

氏 名 (本籍) ふる かわ ゆう じ
古 川 勇 次 (長野県)

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 4 4 号

学位授与年月日 昭和 4 3 年 3 月 2 6 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専攻 東北大学大学院農学研究科
(博士課程) 農芸化学専攻

学位論文題目 好気性細菌の蛋白分解酵素に関する
研究

論文審査委員 (主 査)
教授 高 橋 甫 教授 志 村 憲 助

教授 古 坂 澄 石

論文内容要旨

哺乳動物の消化器官をはじめ、動植物および微生物に広範に分布するプロテアーゼは、その基質が生体の生理に重要な意義をもつ蛋白質であり、その個有の特異性を利用すれば、蛋白質に関する構造や機能の研究において、極めて有力な手段となり得る。また食品工業、皮革工業、製薬工業、醸造など、工業的にもその利用価値は極めて重要な位置をしめている。

著者は蛋白質として自然界に広く存在する不溶性コラーゲンの利用の立場から、この分解菌を好気性細菌にもとめ、強力分解菌 *Bacillus cereus* kp 931 株を分離、同定し、その生産するプロテアーゼの性質に関する研究を行った。

論文はⅨ章よりなる。第Ⅰ章から第Ⅲ章までは、好気性の各種プロテアーゼ生産菌の単離および活性度の相違、また培養過程におけるプロテアーゼの分泌と天然基質に対する特異性の面を検討し、単離菌 *Bacillus cereus* kp 931 株のプロテアーゼが2種以上の性質の異なるプロテアーゼで構成されていることを推論した。第Ⅳ章から第Ⅷ章までの4章にわたつて、この構成プロテアーゼの分離、精製および酵素的性質についての実験結果を示し、第Ⅷ章で総括的考察を行い、第Ⅸ章で本論文を要約した。

第Ⅰ章 プロテアーゼ生産菌の分離

常法により土壌、泥土から分離したプロテアーゼ生産菌株の培養上清についてカゼイン、ゼラチン、hide powder に対する酵素活性を比較し、また特長ある優良3菌株の硫酸沈殿粗酵素標品を用いて種々のpHにおける比活性を比較した結果、これらの基質に対する活性は菌株により相違があることを明らかにした。

第Ⅱ章 細菌の生育とプロテアーゼ活性

プロテアーゼ活性の最も強力な単離好気性細菌、kp 931 株の培養時におけるプロテアーゼ活性を hide powder およびゼラチンの分解能について比較し、不溶性コラーゲン分解活性は対数生育期の末期に、またゼラチン分解活性は定常期に入ってから最大になることを示した(第1図)。この結果から本菌のプロテアーゼは性質の異なる2種以上のプロテアーゼで構成されているものと推論した。

第Ⅲ章 kp 931 株の菌学的性質

本菌の分類学的所屬を諸形態、培養の性質および生理的性質について常法にしたがつて調べ、本菌は *Bacillus cereus* に近縁なものと同定し、*Bacillus cereus*

kp 931株と命名した。

第IV章 Bacillus cereus プロテアーゼの分画

本菌のプロテアーゼが性質の異なつた2種以上の酵素から構成されているという推論をさらに進める目的で、実験的に分画を試みた。本菌の48時間培養後の培養濃液100 μ lから硫酸沈澱法によつて調製された粗酵素標品は、セファデックスG-100カラムでゲル濾過すると、カゼイン分解活性よりみて3種の活性区分(酵素区分I、酵素区分IIおよび酵素区分III)に分離し、その活性の分布はそれぞれ8%、61%、31%となつた(第2図)。この結果から本菌のプロテアーゼは分子量の異なる3種のプロテアーゼで構成されているものと考察した。

第V章 部分精製プロテアーゼの性質

本菌の生産するプロテアーゼを構成する分子量の異なる3種酵素が如何なる性質を有するかをDEAE-セルロースカラムにより、これら酵素区分の精製を更に進め、部分精製酵素についてその性質を検討した。

3種酵素区分のうち、セファデックスで高分子区分に溶出される酵素区分IはDEAE-セルロースに吸着され、精製される。低分子区分に溶出される酵素区分IIおよび酵素区分IIIは非吸着で、この非吸着部分を集め、部分精製酵素とした。至適pHは3酵素区分とも10.5ないし11.0の間にあるアルカリプロテアーゼである。また以下に示す実験結果から酵素区分Iはexopeptidase-type proteaseで、酵素区分IIおよび酵素区分IIIはいわゆるbacterial proteinaseであろうと推定した。

- (1) 酵素反応の停止に沈澱試薬AおよびBを用いて酵素濃度に対する酵素活性曲線を求めた(第3図)。酵素区分IIおよび酵素区分IIIについては、Aを用いるとS字形となり、Bを用いると直線が得られた。一方、酵素区分Iについては、A、BいずれにおいてもS字形曲線関係および直線関係は得られなかつた。即ち酵素区分Iは基質ポリペプチド鎖の末端部から低級ペプチド或いはアミノ酸の遊離を触媒するものと考えられる。
- (2) 同単位のカゼイン分解活性の酵素量で、セラチン粘度低下活性を調べると、酵素区分IIが酵素区分Iの3倍の活性(51units:16units)を有していた(第4図)。
- (3) 酵素区分Iは酵素区分IIの2倍近くのニンヒドリン陽性物質を基質カゼインから遊離した。酵素区分Iと酵素区分IIの交叉試験を行なつた結果、酵素区分IIでカゼインを分解したのち酵素区分Iを添加した場合は更に加水分解がすみやかに進行し、その逆の処理の場合は

緩やかな分解しか観察されなかつた(第I表)。

- (4) 酵素反応によりカゼインから遊離するアミノ酸をペーパークロマトグラフィーで定性した結果、酵素区分Iは多数のアミノ酸を遊離し、酵素区分IIおよび酵素区分IIIは反応液中にアミノ酸をほとんど遊離しなかつた。

第VI章 エキソペプチダーゼ型プロテアーゼの精製とその性質

プロテアーゼを構成する exopeptidase-type protease を DEAE-セファデックスA-50により2回精製し(第5図)、超遠心的に均一な酵素を得、培養濾液の2.7倍に精製した(第II表)。この酵素IはDFP, Hg⁺⁺により顕著に阻害され、SLS, EDTA, O-phenanthroline によつては有意の阻害がみられなかつた。酸化インシュリンB鎖の加水分解によつて、アラニン、グルタミン酸、ロイシン、セリン、グリシン、システイン酸および微量のアルギニンが遊離した(第III表)。このように多数のアミノ酸を遊離すること、およびグルタミン酸、セリンを比較的多量に遊離することはこの酵素の特徴である。

第VII章 プロテイナーゼの解離、会合

酵素Iと異なり、2種の bacterial proteinase は EDTAによつて阻害され、またセファデックスG-100による再クロマトグラフィーでは、その活性が顕著に低下し、その低下した酵素区分に対して、調べた範囲の金属イオンの添加は活性を促進しない。また熱失活に対しては酢酸カルシウムが顕著な保護作用を示す。そこでセファデックスG-100によるゲル濾過を酢酸カルシウム存在下で行うと、活性のピークは2個だけとなつて溶出され(第6-b図)、酵素区分Iは酢酸カルシウムを含まないゲル濾過の結果と同じく(第6-a図)、同一位置に、同一活性量(4.1×10^3 units)をもつて溶出され、他の1つのピーク(酵素区分II')の全活性(93.8×10^3 units)は酢酸カルシウムを含まない条件で得られる酵素区分II(30.8×10^3 units)と酵素区分III(15.7×10^3 units)の全活性よりも約2倍高い活性を有する。酵素区分II'を再クロマトグラフィーして得られる酵素区分II''について、酢酸カルシウムを含まない条件でゲル濾過すると、これより低分子区分に2個の活性区分(酵素区分IIa, 酵素区分IIb)となつて溶出される。更にこの2種の酵素区分を集めて、酢酸カルシウムを含んだ条件で再クロマトグラフィーを行うと、またも単一ピークとなつて酵素区分II' 或いは酵素区分II''と同じ溶出位置に溶出された(第7図)。以上の処理における各種酵素区分の全活性および比活性について第IV表に示す。本実験の結果は、本菌のプロテイナー

ースは酢酸カルシウムの除去により2成分に解離し、酢酸カルシウムの附加によつて、単一の構造体に会合することを示すものである。

第 IX 章 総 括

不溶性コラーゲン分解活性の強い菌株として単離、同定した *Bacillus cereus* kp 931株のプロテアーゼは exopeptidase-type protease と bacterial proteinase で構成されていることを明らかにした。好気性細菌のプロテアーゼとしては特異的な酵素であるこの exopeptidase-type protease を超遠心的に均一な酵素として精製し、その性質を調べた。本酵素は至適 pH を 10.5 ないし 11.0 にもつアルカリプロテアーゼで、インシュリンB鎖から多数のアミノ酸を遊離すること、および特にグルタミン酸、セリンを遊離する点は本酵素の特徴である。他の構成プロテアーゼである bacterial proteinase については、粗酵素標品のセファデックス G-100 のゲル濾過で2種のプロテイナーゼとして溶出されるものが、酢酸カルシウムを含む条件でのゲル濾過では1種の活性の高いプロテイナーゼとして溶出される。このプロテイナーゼが酢酸カルシウムを含まない条件では2種成分に解離し、解離した2成分が、酢酸カルシウムを含む条件で再び単一の構造に会合することをクロマトグラフ的に証明した。酵素蛋白のこの種の解離、会合については、現在知識が集積されつつあるが、蛋白分解酵素についてこの種の解離会合を指摘したのは本論文が最初である。

Fig. 1. Time Course Changes of D-Collagenase and Gelatinase Activities During the Cell Growth on the A and B Media.

Enzymatic activities were expressed as the enzyme units per ml culture filtrate. Cell growth was determined spectrophotometrically at 660 m μ .

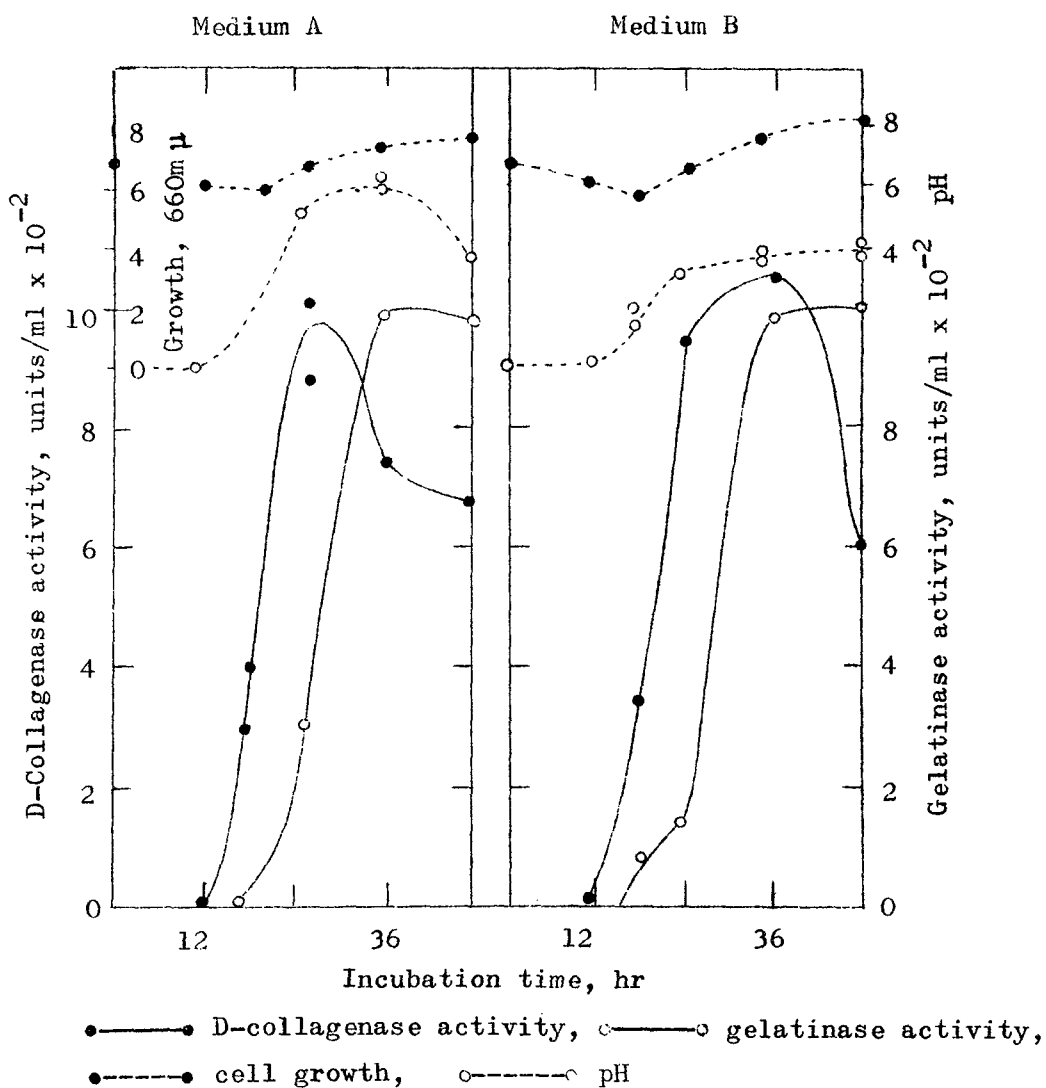


Fig. 2. Elution Profile of Proteolytic Enzymes with Sephadex G-100 Gel Filtration.

The crude enzyme solution was fractionated with the Sephadex gel filtration. Enzymatic activities were plotted versus fraction numbers (17 ml per tube).

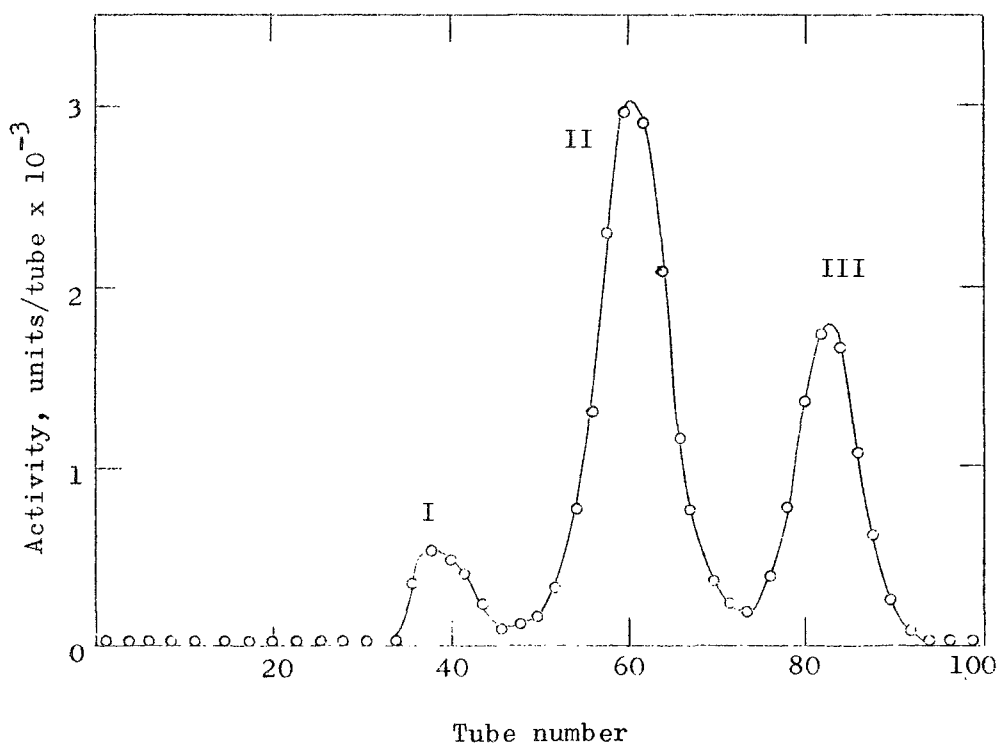


Fig. 3. Relationship between the Enzyme Concentrations and Enzymatic Activities.

The reactions were run under the standard assay conditions with casein substrate and were terminated either by reagent A or B. The enzymatic activities were expressed by the μg tyrosine equivalent released per ml of the reaction mixtures. The activities were plotted versus enzyme concentrations. Curves A and B represent the data obtained by reagents A and B, respectively.

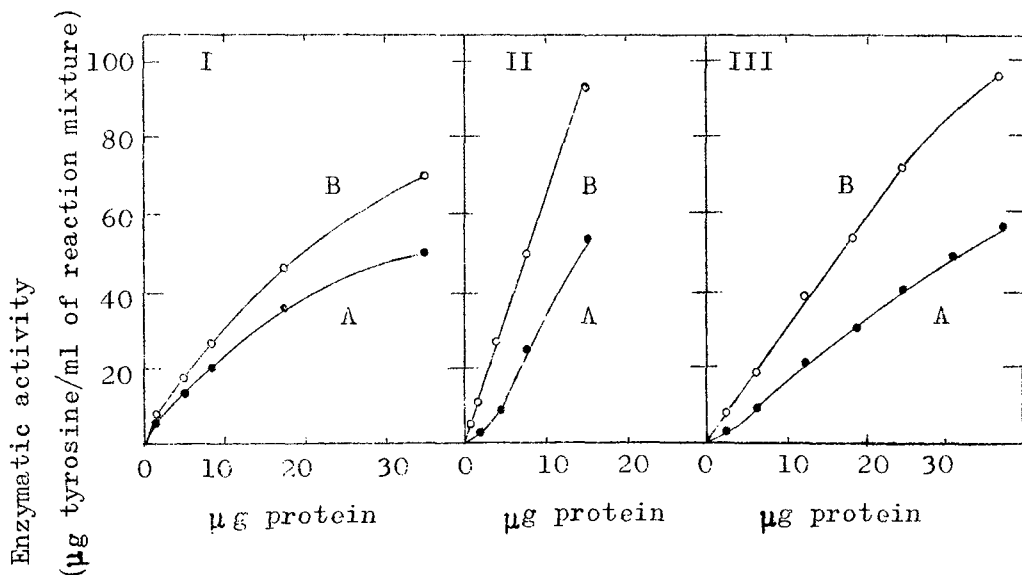


Fig. 4. Hydrolysis of Gelatin Solution
by Enzyme Fractions I and II as
Assayed by Viscosity Change.

Changes of viscosity of gelatin solution were plotted versus incubation period. Open and closed circles represent the reactions catalyzed by the fraction I and II, respectively. The numbers in parentheses indicate the enzyme units employed.

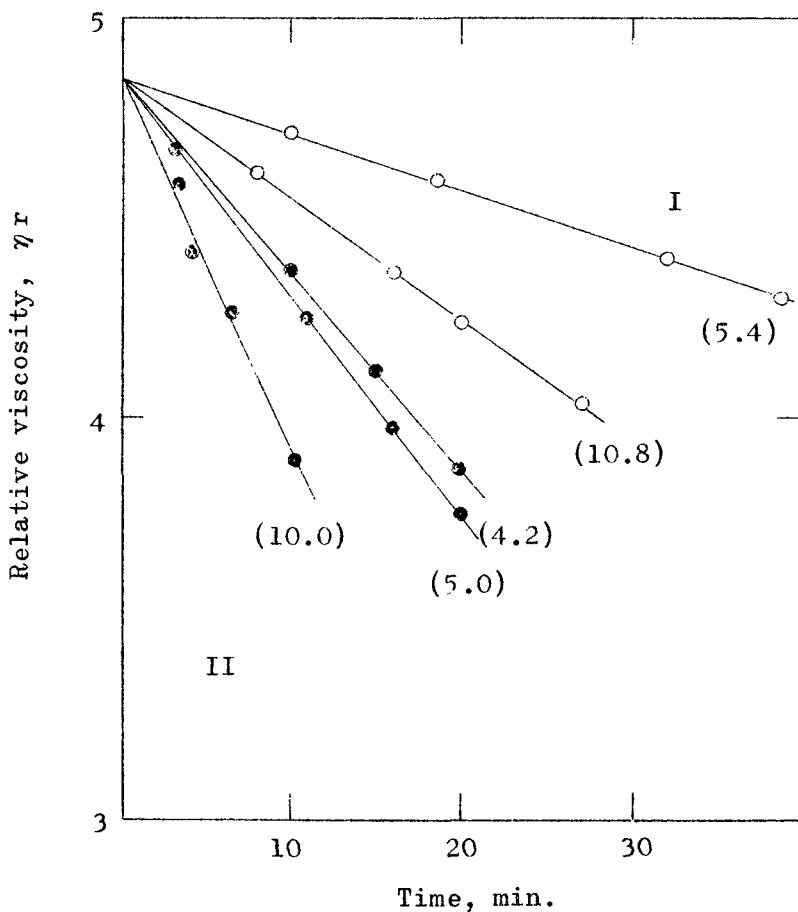


Table I. Release of Ninhydrin Reactive Substances from Casein by the Joint Action of Enzyme Fractions I and II.

Enzyme Fractions	Enzyme fractions added after 24 hours	Amino acids released after 48 hours ($\mu\text{g/ml}$)
I	none	290
I	I	460
I	II	380
II	none	170
II	I	370
II	II	130

The initial reaction mixture contained 10 ml of enzyme solution (16 units, each), 48 ml of 0.12% casein in 0.04 M borate-NaOH, pH 10.5, 1.5 ml of 8×10^{-2} M calcium acetate and 0.5 ml of toluene. After 24 hours, further addition of enzyme (1.5 ml of fraction I or 1.14 ml of fraction II, and each 16 units) was made and incubated for additional 24 hours. Incubation was at 37° . Ninhydrin reactive materials in the hydrolyzate were expressed as μg leucine equivalent per ml of the reaction mixture.

Fig. 5. Column Chromatography of the Fraction I with DEAE-Sephadex A-50.

Approximately 6 mg protein was applied to the column. The enzyme was eluted with a linear gradient of NaCl as shown. Protease activity and absorbancy at 280 m μ of each fraction were shown by solid and dotted lines, respectively.

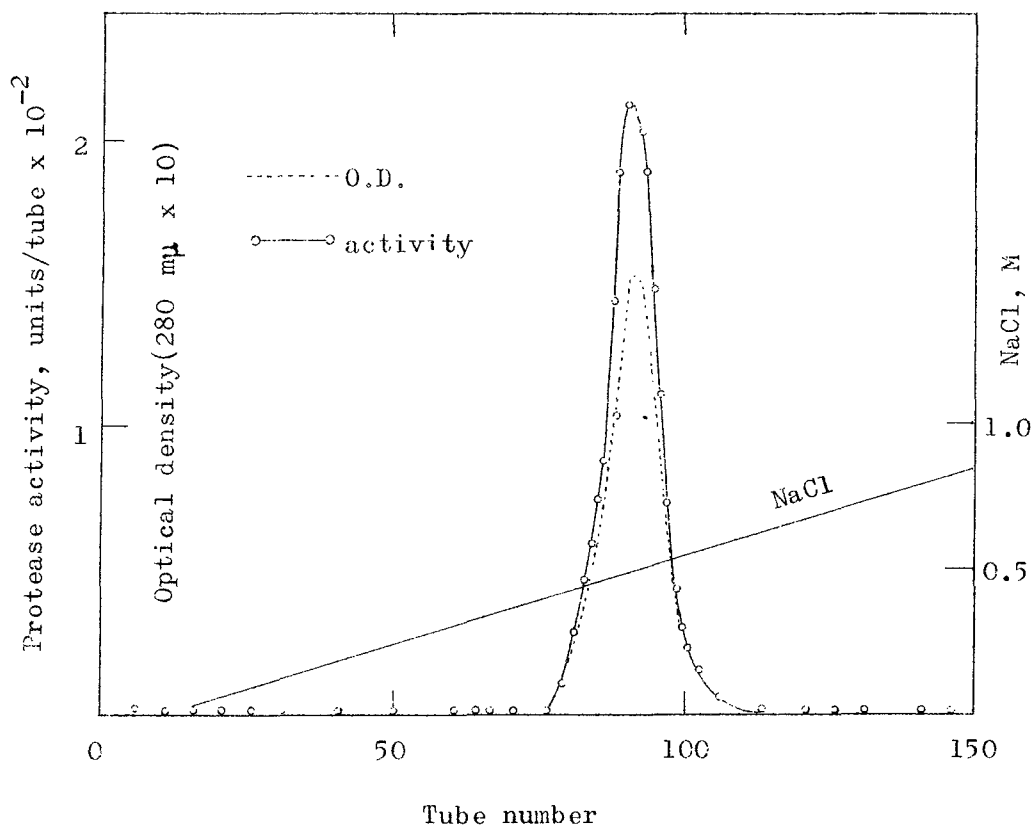


Table II. Purification of Enzyme I

Stage of purification	Protein (mg)	Protease activity		Yield	
		total units $\times 10^{-2}$	specific activity	(%)	
Crude enzyme solution	700	2140	306	100	—
Sephadex G-100 filtrate	119	82	69	3.8	100
DEAE-cellulose fraction	22.7	45	201	2.1	55
1st DEAE-Sephadex A-50 fraction	6.6	30	452	1.4	37
2nd DEAE-Sephadex A-50 fraction	4.7	22	472	1.0	27

Table III. Free Amino Acids Released from Oxidized Insulin B-Chain by Purified Enzyme I

Amino acid	Incubation time, hours					Amino acid released after 24 hours (m μ moles)
	0.5	1	5	12	24	
Ala	+	+	+	+	+	349
Glu	-	trace	+	+	+	186
Leu	-	-	-	trace	+	57
Ser	-	-	-	trace	+	30
Gly	-	-	-	trace	+	30
CySO ₃ H	-	-	-	-	+	15
Arg	-	-	-	-	-	trace

The reaction mixture contained approximately 30 mg (9 μ moles) of the oxidized insulin B-chain, 0.3 mg of the enzyme (142 units) and 2.5 ml of 0.05 M (NH₄)₂CO₃, pH 8.0. Incubation was at 30^o. Free amino acids derived from the substrate at indicated incubation periods were analyzed by two-dimensional paper chromatography. The positive reaction for indicated amino acids is indicated by plus symbol. After incubation for 24 hours, the free amino acids were quantitatively analyzed by the autoanalyzer.

Fig. 6. Elution Profiles of Crude Enzyme Preparation by Sephadex G-100 Column with or without Calcium Acetate.

The crude enzyme solutions were fractionated by the gel filtration. Enzymatic activities were plotted versus fraction numbers (17 ml per tube).

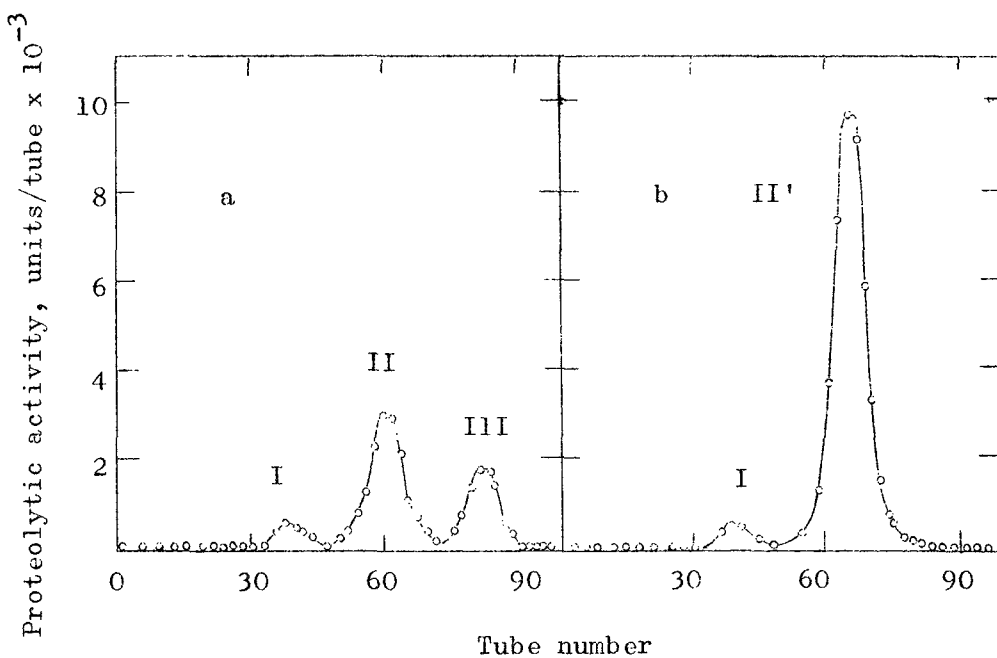


Fig. 7. Elution Profiles of Proteinases by Sephadex G-100 Column with or without Calcium Acetate.

The conditions of the experiments were the same as those described for Fig. 6. Open circles and solid lines represent the proteolytic activities and the dotted lines represent the absorbancy at 280 m μ .

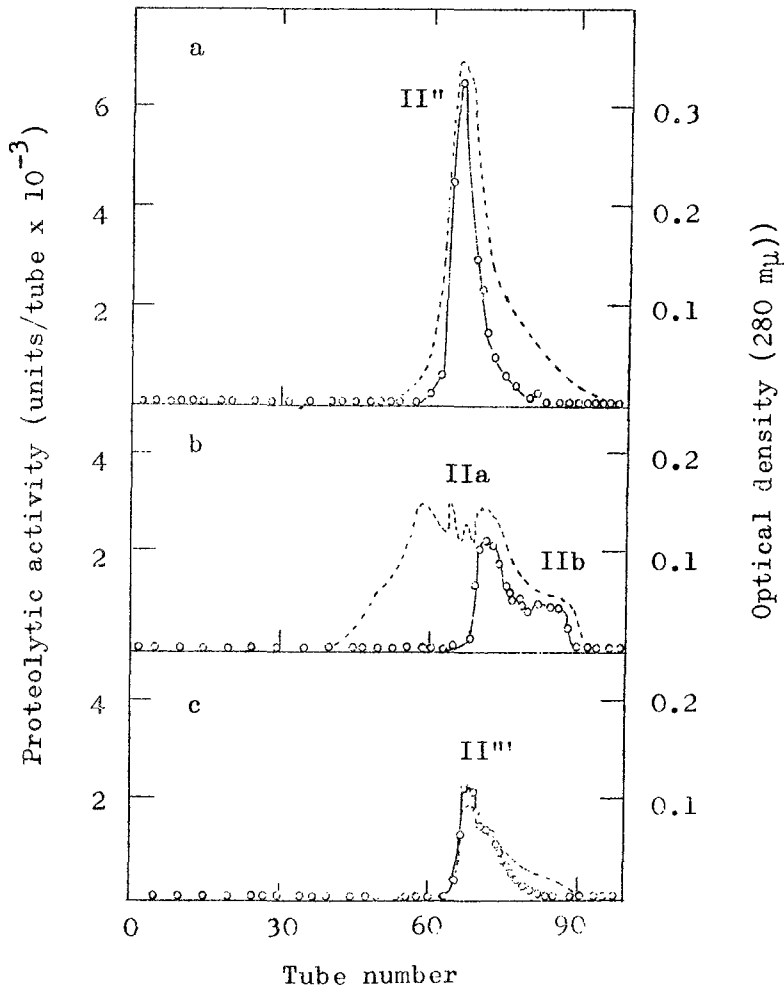


Table IV. Total and Specific Activities of Proteinases during Gel Treatments.

Enzyme fractions	Protein (mg)	Activity (units x 10^{-4})	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)	
Crude enzyme	359	11.1	310	100	-
II'	90	9.4	1040	85	100
II''	39	4.9	1260	44	52
IIa + IIb	21	2.4	1140	22	26
II'''	14	1.8	1290	16	19

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は不溶性変性コラーゲン利用の目的で、強力分解菌として分離同定した *Bacillus cereus* に属する細菌が分泌する蛋白分解酵素を詳細に研究したものである。

著者はまず多数の蛋白分解酵素生産菌を自然界から分離し、ハイドパウダー（不溶性変性コラーゲン）などの分解力を調査し、最も強力な菌株 Kp 931 株を選定した（第 I 章）。培養条件による酵素生産の変化から、本菌は少なくとも 2 種の蛋白分解酵素を生産分泌することを推定し（第 II 章）、また菌学的性質から *Bacillus cereus* に近縁な菌株と同定した（第 III 章）。本菌の培養濾液より得られる粗酵素標品をセファデックスカラムにより分画すると、蛋白分解活性は 3 個のピークに分画され、分子量のことなる少なくとも 3 種の蛋白分解酵素が生成されていることを証明し（第 IV 章）、さらに DEAE-セルロースカラムにより各酵素を部分精製し、基質の分解様式から、分子量の最も大きい酵素はいわゆる exopeptidase 型であり、他の 2 種はいわゆる細菌 proteinase 型と推定した（第 V 章）。Exopeptidase 型の酵素は、カラム及び超遠心的に均一と認められる迄に精製され、酸化インシュリン B 鎖を基質としたとき、多数のアミノ酸が遊離されることを認め、既知の諸酵素との相違を明かにした（第 VI 章）。セファデックスカラムにより分画される 2 種の Proteinase は、活性が金属イオンにより促進されることはないが、EDTA により阻害され、また Ca^{++} によって安定化される。 Ca^{++} の存在で粗酵素をセファデックスカラムにより分画すると exopeptidase 型の酵素の溶出位置には変化がないが、Proteinase 型の酵素活性は単一のピークとして溶出される。これを分取し、 Ca^{++} を含まない条件で再分画すると、低分子側に 2 個の活性区分が溶出される。この区分を合せ、再び Ca^{++} の存在で分画を行なうと、やや高分子側に単一ピークが溶出される。この実験から著者はこの Proteinase の解離会合の可能性を指摘した（第 VII 章）。

以上のように本研究は新しい exopeptidase 型の酵素の証明、また蛋白分解酵素については従来報告がない解離会合の可能性を指摘した点など新知見を得ており、論文審査委員一同は、著者に農学博士の学位を授与する価値があるものと判定した。