で平衡化した CM Sephadex C-25 のイオン交換樹脂にかけ、同様の溶液で溶出し、それぞれのフラクションについて蛋白質の定量をすると、Fig. 2 に示すような結果が得られた。

Fig. 2 のバーで示した部分を集め、その濃度の違いによる¹⁴C-1-酢酸の¹⁴C エストロゲンへの取り込みを調べると、その取り込みはその濃度に比例して増加した。(Table 1-(2))そこで、Fig. 2 のバーで示した部分を集め、濃縮し、その残査を一定量の蒸留水に溶解し、その一定量を0.1% TFA の水溶液で平衡化した Chemcosorb 300-7C18-L を用いて、0.1% TFA を含む 2-propanol: CH₃CN (70: 30v/v) で linear gradient で高速液体クロマトグラフィーにより、生

Rhizopus delemar の水抽出物の Sephadex G-25, CM Sephadex C-25 と HPLC による精製分画の PR (Preparation of Rhizopus: PR) 単位の測定

(1) Sephadex G-25

投与蛋白量 (g)	¹⁴ C-1-酢酸のエストロ デンへの取り込み (dpm)	対照との比	対数値	PR 単位	PR 単位/g
対照	71±2	—	—	—	—
1.53	85±6	1.20	0.0792	7.9	5.2
3.05	108±4	1.52	0.1818	18.2	6.0
6.10	170±4	2.39	0.3784	37.8	6.2
				平均	5.8

(2) CM Sephadex C-25

投与蛋白量 (g)	¹⁴ C-1-酢酸のエストロ デンへの取り込み (dpm)	対照との比	対数値	PR 単位	PR 単位/g
対照	70±2	—	—	—	—
0.76	81±5	1.16	0.0645	6.5	8.6
1.51	98±3	1.40	0.1461	14.6	9.7
3.02	141±5	2.01	0.3032	30.3	10.0
				平均	9.4

(3) HPLC

投与蛋白量 (g)	¹⁴ C-1-酢酸のエストロ デンへの取り込み (dpm)	対照との比	対数値	PR 単位	PR 単位/g
対照	62±3	—	—	—	—
0.044	85±4	1.37	0.1367	13.7	311.4
0.088	117±6	1.89	0.2765	27.7	314.8
0.176	219±11	3.53	0.5478	54.8	311.4
				平均	312.5

PR 単位は, KAWAKAMI らおよび KIMURA らの方法に従い発情前期の雌ラット (体重200g) を用い午前10時に下垂体および副腎を摘出し午後2時に検定物質を脳室内に投与し30分後に卵巣を採取し INVITRO での¹⁴C-1-酢酸よりの¹⁴C の Estrogen 分画への取り込みを測定し PR 単位を求めた。

理活性物質の精製を行った。ペプチド結合を215nmでモニターした結果が Fig. 3 に示されている。

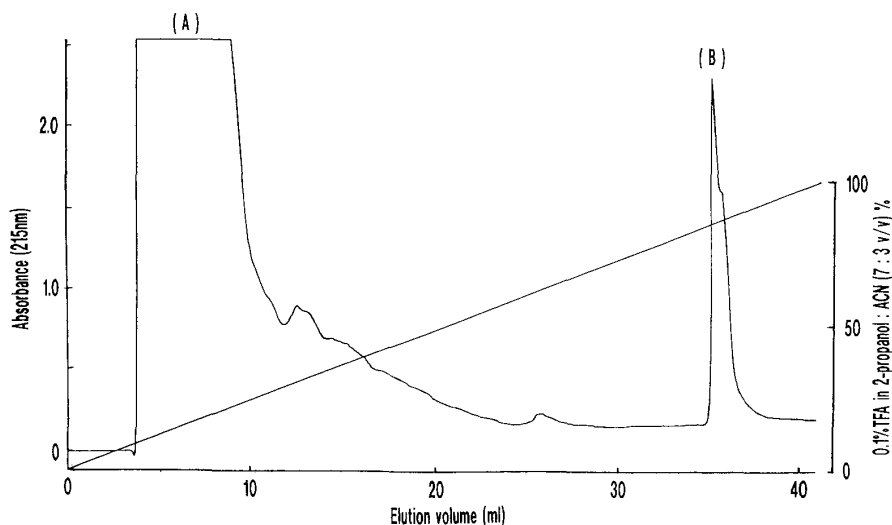


Fig.3. Chemcosorb 300-7C 18-(L) column chromatography of physiological active substance separated by Sephadex G-25 and CM Sephadex C-25 column chromatography. Physiological active substance adsorbed on a chemcosorb 300-7C 18(L) column which had been equilibrated with 0.1% TFA in H₂O were eluted with a linear gradient of 0.1% TFA in 2-propanol : CH₃CN (7:3v/v), from 0 to 100% in 60min.

ピーク(A)はサンプル中のピリジンに由来する吸収で、ピーク(B)の吸収がペプチド結合に由来する物質のピークである。そこでピーク(B)の部分を集め濃縮し、このピークの¹⁴C-1-酢酸の¹⁴Cのエストロゲンへの取り込みを調べると、Table 1-(3)に示すように、投与量に比例して、その

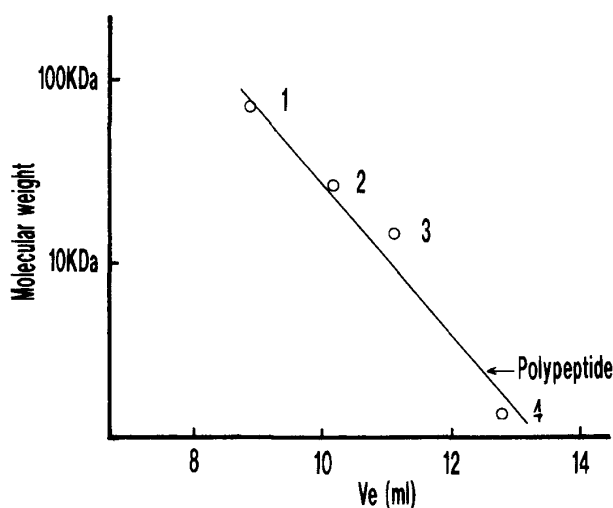


Fig.4. Estimation of the molecular weight of physiological active substance on TSK G300SW using high-performance liquid chromatography. The numbers indicate the following standards 1, bovine serum albumin (67,000); 2, chymotrypsinogen A (25,000); 3, ribonuclease (13,700); i, vit₁₂ (1,350).

Amino acid composition of physiological active substance isolated using HPLC

Amino acids	Experimental (nmol)	
	(a)	(b)
Asp + Asn	1.86	(1)
Thr	3.90	(2)
Ser	17.32	(8)
GLU + Gln	4.20	(2)
Gly	11.18	(5)
Ala	5.53	(3)
Val	2.32	(1)
Leu	1.94	(1)
His	2.39	(1)
Total	235.76	(25)

(a) Determined by amino acid analysis (nmol).

(b) This value indicates the estimated value of the respective amino acid when the total amount is taken to be 25.

活性は増加した。また Sephadex-G-25 での平均 PR 単位は $5.8/\mu\text{g}$, CM-Sephadex-C-25 では $9.4/\mu\text{g}$ で Sephadex G-25 よりも約 2 倍に生理活性は上昇していた。HPLC による Chemcosorb 300-7C18-L では $312.5/\mu\text{g}$ で Sephadex-C-25 よりも約 30 倍にその活性が上昇し、HPLC によりこの生理活性物質が効果的に精製されることを示している。HPLC による精製でも尚少量の不純物が混入していることを示しているが、このステップでのこの物質のアミノ酸組成と分子量を調べた。

TSK G3000sw による分子量の測定では約 2,300 と計算される。またアミノ酸組成では Ser と Gly を多く含むポリペプチドと考えられる。しかし、まだこの物質は完全に純品として精製されていないので、今後、この生理活性物質を純粋に精製し、アミノ酸組成及びその配列を決定する予定である。

文 献

1. 牛越郁夫, 特許公報, 特許出願公告昭和45-12754 (1970).
2. 瀬戸勝男, 関口道子, 貴邑富久子, 川上正澄, 斉藤英郎, 菊地明江, 横浜医学21(4), 399-412 (1970).
3. 小嶋尚夫, 瀬戸勝男, 斉藤英郎, 樋口隆, 林玲子, 安藤慎太郎, 川上正澄, 医学と生物学100(5), 225-227 (1980).
4. 北村昌子, 牛越淳夫, 牛越設男, 牛越建治, 牛越郁夫, 医学と生物学107(6), 357-359 (1983).
5. 田部昌子, 堀内千鶴, 牛越淳夫, 牛越設男, 牛越建治, 瀬戸勝男, 医学と生物学109(5), 275-277 (1984).
6. 大利文乃, 大庭千佐, 牛越淳夫, 牛越設男, 牛越郁夫, 貴邑富久子, 瀬戸勝男, 児玉裕敬, 医学

- と生物学116(1), 37-39 (1988).
7. Kimura, F., Ishida, S., Seto, K. and Kawakami, M., *Endokrinologie* 67 (2), 172-183 (1976).
 8. Kawakami, M., Kubo, k., Uemura, T., Nagase, M. and Hayashi, R., *Endocrinology* 109(1), 136-145 (1981).
 9. Saito, H., Kaba, H., Ohri, J., Tanaka, K., Seto, K., Kimura, F., Kodama, H., Ushikoshi, I., Kawakami, M. and Roberts, S., "Pheromons and Reproduction" (Sagara et al. eds), 189-225, The Parthenon Publishing Group, Lancs, England and New Jersey, U. S. A., 1990.

(1992年 9 月 8 日受理)