

①

各種白癬菌の産生する細胞外及び
膜結合ケラチナーゼの比較検討

千葉純子

岩手医科大学医学部、皮膚科学講座

(主任：昆 宰市教授)

Comparative Study of Extracellular
and Membrane-bound Keratinases Produced
by Three Species of Dermatophytes.

Junko CHIBA

Department of Dermatology, School of
Medicine, Iwate Medical University,
Morioka, Japan (Prof. S. KON)

key words: Dermatophytes,

Extracellular keratinase,

Membrane-bound keratinase,

Intracellular keratinase

I . 緒 言

ケラチナーゼという言葉は、ケラチンを溶解する化学物質にたいして用いられており、今日では、各種の真菌が病原性に関与すると思われるプロテアーゼを産生しているとの報告がある。

ケラチンを溶解する物質の存在については、最初、Novalら¹⁾がこの物質をケラチナーゼとしてとらえ、*Streptomyces fradiae*が産生する、Woolを分解する酵素の存在を証明した報告¹⁾に始まる。白癬菌のケラチナーゼについては、その後、Yuら²⁻⁶⁾により、*Trichophyton mentagrophytes*の産生するケラチナーゼが、モルモットの毛を分解する強力な酵素活性を示すことが明かにされ、その研究が確立された。現在、ケラチナーゼという名称は真菌の産生する酵素を指すのが一般的となっている⁷⁻¹¹⁾。

白癬菌のケラチナーゼについては、すでに諸家により報告され、一部精製されたものもある¹²⁾。また、電顕を用いた酵素抗体法で、ヒト角層内の菌糸周囲及び菌の細胞膜とこれに接する

角質細胞にその局在が証明されており¹³⁻¹⁵⁾、ケラチナーゼが病態に重要な役割を果たしている事は疑いを得ない。しかしながら、現在までのケラチナーゼに関する研究は細胞外ケラチナーゼに限られており、しかも、詳しい酵素学的特徴、即ち基質特異性やインヒビター感受性に関する知見は依然乏しい。特に、膜結合ケラチナーゼ活性についてはほとんど研究が進んでいないのが現状である。

今回、著者は、白癬菌の中でも分離頻度の高い *Trichophyton mentagrophytes* (以下 *T. mentagrophytes* と略す)、*Trichophyton rubrum* (以下 *T. rubrum* と略す)、*Microsporum canis* (以下 *M. canis* と略す) の3種について、まずその産生する全ての細胞外ケラチナーゼ活性の分離同定を試みると共に、膜結合ケラチナーゼについても検討を加え、これらの詳しい酵素学的性質や菌種間の違いを明かにしようとした。

II . 材 料 及 び 方 法

1 . 使 用 白 癬 菌 株

臨 床 症 状 から 白 癬 と 診 断 し た 患 者 より 得 ら れ た 鱗 屑 を、 ア ル コ ー ル で 洗 浄 後 サ ブ ロ ー 寒 天 培 地 に 接 種 し、 巨 大 培 養 を 得 て、 集 落 の 形 態 や 色 調 を 観 察 し た。 さ ら に、 ス ラ イ ド カ ル チ ャ ー を 行 い、 菌 糸 や 分 生 子 の 形 状 に よ っ て 菌 種 を 同 定 し、 3 種 の 白 癬 菌、 *T. mentagrophytes* (No. 85H059 株)、 *T. rubrum* (No. 87A018 株)、 *M. canis* (No. 87A078 株) を 用 い た。

2 . 白 癬 菌 の 培 養 方 法

T. mentagrophytes、 *T. rubrum*、 *M. canis* そ れ ぞ れ の 菌 株 を サ ブ ロ ー 寒 天 培 地 に 接 種 し、 3 週 間 増 菌 後 液 体 培 地^{11, 12)} [ヒ ト 毛 髪 2.5 g、 グ ル コ ー ス 0.9 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 g、 thiamin 0.01 g、 pyridoxine 0.05 g、 inositol 0.05 g + 28 mM phosphate buffer (pH 7.8) / 1 L] で、 25 °C、 2 週 間 振 盪 培 養^{2, 11)} し た。 ヒ ト 毛 髪 は、 メ タ ノ ー ル、 PBS、 ク ロ ロ ホ ル ム に て そ れ ぞ れ 数 回 洗 浄 後、 37 °C で 乾 燥 さ せ た も の を 用 い た。

3. ケラチナーゼの抽出と分画

1) 至適 Triton X-100 濃度の決定

菌要素からの膜結合および細胞内ケラチナーゼの抽出には、Triton-X 100 溶液を用いた。Triton-X 100 の至適濃度の決定のために、0.1 %、0.5 %、1.0 % の各濃度の Triton-X 100 (コントロールとして PBS) と培養液を除いた後の菌要素を、室温で 30 分間反応させ、濾過後、keratin-agarose plate (後述) によりケラチナーゼ活性の測定を行った。

2) ケラチナーゼの抽出方法

液体培地による培養後、ガーゼで濾過して得られた濾過液を細胞外ケラチナーゼ (F-I) とした。その残査に、0.5 % Triton X-100 を加えて室温、30 分間振盪後の濾過液を膜結合ケラチナーゼ (F-II) とし、さらに、4 °C、14 時間振盪後の濾過液を細胞内ケラチナーゼ (F-III) とした。それぞれの抽出液は 0.45 μ m ミリポア膜を用いて濾過し、以下の実験に用いた。

3) ケラチナーゼの分画

F-I、F-II、F-III分画の抽出液を5~7 mlに濃縮後、DEAE-Sephacryl S-200カラムを用い、DEAEに対する親和性の違いから、DEAE吸着分画（以下 ad と略す）および非吸着分画（以下 nonad略す）に分画した。さらに、それぞれを3 mlに濃縮した後、吸着分画はPBS、非吸着分画は20 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 1 M KCl + 0.1 % Triton X-100をbufferとしてSephacryl S-200によるゲルクロマトグラフィーを行った。

4. ケラチナーゼ活性の測定

1) 至適 pH の決定

F-Iに含まれるケラチナーゼの至適 pH を決定するために、pH 3~10までの8種類のbuffer [0.1 M glycine-HCl (pH 3.0)、0.1 M acetate (pH 4.0、5.0)、0.1 M phosphate (pH 6.0、7.0)、0.1 M Tris-HCl (pH 8.0、9.0)、0.1 M Glycine-NaOH (pH 10.0)] を用いて、ヒト毛髪に対する分解活性を調べた。分解活性の測定は、毛髪 50 mg に、buffer 2 ml、サンプル 1 ml を加え、37 °C、14時間反応させた後、遠心し、その

上清について波長 280 nm で吸光度を測定した。

2) Keratin-agarose plate

Hibino¹⁶⁾の方法に基づいて keratin-agarose plate を作成し、ケラチンに対する分解活性を測定した。ケラチンの調整のため、足底からメスで削除して得られたヒト表皮角質層を 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) + 0.14 M NaCl でホモジェナイズし、遠心を行い沈澱を得た。この沈澱を、8 M Urea + 25 mM 2-β-メルカプトエタノール (以下 2 ME と略す) + 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) で溶解し、37 °C で 3 時間 覚伴した後、12000 回転で 20 間分遠心し、上清を得た。得られた上清は、5 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 25 mM 2 ME 中で 24 時間透析を行なった。透析後、pH 5.0 に調節し、4 °C、10000 回転で 10 分間遠心して沈澱を得た。沈澱は、8 M Urea + 25 mM 2 ME + 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) 中で溶解した後、20 mM 2 ME + 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) で透析し、最後に 2 ME を含まない 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) で透析してケラチン溶液とした。得られたケラチン溶液にア

ガロース (54 °C) を加えて覚伴し、径 8.5 cm のガラスシャーレに 10 ml 分注し、keratin-agarose plate を作成した (7 mg/ml ケラチン + 0.6 % アガロース)。Keratin-agarose plate にサンプルを 20 μ l を静置し、37 °C で 18 時間酵素反応を行わせた。10 x 10 mm の溶解面積を示したものを 1 Unit とした。

3) Azocoll

変性 I 型コラーゲンに対する分解活性を Azocoll を用いて測定した^{12, 17)}。0.1 mM Tris-HCl (pH 7.8) + 0.1 mM CaCl₂ を用いて、5 mg/ml の Azocoll 浮遊液を作製した。Azocoll 浮遊液 0.45 ml に、サンプル 0.05 ml を加え、37 °C にて反応させ、12000 回転で 10 分間遠心後、上清を 150 μ l、96 穴平底プレート (NUNC) に分注し、Bio Rad EIA READER を用い、波長 492 nm で吸光度 (OD) を測定した。

上記の系で、1 時間に 0.1 OD の上昇を示す活性を 1 Unit とした

4) 合成発色基質

アミノ酸に対しての基質特異性を、Ile-Pro-Arg-p-nitroanilide (pNA) (S-2288)、Glu-Pro-Arg-pNA (S-2444)、Phe-Pip-Arg-pNA (S-2302)、Val-Leu-Arg-pNA (S-2266)、Val-Leu-Lys-pNA (S-2251)、Arg-Pro-Tyr-pNA (S-2586)、Glu-Pro-Val-pNA (S-2484) を用いて測定した。96穴平底プレートに buffer (0.1 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 1 mM CaCl₂) 70 μ l、サンプル 20 μ l、2 mM の基質 10 μ l を加えて、37 $^{\circ}$ C、30 分間反応させ、30% 酢酸 10 μ l を加えて反応を止めた後に、Bio Rad EIA READER を用い波長 405 nm で吸光度を測定した。

1 分間に 1 nmol の p-nitroaniline を遊離する酵素活性 ($A_{405} = 0.0105$) を 1 mUnit とした。

5. Km 値の比較

各ケラチナーゼ分画の S-2585 に対する Km 値を Lineweaver-Burk の方法¹⁸⁾により求めた。上記の測定系で基質濃度 0.4、0.6、0.8、1.0 および 2.0 mM を用いた。また、基質濃度 1 mM を用いた時のケラチナーゼ活性の 25% を阻害するキモス

タチン量を加え、同法により K_i 値も決定した。

6. 蛋白濃度

蛋白濃度は牛血清アルブミンをスタンダードとし、Lowry法¹⁹⁾で決定した。

7. ケラチナーゼのインヒビター感受性

10 mM diisopropyl fluorophosphate (DFP)、10 mM ヨード酢酸 (IAA)、10 mM EDTA、50 μ g/ml aprotinin、100 μ g/ml soybean trypsin inhibitor (SBTI)、20 μ g/ml antipain、20 μ g/ml leupeptin、20 μ g/ml chymostatin、20 μ g/ml pepstatin に対するインヒビター感受性を測定した。96穴平底プレートに、buffer 0.1 M Tris-HCl + 1 mM CaCl_2 を 50 μ l、サンプルを 20 μ l (コントロールとして H_2O)、インヒビターを 20 μ l 加え、37 $^\circ\text{C}$ 、15分間反応させた後に、1 mM S-2586 を 10 μ l 加えて酵素反応を開始させた。30% 酢酸で反応を止めた後に、残存酵素活性を、波長 405 nm で吸光度を測定した。

また、ケラチナーゼの活性に及ぼす Ca^{++} の影響を明らかにするために、T. mentagrophytes、

T. rubrum, M. canis について、F-Inonad の分子
量 3 万 8 千 (L) (結果参照) の酵素分画につい
て、Ca⁺⁺ 存在下および非存在下で各種インヒビ
ターに対する感受性を検討した。

Ⅲ . 結 果

1 . 至 適 Triton X-100 濃 度 の 決 定

Table 1に各濃度の Triton X-100存在下で、菌体から抽出されるケラチナーゼ活性を示す。

Triton X-100はいずれの濃度においてもコントロールのPBSよりも高いケラチナーゼの可溶化能力を示したが、最大の活性は0.5%で得られた。以後の実験では、0.5%のTriton X-100を用いた。

2 . 至 適 pH の 決 定

ケラチン分解活性は酸性域では全く認められず、弱アルカリ側、pH 8.0に強い活性を示した (Table 2)。ただし、この方法は感度が劣ることと、大量の検体を扱うには不便なことから、以後のケラチナーゼ活性の測定にはkeratin-agarose plate、Azocoll^{12, 17)}および、ペプチド合成発色基質(S-2586)を用いた。

3 . 各 分 画 の ケ ラ チ ナ ー ゼ の 割 合

培養液500 ml中の総ケラチナーゼ活性は、*T. rubrum*で670 U、*T. mentagrophytes*で704 U、*M. canis*で590 Uであった。Table 3は、3種の白

黴菌それぞれの F-I、F-II、F-III に含まれるケラチナーゼ活性を比較した結果である。それぞれの比率は、F-I がいずれの菌種においても 70 %前後を占め、F-II、F-III はほぼ等しく、おおよそ 15 %前後の活性を占めていた。

4. ケラチナーゼの抽出と分画

1) F-I adでは (Figure 1)、*T. mentagrophytes*において、ケラチンの分解活性は分子量 3万 5千に最大活性を示したが、この他、void volume、分子量 7万そして 1万 7千にも活性のピークを認めた。Azocoll活性は、分子量約 7万および 3万 5千に活性のピークを認めた。

*T. rubrum*および *M. canis*においては、ケラチン分解活性、Azocoll分解活性、S-2586分解活性共に 3万 5千に一致して1つの大きな活性のピークを示し、*T. mentagrophytes*の様に複数のピークは認めなかった。

2) F-II adでは (Figure 2)、*T. mentagrophytes*において、void volume、分子量 7万、3万 5千～3万に、ほぼ同レベルのケラチン分解活性

が認められた。Azocoll分解活性は、分子量7万に小さなピークが認められたが、最大の活性は分子量6万～7万に存在した。S-2586分解活性は、Azocoll分解活性にほぼ一致して認められた。

T. rubrumでは、void volumeおよび3万5千にケラチン、Azocoll分解活性が認められ、S-2586分解活性は分子量3万5千に1つのピークを示した。

M. canisのケラチン分解活性はT. rubrumとほぼ同様の結果であった。

3) F-III adでは (Figure 3)、T. mentagrophytesにおいて、ケラチン分解活性は、分子量約3万に最大の活性、ピークを示し、Azocoll分解活性、S-2586分解活性は低いレベルにとどまった。F-I ad、F-II adと異なり、高分子領域での分解活性は認められなかった。

T. rubrumでは、ケラチン分解活性は、分子量6万～7万および3万5千にピークが認められた。Azocoll分解活性は分子量約7万に最大のピークを示したが、3万8千にもピークが認められた。S-2586分解活性は、3万5千に単一の活性ピーク

を示した。

*M. canis*では、F-I ad、F-II ad分画と同様にケラチン分解活性、Azocoll分解活性、S-2586分解活性共に一致して、分子量3万5千に1つの活性ピークを認めた。

4) F-I nonadでは (Figure 4)、

*T. mentagrophytes*において、主に、分子量2万1千と3万8千に高い活性を示した。通常、最大の活性は2万1千に認められた。この活性は、Azocoll活性、S-2586活性にほぼ一致した。しかし、void volumeに、S-2586に全く活性を示さないケラチン分解活性、Azocoll分解活性を認めた。

*T. rubrum*でも、ケラチン分解活性、S-2586分解活性共に、主たるピークは*T. mentagrophytes*と同様に分子量2万1千にあったが、3万8千にも活性ピークを認めた。また、void volumeにケラチンおよびAzocoll分解活性が存在した。

*M. canis*では、*T. mentagrophytes*、*T. rubrum*と異なり3万8千により高いケラチン分解活性、そしてAzocoll分解活性を示したが、このピークは

全く S-2586 に活性を示さなかった。また、2万1千にも活性ピークを認めしたが、このピークは、いずれの基質に対しても分解活性を持っていた。

T. rubrum、そして *M. canis* 共に、S-2586 の分解活性は、分子量2万1千に一致して最大のピークを示した。

5) F-II nonad では (Figure 5)、*T. mentagrophytes* において、ケラチン分解活性は、void volume と3万8千にピークを示し、Azocoll 分解活性は、3万8千および1万4千にピークが認められた。S-2586 分解活性は、分子量1万4千に最大のピークを示した。また、F-I nonad と同様に、S-2586 にはほとんど分解活性を示さない高分子領域の活性を認めた。

T. rubrum では、ケラチン分解活性は、分子量約7万そして3万8千にピークを認めた。Azocoll 分解活性は、分子量3万6千に小さなピークを認めたのみであった。S-2586 分解活性は、分子量3万5千分解活性を認めた。

M. canis では、ケラチンそして Azocoll 分解活

性は分子量3万8千に最大のピークを示したが、S-2586に対しては*T. rubrum*と同様約3万5千に活性のピークが認められた。

6) F-III nonadにおいては (Figure 6)、*T. mentagrophytes*では、ケラチン分解活性は分子量7万、3万8千、そして2万に活性を認めたが、最大の分解活性は、F-II nonad分画と同じく3万8千であった。Azocoll分解活性は、ほぼケラチン分解活性と一致して認められた。S-2586分解活性は、分子量約2万に認められた。

*T. rubrum*では、*T. mentagrophytes*と同様、分子量7万、3万8千、そして2万の3つのピークが存在し、Azocoll分解活性もこれにほぼ一致してピークを示した。また、S-2586分解活性は、*T. mentagrophytes*と同様約2万にピークを認めた。

*M. canis*では、ケラチン分解活性、Azocoll分解活性は、分子量3万8千に一つの大きなピークを示したが、S-2586分解活性は、やはり、*T. mentagrophytes*、*T. rubrum*と同様約2万に活性のピークが示された。

5. 合成発色基質

ペプチド合成発色基質を用いて各分画のケラチナーゼの基質特異性を調べた。

1) F-I adにおいて、高い活性を認めた分子量3万5千のケラチナーゼについて調べたところ、Figure 7に示すように *T. mentagrophytes* では、S-2586 (Arg-Pro-Tyr-pNA) を最も効率良く分解した。その他、-Arg、-Lys、-Valについては極めて低い活性にとどまった。この傾向は、*T. rubrum*、*M. canis*についても同様であり、F-I adの分子量3万5千のケラチナーゼは菌種に関係なく、3種すべてがキモトリプシン様の酵素の基質であるS-2586に最大の活性を示すことが明かとなった。

2) F-I nonadの分子量2万1千のケラチナーゼは、Figure 8に示すように、*T. mentagrophytes* ではad分画と同様に、S-2586に最も高い活性を示した。*T. rubrum*、*M. canis*についてもS-2586に最大の活性を示した。

3) その他のフラクション、F-II、F-IIIでの

S-2586に対する比率は低いレベルにとどまっております、F-Iに大部分のS-2586分解酵素が含まれていると考えられた。

6. K_m 値の比較

ペプチド合成発色基質の結果、F-I ad、F-I nonad共に極めて似かよった基質特異性を示している事が明かとなったが、これらが、さらに、酵素学的に同じものであるかどうか検討するためにS-2586に対する K_m 値の比較を行った。

Table 4に示すように、F-I adでは、

T. mentagrophytes、*T. rubrum*、*M. canis*の K_m 値はそれぞれ1.43 mM、0.56 mM、4.0 mMと異なった値を示し、これらのケラチナーゼのS-2586に対する親和性に違いがあることがわかった。また、*T. mentagrophytes*のF-I adの分子量7万のケラチナーゼ分画(L)、そして3万5千の分画(S)では、 K_m 値は1.25 mM、1.43 mMと極めて近い値を示しているものの、キモスタチンに対する K_i 値を比較してみると、(L)が2.7 mM、(S)が65 mMと大きく異なっていることが確認された。

一方、F-I nonad分画では、T.mentagrophytesにおいて、(L)が1.18 mM、(S)が2.9 mMとはつきりと異なった値を示したが、3種のF-I nonadのうち分子量2万1千のケラチナーゼは、S-2586に対してそれぞれ2.9 mM、2.9 mM、2.86 mMと、同一のKm値を持つことが示された。

7. インヒビター感受性

1) Figure 9に示すように、F-I adでは、T.mentagrophytesの分子量7万の分画(L)、およびT.rubrum、M.canisを含む3万5千の分画(S)のすべてが、DFPに特異的に阻害されたことから、これらは、セリン酵素であることが明かとなった。また、微生物起源のインヒビターでは、chymostatinが3万5千のF-I adのケラチナーゼを阻害した。これらは、やはり、3種の菌に共通しており、本ケラチナーゼはキモトリプシン様の性質を持つことがインヒビター感受性の面からも確認された。

T.mentagrophytes、F-I nonadは、分子量3万8千(L)と2万1千(S)の2つの明瞭なピークを示し

たので、(L)、(S)の2つの分画において阻害活性を調べた (Figure 10)。その結果、やはり、DFP、chymostatinに阻害されるが、F-I nonad (S)では、F-I nonad(L)に比べてより強く阻害を受けていることが特徴であった。また、F-I nonad(L)は、DFPで完全に抑制されなかった。F-II nonad、F-III nonad共にF-I nonadと同様にDFP、chymostatinに阻害されるが、このほか、SBTI、antipainにも若干阻害を受けた。

2) *T. rubrum*では、F-I nonad、F-III nonadは、DFP、chymostatinに特異的に阻害されるが、F-II nonadは、DFP、chymostatinによる阻害効果は弱く、EDTAにより強く抑制された。

3) *M. canis*では、分子量3万8千のF-I nonad (L)は、DFP、Chymostatinはほとんど阻害効果を示さず、EDTAのみが活性を抑制することが明らかとなった。その他の分画の分子量2万1千のケラチナーゼは、DFPおよびChymostatinが活性を強力に阻害した。F-III nonadでは、これらの阻害効果はF-I nonad、F-II nonadに比して弱い傾向が

認められた。

従って、nonad分画においてもまた3菌種のどの分画においても、主たる酵素はキモトリプシン様のセリン酵素であることがわかった。

4) しかしながら、多くの分画でEDTAに対する感受性を示すことが明かとなった。これらの分画(M. canis、F-I nonad(L))は、Table 5に示したように、Ca⁺⁺が添加されることによってEDTAによる抑制が無効となることが示された。

IV . 考案

著者は、各種白癬菌の中から、臨床面で分離される頻度の高い *T. mentagrophytes*、*T. rubrum*、*M. canis* の3種を選んで、これらの白癬菌の産生する細胞外、および膜結合ケラチナーゼの抽出・分離を行った。これら3菌種は、近年の藤井らの報告²⁰⁾によれば外来分離株の、それぞれ33.1%、58.1%、5.4%、全体で96.6%を占め、林らの報告²¹⁾でも3菌種で87.7%を占めている。我々の教室での過去2年間でのまとめでも、*T. mentagrophytes*が優位の傾向があるものの、3種で96.5%を占めていた。

ケラチナーゼの測定として、従来は、モルモットの毛³⁻⁶⁾、*Azocoll*¹³⁾が用いられてきた。しかし、皮膚糸状菌が寄生している場であるヒト表皮のケラチンを用いるのが最善であることは明かである。したがって、著者は、まず第一に、ヒト表皮ケラチンを基質として用い、これを分解するすべての酵素を分離することを目標とした。さらに、活性の測定に、

Azocoll、合成発色基質を加えることにより真菌の産生する蛋白分解酵素に対して総合的に検討しようとした。

細胞外ケラチナーゼについては、すでに多くの報告があり、確かに菌体周囲に存在するケラチンを分解し、栄養源としていることは疑いを得ないであろう。しかしながら、真菌症の感染の過程を考えると、恐らく膜結合ケラチナーゼが初期の侵入・局在に重要な意味をもっているのではないかと思われる。しかしながら、この膜結合ケラチナーゼについては、Yuら⁵⁾の報告に述べられているものの、これまで、その詳細についてはほとんどわかっていなかった。

著者は、細胞外ケラチナーゼと同時に、膜結合、細胞内ケラチナーゼについても詳しく検討することとし、まず、抽出条件、そして至適pHについての条件決定を行った。膜結合酵素の可溶化には、酵素活性を保持したまま可溶化出来ること、および、可溶化の効率が問題となるが、著者は、この点で、最も一般的に使用される頻

度の高い非イオン性界面活性剤である Triton X-100 を用いた。その結果、0.5% の Triton X-100 で、室温で30分反応させる条件が膜結合ケラチナーゼの可溶化に最も有効であることが明らかとなり、本研究ではこの濃度を用いた (Table 1)。また、同濃度で、4℃、14時間振盪し、菌体を破壊した後の上清を細胞内抽出液とした。さらに、至適 pH については、弱アルカリ側においてのみ活性が認められ、この点は、これまでの報告と類似していた (Table 2)。

3種白癬菌における各分画のケラチナーゼ活性の比率は、細胞外 (F-I) : 膜結合 (F-II) : 細胞内 (F-III) が、おおよそ 70 : 15 : 15 であった (Table 3)。細胞外のケラチナーゼが最も多かったが、膜結合ケラチナーゼが占める 15% という割合は、その限られた部位を考えると非常に高い活性を示していると考えられる。

本研究においては、ケラチナーゼの分子量についてゲル濾過を用いて検討したが、ケラチナーゼの分子量は、細胞外 DEAE 吸着分画 (F-I ad

) においては、3万5千が3種に共通しており (Figure 1)、細胞外非吸着分画 (F-I nonad) では、2万1千の分子量が全ての菌種において認められた (Figure 4)。この2つの分子種が菌種にかかわらず存在することから、恐らく、細胞外のケラチナーゼは、この2種がケラチン分解という作用の中心をなしていると思われる。

膜結合 DEAE 吸着分画 (F-II ad) ケラチナーゼは、*T. mentagrophytes* ではいくつものピークを認めるが、3種に共通して認められたものは void volume、分子量3万5千である (Figure 2)。これは、細胞外 DEAE 吸着分画 (F-I ad) ケラチナーゼと同一の分子量であり、恐らく同じ物ではないかと思われる。膜結合 DEAE 非吸着分画 (F-II nonad) ケラチナーゼでは、分子量約4万が共通していた (Figure 5)。細胞内 (F-III) では、吸着分画 (ad)、非吸着分画 (nonad) 共に3万~3万8千の分子量に主要なケラチナーゼ活性が認められた (Figure 6)。

これらを通じて特徴的なことは、*M. canis* がい

ずれの分画においてもほとんど単一のピークのケラチナーゼしか示さず、他の *T. mentagrophytes*、*T. rubrum* がいくつかのケラチナーゼのピークを示した事に比較して、際だった対称をなしていた。

3種に共通して高い活性を示す細胞外 DEAE 吸着分画 (F-I ad) の分画のケラチナーゼについて、合成発色基質を用い基質特異性の検討を行ったところ、Arg-Pro-Tyr-pNA (S-2586) に最も高い活性を示すことが明かとなった (figure 7)。しかも、この3万5千のケラチナーゼは、それぞれにおいて最大の活性を示す分画であった。又、細胞外 DEAE 非吸着分画 (F-I nonad) の2万1千のケラチナーゼにおいても、分子量が異なるものの S-2586 に最も高い活性を示した (Figure 8)。

それぞれの K_m 値を比較したところ、細胞外 DEAE 吸着分画 (F-I ad) の分画ケラチナーゼはそれぞれ異なった値を示したのに対し、細胞外 DEAE 非吸着分画 (F-I nonad) の分子量2万1千

(S) のケラチナーゼは 2.9 mM と全て一致していた (Table 4)。細胞外 DEAE 吸着分画 (F-I ad) の 3 菌種のケラチナーゼが、分子量が同じでも異なった K_m 値を示したことは、これら 3 種の酵素は似通ってはいるものの、それぞれの菌種に特有の酵素学的修飾を受けている可能性がある。

また、細胞外 DEAE 吸着分画の 3 万 5 千 [F-I ad(S)] と、細胞外 DEAE 非吸着分画の 2 万 1 千 [F-I nonad(S)] の酵素のインヒビター感受性試験では、全て DFP 及び chymostatin により最も効果的に阻害を受けることが明かとなった (Figure 9, 10)。このことは、基質特異性のみならずインヒビター感受性の面からもこれらのケラチナーゼがキモトリプシンに極めて似通った酵素であることを裏付けている。さらに、T. mentagrophytes では、分子量 7 万 (L) のダイマーと思われる部位にかなりのケラチナーゼが見いだされたが、S-2586 に対する K_m 値が異なること、chymostatin に対する K_i 値が (L) が

2.7 mM、(S) が 65.0 mM と数十倍も異なっていることから単純なダイマーとは考えにくい。

細胞外のケラチナーゼについては、Yuら²⁻⁵⁾が分子量4万8千で、芳香族アミノ酸であるフェニールアラニンおよびチロシン基質を分解する酵素を *T. mentagrophytes* から分離している。又、*T. rubrum* からは、Asahiら¹²⁾が4万4千と3万6千のフェニールアラニンに親和性が高く、かつ、Ca⁺⁺依存性の酵素を精製した。また、*M. canis* からは、Takiuchiら^{11, 22, 23)}が、分子量4万5千と4万8千のセリン酵素の阻害剤であるPMSFで阻害され、かつ、Ca⁺⁺依存性の酵素を分離した。この様に、3種の白癬菌からは、分子量や他の性質の類似したケラチナーゼの存在が報告されているが、著者は、3種を同時に、同一の方法で比較検討する事により、これらの白癬菌に存在する細胞外ケラチナーゼが、物理的に完全に同一でないまでもきわめて似通っている事を明らかにする事が出来た。

また、滝内ら^{13, 14)}は、*M. canis* から4万5千

のケラチナーゼを精製し、その抗体を産生し、*T. rubrum*、*T. mentagrophytes*にも交差をすると報告しているが、恐らくこの酵素は、本研究で明らかになった3つの菌種に共通する分子量3万5千か2万1千に関連したものであろう。

本研究で著者は、真菌の産生するケラチナーゼの大部分が、セリン酵素かつキモトリプシン様酵素であることを明らかにしたが、*T. rubrum*のF-II分画において、DFP、chymostatinに全く阻害されず、EDTAのみに阻害される酵素を見いだした。このことは、膜結合酵素の一部には、金属酵素が含まれることを意味しており (Table 5)、これまで全く報告に認められなかったメタルプロテアーゼが、真菌症に重要な関わりを持っている可能性がある。

Hibinoら²⁴⁾は、表皮抽出液中において、蛋白分解酵素の阻害物質のスクリーニングテストを行った。その中で、彼らは、トリプシン、プラスミノゲンアクチベーター、システイン酵素に対する少なくとも3種の阻害物質が表皮に

存在することを明らかにした。この中で、キモトリプシンに対する阻害物質は全く認められなかったことと、ケラチナーゼの主要なものがキモトリプシン様の酵素であったということから、表皮では本酵素が阻害されずに働き得るということを示唆している。また、同様に、メタルプロテアーゼに対する阻害物質もヒト表皮からは見つかっておらず、恐らく、真菌はこうした表皮の防御の弱点についてその感染を成立させ得るものと考えられる。

V . 結 語

3種白癬菌の分泌する細胞外ケラチナーゼの性質を明らかにすると共に、膜結合ケラチナーゼ、細胞内ケラチナーゼについても詳しい酵素学的な検討を加え、菌種間の違いについても比較検討を行った。その結果、次の知見及び結論が得られた。

1) 3種菌株より抽出した細胞外 (F-I)、膜結合 (F-II)、細胞内 (F-III) のケラチナーゼ活性は、ほぼ同様の比率を示し、それぞれ 70: 15: 15であった。

2) DEAE吸着分画のケラチナーゼは、主に分子量約3万5千と7万よりなり、DFP、chymostatinにより特異的に阻害を受け、S-2586に強い分解活性を持ち、キモトリプシンに良く似た性質を示した。

3) DEAE非吸着分画のケラチナーゼは、分子量約2万1千と3万8千よりなり、DFP、chymostatinに特異的に阻害され、酵素学的には吸着分画のケラチナーゼと良く似た、キモトリプシン様の

酵素であった。

4) 即ち、白癬菌の産生するケラチナーゼの大部分がキモトリプシン様酵素であることが明らかとなった。

5) しかしながら、非吸着分画の一部には、ケラチンとAzocollのみを分解し、S-2586には活性を示さない酵素の存在が認められた。これらは、DFP、Chymotrypsinに全く、もしくはほとんど阻害されず、EDTAのみに阻害され、更に、このEDTAの抑制効果は Ca^{++} 添加によって無効になることから、メタルプロテアーゼと考えられた。

6) 当教室のHibinoの研究で、表皮中にはキモトリプシンに対する阻害酵素は存在しないことが確認されている。白癬菌のケラチナーゼの主要なものがキモトリプシン様の酵素であったことという今回の結果から、表皮では、本酵素が阻害されずに働き得ることが示唆された。また、メタルプロテアーゼに対する阻害酵素もヒト表皮からは見つかっていない。白癬菌はこうした表皮の防御機構の弱点をついて感染を成立させ

得るものと考えた。

稿を終わるにあたり、恩師昆 宰市教授に対し深甚なる感謝を捧げます。終始ご指導を賜った日比野利彦助手、瀬川郁雄講師に対し深く感謝の意を表します。又、本研究を始めるにあたり真菌の基礎からご指導いただいた青森県立病院皮膚科部長福士 堯先生に深く御礼を申し上げます。

なお、本論文の要旨は、第34回日本医真菌学会（平成2年9月29日、神奈川）第273回日本皮膚科学会東北地方会（平成3年2月10日、宮城）、第90回日本皮膚科学会総会（平成3年4月28日、京都）において発表した。

文献

- 1) Noval, J.J. and Nickerson, W.J.:
Decomposition of native keratin by
Streptomyces fradiae. J.Bacteriol. 77,
251-263, 1959.
- 2) Yu, R.J., Harmon, S.R. and Blank, F.:
Isolation and purification of an
extracellular keratinase of *Trichophyton*
mentagrophytes. J.Bacteriol. 96, 1435-1436,
1968.
- 3) Yu, R.J., Harmon, S.R., Blank, F., et al.:
Hair digestion by a keratinase of
Trichophyton mentagrophytes. J.Invest.
Dermatol. 53, 166-171, 1969.
- 4) Yu, R.J., Harmon, S.R., Wachter, P.E., et al.
: Amino acid composition and specificity of
a keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*.
Arch.Biochem.Biophys. 135, 363-370, 1969.
- 5) Yu, R.J., Harmon, S.R., Sarah, F., et al.:
Two cell-bound keratinase of *Trichophyton*

- mentagrophytes. *J. Invest. Dermatol.* 56, 27-32, 1971.
- 6) Yu, R.J., Ragot, J. and Blank, F.: Keratinases : Hydrolysis of keratinous substrates by three enzymes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Experientia*, 15, 1512-1513, 1972.
- 7) Sarah, F.G. and Blank, F.: Role of keratinases in dermatophytosis. *Dermatologica* 145, 245-255, 1972.
- 8) Collins, J.P., Sarah, F.G. and Blank, F.: Role of keratinases in dermatophytosis. *Dermatologica* 146, 95-100, 1973.
- 9) Eleuterio, M.K., Grappel, S.F., Caustic, C.A., et al.: Role of keratinases in dermatophytosis. *Dermatologica* 147, 255-260, 1973.
- 10) Sarah, F.G.: Role of keratinases in dermatophytosis. *Dermatologica* 153, 157-162, 1976.
- 11) 清 佳浩、樋口道生、滝内石夫: *Microsporum*

- canisの産生するKeratinaseの生化学的性状について. 昭和医学会誌. 39, 49-54, 1979.
- 12) ASAHI, M., Lindquist, R. Fukuyama, K., et al.
: Purification and characterization of major extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. *Biochem.J.* 232, 139-144, 1985.
- 13) 滝内石夫、清 佳浩、樋口道生: ExtracellularなKeratinaseに対する抗血清の作製. 日皮会誌. 91, 771- 773, 1981.
- 14) 清 佳浩、滝内石夫: Keratinaseの人角質層に対する作用並びに局在に関する研究. 真菌と真菌症 23, 308-313, 1982.
- 15) 古賀美保、清 佳浩、樋口道生、他: 白癬病巣部角質よりのケラチナーゼの粗抽出ならびに局在に関する研究. 真菌と真菌症 27, 107-112, 1986.
- 16) Hibino, T.: Purification and characterization of keratin hydrolase in psoriatic epidermis: Application of keratin- agarose plate and keratin-polysdrylamide enzymography methods. *Anal.Biochem.* 147, 342-352, 1985.

- 17) Apodaca, G. and Mckerrow, J.H.: Regulation of Trichophyton rubrum proteolytic activity. Infect.Immun. 57, 3081-3090, 1989.
- 18) Lineweaver, H. and Burk, D.: The Determination of Enzyme Dissociation Constants. J.Amer. chem. Soc. 56, 658-666, 1934.
- 19) Lowry, O.H., Rosebrough, and N.J., Farr, A.L., et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265-275. 1951.
- 20) 藤井 理、田村俊哉、飯塚 一、他：旭川医科大学皮膚科における白癬の統計。医真菌会誌。31, 133, 1990.
- 21) 林 紀孝、幡本明利、一木幹生、他：福岡大学病院における17年間の白癬菌培養成績。医真菌会誌。31, 134, 1990.
- 22) Takiuchi, I., Higuchi, D., Sei, Y., et al.: Isolation of an extracellular poroteinase (Keratinase) from Microsporum Canis. Sabouraudia 20, 261-288. 1982.

23) Takiuchi, I., Sei, Y., Takagi, H., et al.:

Partial characterization of the extracellular
Keratinase from *Microsporum canis*.

Sabouraudia 22, 219-224, 1984.

24) Hibino, T., Izaki, S. and Izaki, M.: Detection

of Serine proteinase inhibitors in cornified

Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 948-

955, 1981.

abstract

Keratinases are thought to have a central role for pathogenesis of dermatophytes infection. In the present study, the author isolated & characterized extracellular (F-I), membrane bound (F-II) and intracellular (F-III) keratinases from Trichophyton mentagrophytes, T. rubrum, and Microsporum canis, which shares more than 80% of this disease in Japan. F-I was obtained through each filtrate of culture-medium containing human hair as in the nitrogen source. F-II was extracted with 0.5 % Triton X-100 from the residue of F-I for 30 minits at room temperature. F-III was obtained by extraction with Triton X-100 overnight at 4°C. Keratinase activities were measured using keratin-agarose plate, azocoll and synthetic tripeptide substrates.

The ratio of keratinase activities among F-I, F-II and F-III was approximately 70:15:15,

which was relatively constant in three species.

Keratinase fractions were first applied to DEAE Sepharose column and separated into two fractions (adsorbed & nonadsorbed). DEAE adsorbed keratinases were further purified by Sephacryl S-200 and Mono Q chromatography. DEAE non-adsorbed keratinases were isolated using Sephacryl S-200 and hydroxylapatite chromatography. Each adsorbed fraction (F-I ~ F-III) from three species contained mainly Mr. 35,000 and 70,000 keratinase, whereas nonadsorbed fractions showed Mr. 21,000 and 38,000 keratinases. These keratinases hydrolyzed Arg-Pro-Tyr-p-nitroanilide, the substrate developed for chymotrypsin. In addition, these enzymes were susceptible to diisopropyl fluorophosphate (DFP) and chymostatin, confirming chymotrypsin-like character. Although majority of keratinases produced by three species of fungi were found to be chymotrypsin like serine proteinases, some

minor metallo-proteinase-like activity was also detected in nonadsorbed fractions. These results indicate that the dermatophytes are capable of degrading keratin in the epidermis by using keratinases without any obstacles, since epidermis does not contain inhibitors against chymotrypsin as shown in the previous study.

Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

