

氏 名 (本籍) ひら まつ あきら  
平 松 昭 (大阪府)

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 3 2 号

学位授与年月日 昭和 4 3 年 1 0 月 1 7 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

最終学歴 昭和 2 8 年 3 月  
茨城大学農学部卒業

学位論文題目 放線菌中性およびアルカリ性プロテ  
ナーゼに関する研究

論文審査委員 (主 査)  
教授 志 村 憲 助 教授 玉 利 勤 治 郎  
教授 高 橋 甫

## 論 文 内 容 要 旨

放線菌は抗菌性物質を生産する重要な微生物であるが、近年この微生物の生産するタンパク質分解酵素についても、その利用の方面から種々の研究が行なわれてきた。

放線菌のタンパク質分解酵素に関して、現在までに Tytell、三宅、野本、大内、岩浅、水沢、野口、森原および Nickerson らの研究があるが、なかでも野本は詳細な研究を報告している。同氏は放線菌プロテアーゼ（プロナーゼ）がエキソペプチダーゼとエンドペプチダーゼの両者の基質特異性を併有した単一酵素であり、したがってその基質特異性は極めて広範囲であると報告した。しかし、この酵素の単一説は発表の当初より反論があり、大内および著者は放線菌ペプチダーゼの研究において、つねにプロテイナーゼとペプチダーゼが相互分離されることにより、この点に疑問を抱き検討を行なった。すなわち各種放線菌よりプロテイナーゼおよびペプチダーゼ活性のともに強力な菌株として、*Streptomyces griseus* ATCC 3463 を選び、その培養液からプロテイナーゼとアミノペプチダーゼをそれぞれアルコール、硫酸分画沈殿およびデンプン粒電気泳動法、およびアルコール、硫酸分画沈殿およびイオン交換樹脂処理により電気泳動的に全く均一に分離精製することに成功した。ついで両酵素の酵素化学的性質を詳細に研究し、とくに基質特異性の観点よりこの放線菌はエキソペプチダーゼおよびエンドペプチダーゼを少なくとも一種ずつ生産することを見出した。さらに著者は市販放線菌プロテアーゼ製剤（プロナーゼ）には少なくとも2種以上のプロテイナーゼと1種以上のペプチダーゼを含むことを報告した。

以上の観点から、本研究では、放線菌のプロテアーゼの基質特異性を詳細に比較検討することを目的とし、まず中性プロテイナーゼを生産する *Streptomyces naraensis* の培地よりアミノペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼを含まない中性プロテイナーゼを分離精製し、ついでチトクロームcを基質として、DNP法等のタンパク質構造決定法を用いてその基質特異性を詳細に検討した。この結果放線菌プロテアーゼ系においてもエキソペプチダーゼとエンドペプチダーゼとが、それぞれ別個の酵素蛋白質として存在することを実証

することが出来た。

本論文の大要は以下に記すとおりである。

## 1 放線菌中性プロテイナーゼの精製、酵素化学的性質および基質特異性

放線菌 *Streptomyces naraensis* の生産する中性プロテイナーゼは培養ろ液（粗酵素液）より 40～65% アセトン分画沈殿酵素を作り、この酵素液をアンバーライト IRC-50 および DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーにより、あるいはセフアデックス G-100 のゲルろ過法および DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる二方法によつて精製した。この中性プロテイナーゼの純度は粗酵素液の約 130 倍で、アミノペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼ活性を示さず、しかも電気泳動的、超速心的、あるいは N-末端および C-末端分析的に均一な標品であつた。本酵素は第 1 表に示した如く、分子量 36,600、等電点は pH 4.2 で、陽イオン交換体に吸着されず、DEAE-セルロースおよび DEAE-セフアデックス等の陰イオン交換体に吸着される酸性タンパク質で、さらに N-末端がバリン、C-末端がロイシンである一本のペプチド鎖より出来ていることを見出した。この酵素の酵素化学的性質は最適作用 pH 7.5、最適作用温度 40°C、安定 pH 領域が 5～9 (Ca<sup>2+</sup> 存在中)、60°C、10 分間で 35% の残存活性を示し (Ca<sup>2+</sup> 存在中)、カルシウムイオンが酵素の安定性を保護し、また EDTA によつて完全に酵素活性を失つた。EDTA-失活酵素は亜鉛イオンの添加により酵素活性を回復した。さらに本酵素 1 モル中に 1 原子の亜鉛を含むことから、活性発現に亜鉛イオンを必須成分とし、かつこの亜鉛は透析およびセフアデックス G-25 のゲルろ過法等の処理で酵素タンパク質より分離することが出来ないことから、酵素タンパク質の特定位置に強く結合し、活性中心を形成しているものと考えられた。したがつてこの中性プロテイナーゼは金属酵素 (*metalloenzyme*) に属する。この酵素のエキソペプチダーゼ活性を検討した結果、合成基質 Cbz-Gly-Phe-OH、Cbz-Gly-Leu-OH、H-Leu-Gly-OH および H-Leu-Gly-Gly-OH 等を全く水解せず、エンドペプチダーゼの作用基質であるカゼインを初め各種の蛋白質を水解し、また Cbz-Gly-

phe-NH<sub>2</sub> を水解した。さらに基質特異性を詳細に検討するため、一次構造既知のパン酵母チトクローム c を基質に用いて検討した。その結果は第 1 図に示した如くで、グルタミン、セリンおよびアスパラギンのカルボキシル基側を特異的に開裂し、ついでチロシン、リジン、グリシンのカルボキシル基側を比較的よく開裂した。しかしアミノ基側のペプチド結合の開裂について調べた結果は第 2 表に示す如くで、チロシン、ロイシン、フェニールアラニンメチオニンおよびバリンのアミノ基側のペプチド結合を良く開裂する特徴をもっている。

この中性プロテイナーゼは野本らが報告した放線菌プロテイナーゼ（プロナーゼ）と比較すると、タンパク化学的性質および基質特異性の点で差異が認められた。すなわち、この中性プロテイナーゼは DEAE-セルロースに吸着し、等電点 pH 4.2、ミルクカゼインに対する加水分解限度は 17% で、エキソペプチダーゼ作用を示さず、エンドペプチダーゼ作用のみを有した。これに対して、プロナーゼは DEAE-セルロースに吸着せず、等電点 pH 5.0~6.5 で、ミルクカゼインに対する加水分解限度が 80~85% で、エンドペプチダーゼの作用基質（タンパク質および合成基質）およびエキソペプチダーゼの作用基質（ペプチド類およびアミノ酸誘導体）を水解した。

#### ■ 放線菌アルカリ性プロテイナーゼの精製、酵素化学的性質および基質特異性

放線菌 *Streptomyces griseus* ATCC 3463 の培養液よりイオン交換樹脂（デオライト C-10）処理法により、アミノペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼ活性を示さないアルカリ性プロテイナーゼを好収量で分離精製し、デンプン粒電気泳動的に均一な標品を得た。本酵素のタンパク化学的性質および酵素化学的性質は第 1 表に示した如くであつた。この酵素は DFP により完全に失活するのでセリン酵素に属する。また基質特異性を検討した結果、エキソペプチダーゼの作用合成基質 Cbz-Gly-phe-OH, Cbz-Gly-Leu-OH, H-Leu-Gly-OH および H-Leu-Gly-Gly-OH 等を全く水解しなかつた。また Bz-Arg-NH<sub>2</sub> および Bz-Gly-NH<sub>2</sub> の如きトリプシンおよびパパイ

ン等の特異性質を水解した。さらに放線菌中性プロテイナーゼの場合と同じく、一次構造既知のパン酵母チトクロームcを用いて、作用特異性を詳細に検討した。その結果は第1図の如くでアルギニン、リジン、ヒスチジン、チロシン、フェニールアラニン、ロイシン、メチオニンおよびアスパラギンのカルボキシル<sup>側</sup>基<sup>素</sup>を特異的に開裂することを明らかにした。

なおここに得られた<sup>両酵母</sup>のパン酵母チトクロームcに対する作用特異性を動物起源のタンパク質分解酵素、すなわちトリプシン、キモトリプシンおよびペプシンの場合と比較して第1図に示した。またパン酵母チトクロームcの107個のペプチド結合中開裂されたペプチド数はアルカリ性プロテイナーゼ、中性プロテイナーゼ、ペプシン、キモトリプシンおよびトリプシンの順に56、34、25、21および18である。したがってアルカリ性プロテイナーゼおよび中性プロテイナーゼの基質特異性はトリプシンおよびキモトリプシンよりも広範囲で、トリプシンおよびキモトリプシンに見られるような基質特異性に明確な規則性は見られなかつた。

すなわち放線菌の培養液よりエキソペプチダーゼ(アミノペプチダーゼとカルボキシペプチダーゼ)を含まないエンドペプチダーゼ(プロテイナーゼ)を単離し、一次構造既知のパン酵母チトクロームcを基質として用いその基質特異性を水解されたペプチド結合より詳細に検討するとともに放線菌プロテアーゼ(プロナーゼ)の単一説を否定した。

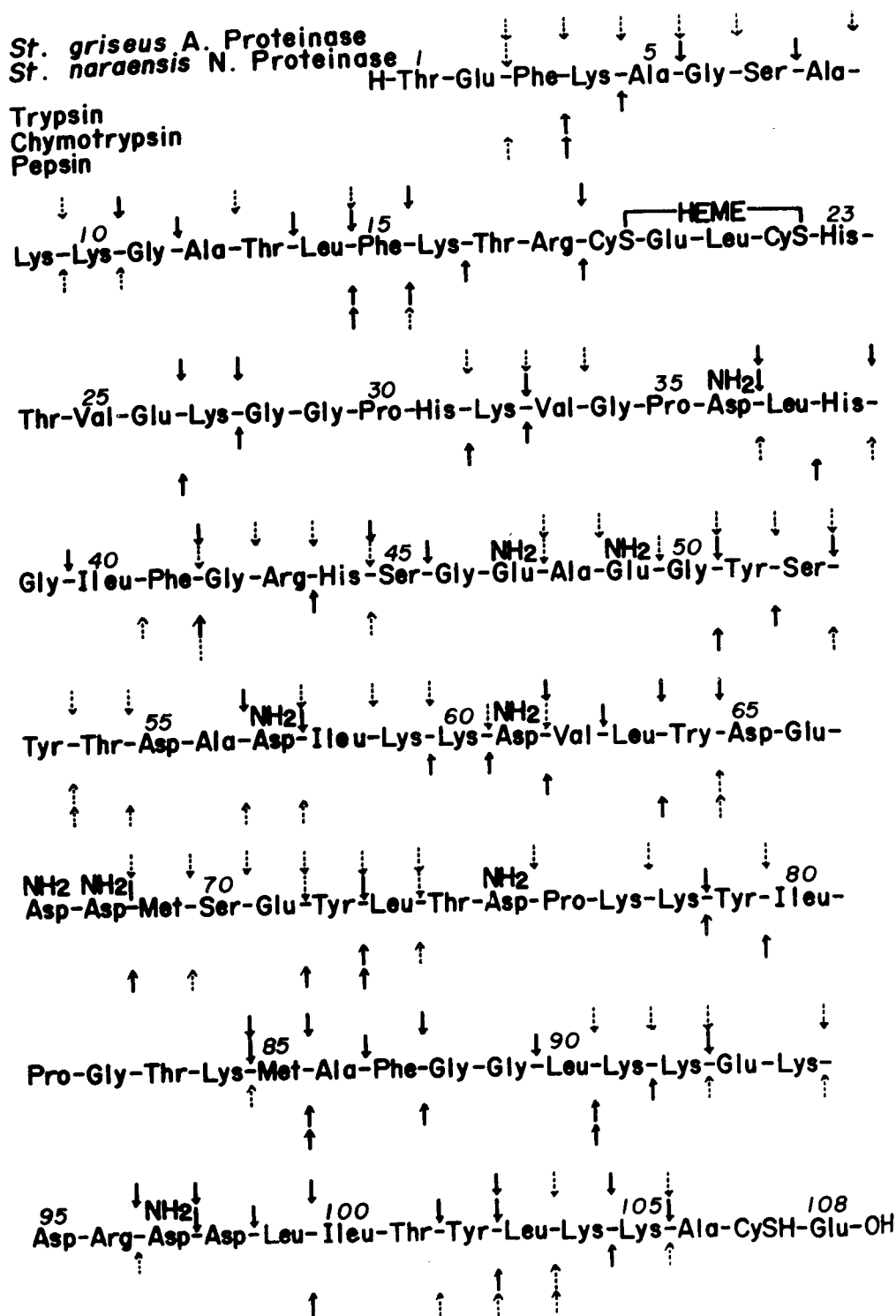
第1表 *Streptomyces naraensis* の生産する中性プロテイナーゼと  
*Streptomyces griseus* ATCC 3463 の生産するアルカリ性プロテ  
イナーゼの酵素化学的性質の比較

性 質	中 性 プロテイナーゼ	アルカリ性 プロテイナーゼ
最適作用 pH	7.5	10.0
pH 安定領域	5~9	2.5
最適作用温度 (°C)	40	45
耐熱性 (60°C、10分熱処理 の残存率%)	35%	0%
カルシウムイオンによる保護作 用	+	-
物理的性質		
分子 量	36,600	20,000
等 電 点	4.2	9.6
S <sub>20, W</sub> <sup>0</sup>	3.3	-
E <sub>1 cm</sub> <sup>1%</sup>	9.15	2.2
E <sub>max</sub> (mμ)	277.5	267
水解する合成基質	Cbz-Gly-Pho-NH <sub>2</sub>	Bz-Arg-NH <sub>2</sub> Bz-Gly-NH <sub>2</sub>
カゼインに対する加水分解度(%)	17	26
アミノ酸のカルボキシル基側の ペプチド結合を開裂する	Glu(NH <sub>2</sub> ), Ser, Asp(NH <sub>2</sub> ), Tyr, Lys, Gly	Arg, Lys, His, Tyr, Phe, Leu, Met, Asp(NH <sub>2</sub> )
酵素の種類	metalloenzyme (Zn)	serine enzyme

第2表 中性プロテイナーゼの基質特異性  
 —アミノ基側のペプチド結合の開裂—

	アミノ酸の種類
特異的に開裂されるアミノ酸(70%以上)	Leu, Val, Met, Tyr, Phe,
比較的开裂されるアミノ酸(50%程度)	Ileu, Ala, Gly,
開裂が困難なアミノ酸(25%以下)	Ser, Thr, Asp(NH <sub>2</sub> ) Asp, Glu,
全く開裂されないアミノ酸(0%)	Pro, CySH, Cys, Glu(NH <sub>2</sub> ) His, Arg, Lys,

第1図 放線菌中性プロテイナーゼとアルカリ性プロテイナーゼおよび2, 3の酵素によるパン酵母チトクロームcの開裂位置





# 審査結果の要旨

放線菌は、抗菌性物質を生産する重要な微生物であるが、近年この微生物が生産する蛋白質分解酵素についても、その利用の面から多くの研究が行われてきた。しかし、従来の研究で扱われた酵素は精製が不十分であったため、単一酵素の性質を明らかにすることはできなかった。

本研究では、放線菌プロテアーゼの性質特に基質特異性を解明することを目的として、*Streptomyces naraensis* の生産する中性プロテイナーゼおよび *Streptomyces griseus* ATCC 3463 の生産するアルカリ性プロテイナーゼをえらび、両プロテイナーゼの分離・精製、酵素化学的性質の解明を行った。

## I. 放線菌中性プロテイナーゼ

*Streptomyces naraensis* の培養濾液より、アセトン分画沈殿、アンバーライトIRC-50（あるいはセフアデラックスG-100）およびDEAE-セルロースのカラムクロマトグラフィーにより分離・精製し、粗酵素液の約130倍の精製酵素を得た。本酵素は、分子量36,600の一本のペプチド鎖よりなる酸性蛋白質で、1分子中に1原子の亜鉛を含む金属酵素であることを明らかにした。この亜鉛原子は酵素蛋白質と強固に結合し、酵素活性に不可欠である。

ついで一次構造既知のパン酵母チトクロームCを基質として、中性プロテイナーゼの基質特異性を詳細に検討した。その結果、グルタミン、セリンおよびアスパラギンのカルボキシル基側、チロシン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニンおよびバリンのアミノ基側のペプチド結合を優先的に加水分解する特徴をはじめて明らかにした。

## II. アルカリ性プロテイナーゼ

*Streptomyces griseus* ATCC 3463 よりアルカリ性プロテイナーゼを分離・精製し、その酵素化学的性質を詳細に検討した。この酵素はセリン酵素に属し、基質に対する特異性として、アルギニン、リジン、ヒスチジン、チロシン、フェニルアラニン、ロイシン、メチオニンおよびアスパラギンのカルボキシル基側を特異的に開裂することを明らかにした。中性プロテイナーゼとは明らかに異った性質である。

以上本論文は、放線菌よりエキソペプチダーゼを含まないエンドペプチダーゼを2種単離し、その酵素化学の基礎のみならず、応用面においても寄与するところ大きく、著者に農学博士の学位を与えるに充分の価値あるものと認める。