

氏 名(本籍) 吉 田 健 治

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 3 5 1 号

学位授与年月日 昭 和 6 3 年 7 月 2 1 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 *Bacillus sphaericus* の生産するプロテ
アーゼ (Sfericase) の分離・同定とその
抗炎症作用について

論文審査委員 (主 査)

教授 山内 文男 教授 木村 修一

助教授 大久保一良

論文内容要旨

序 論

プロテアーゼ研究の歴史に於いて、初期の研究は主として動物の消化管由来のペプシン、トリプシン、キモトリプシンに向けられた。また古くから人間に馴染みの深い発酵食品の製造過程で消化酵素と類似の作用を有するプロテアーゼが重要な役割を果していることが認識されるに至り、カビ、細菌、酵母、放線菌、原虫などの生産するプロテアーゼがつぎつぎと精製されその性質が明らかにされて来た。一方得られたプロテアーゼを積極的に利用しようとする試みもプロテアーゼの研究とほぼ平行して行われ、消化酵素、チーズ製造、皮革工業、洗剤等へ利用されている。トリプシンを血栓の溶解剤として利用しようとの試みの中で、トリプシンの持つ強い抗炎症作用が発見され、キモトリプシン、セラチオペプチダーゼ、プロクターゼ、などが消炎酵素剤として利用されている。著者は強い抗炎症作用を有し、副作用の少ないプロテアーゼを得る目的で、約3500株の細菌を天然界よりスクリーニングし、*Bacillus sphaericus*に属する一菌株が強いプロテアーゼ生産菌であることを発見した。*Bacillus*属の細菌が生産するプロテアーゼについては古くから多くの研究がなされ、サブチリシンや中性プロテアーゼなど膨大な報告がある。しかしながら*Bacillus sphaericus*の生産するプロテアーゼに関する研究は見あたらず、研究を進めていく過程で従来報告されている*Bacillus*属のプロテアーゼと比較して極めてユニークな性質を有していることを発見し、本酵素をSfericaseと命名した。本論文は*Bacillus sphaericus*の生産するプロテアーゼSfericaseの酵素化学的、蛋白化学的性質、抗炎症酵素剤として経口投与されたSfericaseの消化管吸収の証明および抗炎症酵素剤としてのプロテアーゼの作用メカニズムに関して考察を加えるものである。

第一章 Sfericaseの単離および性質

*Bacillus sphaericus*を培養後、培養上清を塩析し脱塩濃縮することによりSfericaseを簡単にしかも大量に結晶として得る方法を確立した。得られた結晶中には電気泳動的に少なくとも4種のプロテアーゼが混在し、電気泳動時の易動度の小さい順にSfericase A, B, C, Dと命名した。これらは再結晶を繰り返しても単一の酵素としては得られなかった。DEAE-Sephadex A-50を用いた精製 (Fig. 1) でSfericase Aは電気泳動的に単一の酵素として得ることが出来た。本章では主成分であるSfericase Aについて述べることにし、Sfericase B, Cの単離および性質については第三章にて詳述する。ミルクカゼインを基質とした時の至適 pHは約 9.5で、至適温度はカルシウム存在下、非存在下でそれぞれ約55°Cおよび45°Cであった。pHに対する安定性はpH 6からpH11まで、また温度に対してはカルシウム存在下55°C、15分の加熱でも安定であった。分子量は超遠心法で約32000、ゲル濾過法で約27000と算定された。金属イオンを含まない緩衝液で透析したSfericase中には1分子当り2原子のカルシウムが検出されたが、Mg, Zn, Coなどの原子は検出されなかった (Table 1)。酵素阻害剤に対する挙動を調べたところ、セリ

ン酵素阻害剤であるDFP, PMSF, および金属酵素の阻害剤であるEDTAで完全に失活した (Table 2)。阻害剤に対する挙動からSfericase Aはセリン酵素と金属酵素の両方の性質を有していることになるが、活性中心を2種類有する酵素は例を見ない。EDTAによる失活については、第二章にて詳しく論ずる。アミノ酸分析の結果Sfericase 1分子当り1/2 cys 2モルを検出した (Table 3)。*Bacillus*属の生産するプロテアーゼで分子内にシスチンやシステインを含むものは知られておらず、シスチンやシステインを含まないことが従来から*Bacillus*属のプロテアーゼの特徴とされていたことからみれば、このSfericaseは極めてユニークな性質を示すものと言えよう。アミノ酸分析で得られた2モルの1/2 cysの存在様式を調べた結果、1ケのS-S結合として存在していることを明らかにした。S-S結合はSfericase Aの安定性には関与しておらず、その機能については明らかでない。Sfericase Aと*Bacillus*属の生産するプロテアーゼsubtilisin BPN', subtilisin Carlsberg, subtilisin amilosacchariticus, thermolysinとの免疫学的な異同を調べたが、比較したプロテアーゼとSfericaseは免疫学的に全く異なるものであった (Table 4)。酸化インシュリンB鎖を用いた基質特異性の検討を行ったが、*Bacillus*属のプロテアーゼと比較し本質的な差異を認めなかった (Fig. 2)。またペプチドエステルを基質とした速度論的な解析結果についても論述した。

第二章 Sfericase分子内に含まれるカルシウム原子の機能

酵素阻害剤を用いた実験からSfericaseはセリン酵素と考えられたが、EDTAにより完全に活性を失うことにより、金属酵素の可能性も残されている。Sfericase A分子内にはカルシウム原子のみが検出されたことから、分子内のカルシウムの機能を明らかにする目的で検討を行った。Sfericase Aは1mM EDTA存在下40°Cで瞬時に完全に活性を失ったが、比較したsubtilisin BPN' およびsubtilisin Carlsbergは10mM EDTAでも全く影響を受けなかった。ゲル濾過法により分子内にカルシウムをそれぞれ2原子、3原子および4原子含むSfericase Aを調製し (2 Ca-Sfericase, 3 Ca-Sfericase, 4 Ca-Sfericaseと呼ぶ) 熱安定性を調べたところ、2 Ca-Sfericaseは極めて不安定で、安定性には2 Ca-Sfericase < 3 Ca-Sfericase < 4 Ca-Sfericaseの関係が有り (Fig. 3)、4 Ca-Sfericaseに更にCa²⁺を加えても安定性に変化は認められなかった。しかも分子内に4原子以上のカルシウムを含むSfericase Aが得られないことより、Sfericase Aの分子内には4原子のカルシウムが含まれると結論した。2 Ca-Sfericaseに種々の金属イオンを加え安定化の検討を行ったが、2 Ca-Sfericaseの安定化にはCa²⁺のみが有効であった (Fig. 4)。一方Sfericase Aが完全に失活する濃度のEDTAを低温下に加えた後、各種金属イオンを加えて、Sfericase Aの賦活化を調べたところ、Ca²⁺ Zn²⁺ Mn²⁺が有効で (Table 5)しかも賦活化したSfericase Aは安定であった (Fig. 5)。この結果は先の2 Ca-Sfericaseの安定化にはCa²⁺のみが有効でZn²⁺などは影響しないことと大きく矛盾する。

EDTAはSfericase Aの酵素活性を阻害するのではなく、Sfericase Aを著しく不安定化させるのではないかと、この考えのもとに、EDTA存在下、低温でのSfericase Aの活性を調べた。既に述べたようにSfericase AはCa²⁺存在下で至適温度は約55°Cであったが、EDTA存在下での至適温度は約20°Cで、40°Cでは全く活性を示さなかった (Fig. 6)。しかも10°C以下ではCa²⁺存在下とEDTA存在下とで酵素活性は完全に一致していた (Fig. 6)。この結果はSfericase Aの活性発現にCa²⁺が関与していないことを示すものである。また2 Ca-SfericaseにCa-EDTAを加え、Ca-EDTAと等モルのCa²⁺、Zn²⁺およびBa²⁺を加え安定性を調べたところ、Ca²⁺およびZn²⁺を加えた系では2 Ca-Sfericase Aは安定化されたが、Ba²⁺を添加した系では安定化されなかった (Fig. 7)。この現象はEDTAと金属の結合定数即ちキレート安定度定数を考えにいと良く説明できる (Table 6)。即ちCa-EDTA存在下でZn²⁺を添加するとキレート安定度定数がCa²⁺よりはるかに大きいZn²⁺はEDTAと結合しZn-EDTAとなり遊離したCa²⁺は2 Ca-Sfericaseと結合し4 Ca-Sfericaseとなり安定化する。一方Ba²⁺添加ではBa²⁺に比較しキレート安定度定数の大きいCa²⁺はEDTAと結合したままで2 Ca-Sfericaseの安定化に必要なCa²⁺を遊離しないため、2 Ca-Sfericaseは安定化しないと考えられる。またEDTAで完全に失活させたSfericase Aをゲル濾過で調べたところ、自己消化によると推定される低分子化を認めた。以上Sfericase Aはセリン酵素であり、EDTAによる極めて短時間の失活は分子内カルシウム原子のトラップによる急激な不安定化に起因することを示した。

第三章 Sfericase結晶中に含まれるプロテアーゼの単離およびその性質

第一章で述べたとおり、Sfericase結晶中には電気泳動的に少なくとも4種類のプロテアーゼが存在し、それぞれSfericase A, B, C, Dと命名したが、この章ではSfericase B, C, Dについて述べる。DEAE-celluloseカラムを用いた精製でSfericase BとCは単離結晶化することができた (Fig. 8, 9, 10) が、Sfericase Dは微量であるため、単離するに至らなかった。Sfericase BおよびCはいずれも分子内に2モルの1/2 cysを含むセリン酵素で、阻害剤に対する挙動もSfericase Aと同じ結果を示した。その他酵素化学的、蛋白化学的性質についても、また免疫学的性質においてもSfericase A, B, Cの間に差異は認められず (Table 7)、またSfericase A, B, Cの相互変換も認められなかった。電気泳動パターンに見られた差が唯一のものでSfericase A, B, Cの等電点はそれぞれ5.4, 5.1, 4.7であった。多くのBacillus属細菌はセリンプロテアーゼと金属プロテアーゼを生産するが、カビや放線菌においても性質は全く異なる複数のプロテアーゼを同時に生産することが知られている。これまで述べたようにB.sphaericusが複数のアイソザイム様プロテアーゼを同時に生産している事実は全く新しい知見であり、これらプロテアーゼの存在意義についても興味深いものがある。

第四章 Sfericaseの消化管吸収

抗炎症酵素剤として多くのプロテアーゼが使用されているが、その全てが経口投与剤として使用されている。これらプロテアーゼ製剤が抗炎症作用を発揮するためには消化管より吸収されることが必要と考えられる。従来多くの酵素剤について消化管吸収の研究がなされているが、それらは生理的条件からかけ離れた、*in vitro*での研究が多い。また濃度の測定法においてもラジオイムノアッセイ等の免疫学的方法がしばしば用いられているが、酵素のnativeな形で吸収を調べているかどうかを断定するには難点がある。

Sfericaseの良い基質としてAcetyl Tyrosine Naphthyl Ester (ATNE)が開発されるに至り、血液中でのSfericaseの定量が可能となった。本章では血液中Sfericaseの定量およびウサギないしはイヌを用いた腸管吸収について論述するものである。

ウサギを麻酔下開腹し十二指腸内へSfericase溶液を投与し、経時的に採血し、血液中のATNE水解活性を調べた。血液中出现するATNE水解活性はSfericase抗血清で有意に阻害された。本現象を用いて血液中Sfericaseなエステラーゼとの分別定量が可能となった。またSfericaseは酸性で不安定な為、胃内での失活を防止する目的で腸溶性顆粒および腸容錠を調製した。ウサギに腸溶性顆粒を十二指腸または経口投与しSfericaseが吸収され血液中に移行することを証明した (Fig. 11, 12, 13)。またビーグル犬にSfericase腸容錠を経口投与した場合には明らかにSfericaseが吸収され血液中に移行していることが示された。一方あらかじめSfericaseを反復投与して抗体を産生させたウサギでは血液中にほとんどSfericaseを検出できなかった。

第五章 抗炎症剤としてのSfericaseの作用機作

抗炎症剤の有効性評価としてラットを用いた打撲足浮腫法が知られているが、ラット足蹠の体積を精度良く測定する装置を新たに考案し、実験に使用した (Fig. 14)。打撲足浮腫をおこしたラットに対し、経口投与したSfericaseが有効であることを明らかにした (Table 8)。すでに前章でSfericase腸管より吸収されることを明らかにしたが、吸収されたSfericaseの抗炎症メカニズムに関し検討を行った。血液中には多種類のプロテアーゼ阻害物質の存在が知られている。従って微量のSfericaseが吸収されてもSfericaseが直接抗炎症作用を発揮するとは考えにくい。著者は吸収されたSfericaseがトリガーとなり体内に新たな抗炎症作用を有する物質が生成されるのではないかと、この仮説に基づき以下の実験を行った。Sfericaseをラットに静脈内投与しないしは経口投与した後、全採血し、血清中の分子量 10000以下の画分を集め、打撲足浮腫法で抗炎症効果を調べた。Sfericaseを投与していないラット血清の分子量 10000以下の画分には抗炎症効果は認められなかったが、Sfericase投与群のラット血清分子量 10000以下では有意に抗炎症効果が認められた (Table 9)。本結果より吸収されたSfericaseがトリガーとなり、

体内に新たな抗炎症作用を有する物質を出現させ、それが抗炎症効果を示しているものと推論した。

総 括

*Bacillus sphaericus*を培養し、新アルカリプロテアーゼSfericaseの結晶を大量に得る方法を確立した。得られた結晶中には電気泳動的に少なくとも4種類のプロテアーゼが含まれている。DEAE-celluloseを用いて3種のプロテアーゼを単離した。得られたプロテアーゼは分子内に1/2 cysを2モル有し、主成分であるSfericase Aでは1ケのS-S結合として存在していた。Bacillus属細菌のプロテアーゼはシスチンやシステインを含まないことが特徴とされている。SfericaseはDFP, PMSFおよびEDTAで完全に失活したが、Sfericaseはセリン酵素であり、EDTAによる失活は分子内カルシウム原子のトラップによる極端な不安定化に起因することを明らかにした。Sfericase A, B, Cは電気泳動時の易動度のみを認め等電点はそれぞれ5.4, 5.1, 4.7で、その他の諸性質は全く同一であった。またSfericase A, B, C内での相互変換は認められず、微生物由来の酵素ではほとんど知られていないアイソザイム様酵素と考えられた。以上述べたようにSfericaseは従来知られているプロテアーゼと比較し極めてユニークな特徴を有していた。Acetyl Tyrosine Naphthyl Esterを基質とし、更に免疫学的手法の組合せでSfericaseの腸管吸収を証明すると共にSfericaseの抗炎症作用発現メカニズムは吸収されたSfericaseの直接の作用ではなく、吸収されたSfericaseがトリガーとなり、体内に新たな抗炎症物質を産生させることによるものであるとの見解を支持する結果についても論じた。

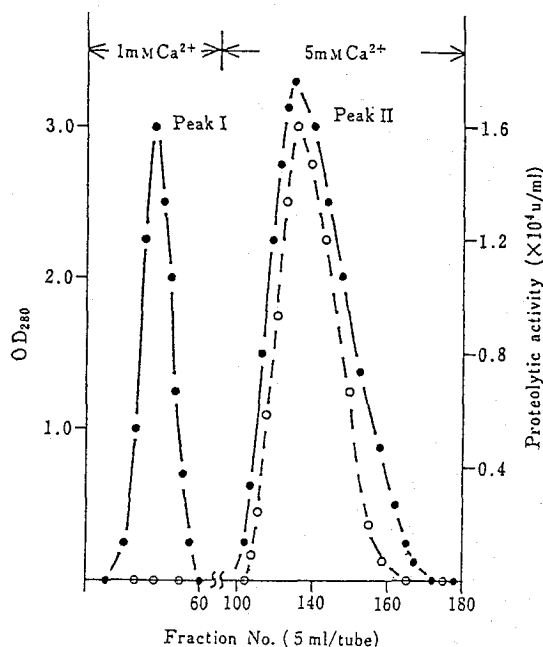


Fig.1 Chromatography of the Crude Protease on DEAE-Sephadex A-50.

●—●, OD at 280 nm; ○---○, proteolytic activity. One gram of enzyme (crude crystals) was loaded on a column (3 × 20 cm) of DEAE-Sephadex A-50 and eluted as described in the text.

Table 1 PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF SFERICASE

$E_{1cm, 280nm}^{1\%}$ (pH 8.0)	13.0
Molecular weight	
Sedimentation equilibrium	32,000
Gel filtration	27,000
$s_{20,w}^0$ ^{a)}	3.21S
Specific activity	6,000 μ /mg protein
Elemental analysis	
C contents	51.22%
H contents	6.92%
N contents	16.99%
S contents	0.99%
Metal contents	
Ca	2 gram atoms/mole of protein
Mg	trace
Zn, Mn, Ni, Co, Fe, Cu.	0

^{a)}The sedimentation coefficient was determined in 10 mM calcium acetate-0.3 M NaCl-10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, at the enzyme concentration range of 1.5 to 6.8 mg/ml. Observed values of all runs were corrected to those corresponding to water at 20°C ($s_{20,w}^0$) and the plot was extrapolated to zero concentration to obtain $s_{20,w}^0$. From the amino acid composition, a value of 0.713 was obtained for the partial specific volume of the enzyme, and used for the calculation of molecular weight.

Table 2 EFFECT OF VARIOUS INHIBITORS ON PROTEASE ACTIVITY

Reagent	Final concentration (M) in incubation mixture	Remaining activity (%)
EDTA	1×10^{-8}	0
	5×10^{-4}	40
DFP	1×10^{-8}	0
	1×10^{-4}	35
<i>o</i> -Phenanthroline	1×10^{-2}	95
PCMB	3×10^{-4}	100
SDS	1×10^{-1}	71
	1×10^{-2}	100
TPCK	1×10^{-5}	100
TLCK	1×10^{-5}	100
Potato inhibitor I	1×10^{-6}	3
	1×10^{-7}	69
Potato inhibitor IIa	1×10^{-6}	14
	1×10^{-5}	58
Potato inhibitor IIb	1×10^{-5}	17
	1×10^{-6}	69

One ml of enzyme (0.005%) in 2 mM calcium acetate-10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, was mixed with 1 ml of individual inhibitor solution. After incubation at 30°C for 30 min, remaining caseinolytic activity was determined with aliquots of the incubation mixture. In the case of EDTA and *o*-phenanthroline, buffer without calcium acetate was used.

Table 3 Amino Acid Composition of Sfericase

Amino acid	Sfericase ^{a)}	Subtilisin BPN'	Subtilisin Carlsberg	B.subtilis neutral
Asp	44	28	27	61
Glu	20	15	12	33
Pro	11	14	9	14
Ser	32	37	32	42
Thr	24	13	19	37
Gly	39	33	35	37
Ala	45	37	41	35
Val	19	30	32	24
Ieu	22	13	10	18
Leu	17	15	16	26
Met	2	5	5	5
1/2Cys	2	0	0	0
Phe	3	3	4	14
Tyr	18	10	13	29
Trp	4	3	1	4
Lys	8	11	9	20
His	5	6	5	7
Arg	9	2	4	10
NH ₃	51	28	25	35
Total	324	275	274	416

a) Enzyme specimens were hydrolyzed in 6 N HCl under vacuum for 24, 48 and 72 hr at 110°C. The amino acid composition indicates the nearest integers calculated assuming the molecular weight of the enzyme as 32,000.

Table 4 IMMUNOLOGICAL CROSS REACTION
SFERICASE AND SOME OTHER
PROTEASES

Protease	Antiserum				
	A	B	C	D	E
A	+	-	-	-	-
B	-	+	-	+	-
C	-	-	+	-	-
D	-	+	-	+	-
E	-	-	-	-	+

A, Sfericase; B, subtilisin BPN'; C, subtilisin Carlsberg; D, subtilisin amylosacchariticus; E, thermolysin.

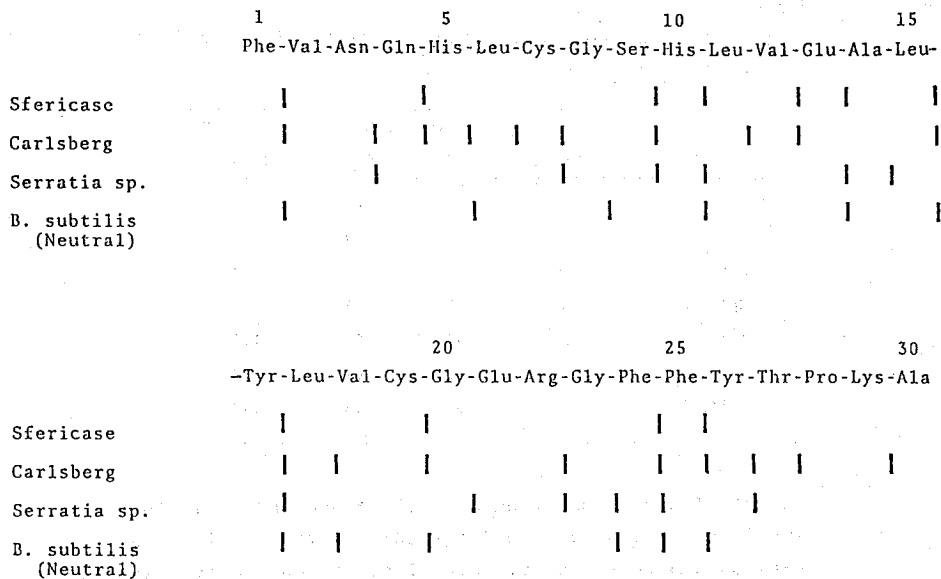


Fig.2 Comparison of Cleavage Sites of Oxidized Insulin B-Chain by Various Proteases.

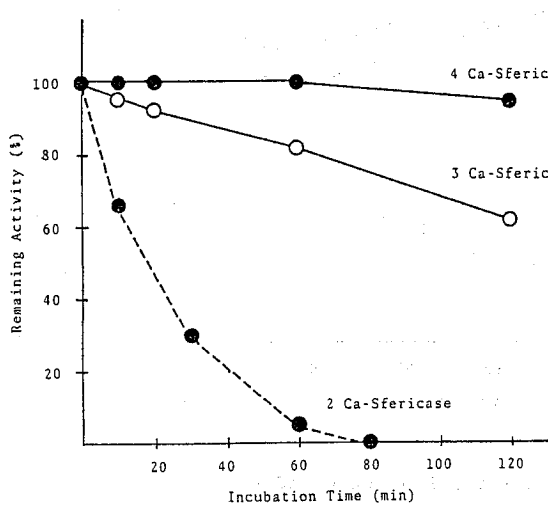


Fig.3 Effect of Temperature on Stability of Sfericase A Containing Various Calcium Atoms in Molecule. Enzyme solution (without calcium) were incubated at 50°C for various time and remaining activity was assayed.

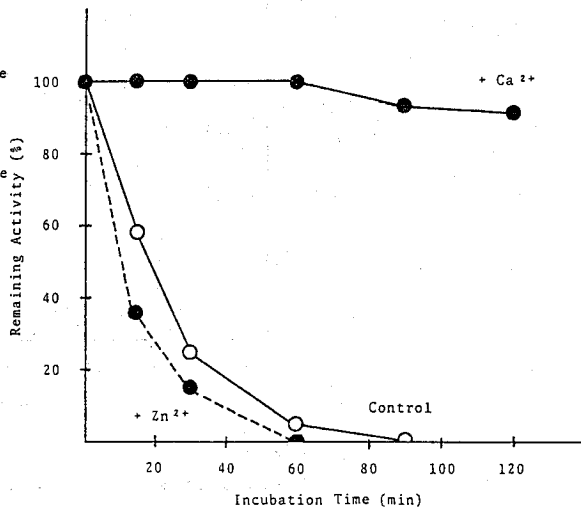


Fig.4 Effect of Temperature Stability of 2Ca-Sfericase by addition of Ca²⁺ and Zn²⁺.

Table 5

Reactivation of EDTA Pretreated Sfericase A by Various Devallet Cations.

Cation	Cation (mM)			
	2.5	5.0	6.3	25.0
Ca ²⁺	3	99	120	122
Ba ²⁺	2	5	10	35
Sr ²⁺	2	3	23	72
Mg ²⁺	2	8	25	52
Zn ²⁺	2	95	97	120
Co ²⁺	2	25	67	93
Mn ²⁺	2	99	98	114

One ml of enzyme solution and 1ml of 5mM EDTA solution was mixed and incubated at 0°C for 30min. After addition of various concentration of metal ion, the enzyme activity was assayed.

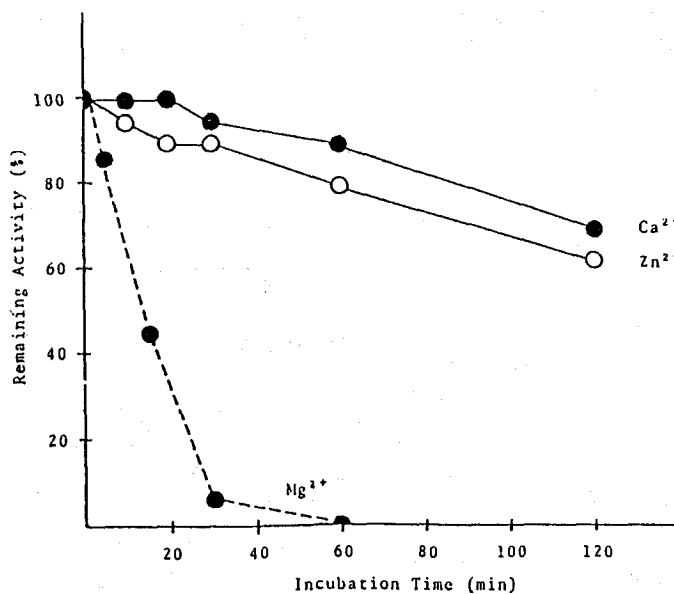


Fig.5

Thermal Staviity of the Sfericase A Reactivated by Divalent Cations.

Five ml of the enzyme solution (5mM Tris-Hcl buffer pH9.0) and 5 ml of 10mM EDTA solution were mixed and incubated at 0°C. After incubated for 30min. 10ml of 12mM calcium acetate, zinc chrolide or magnesium chrolide was added and stability at 50°C of the enzyme was estimated.

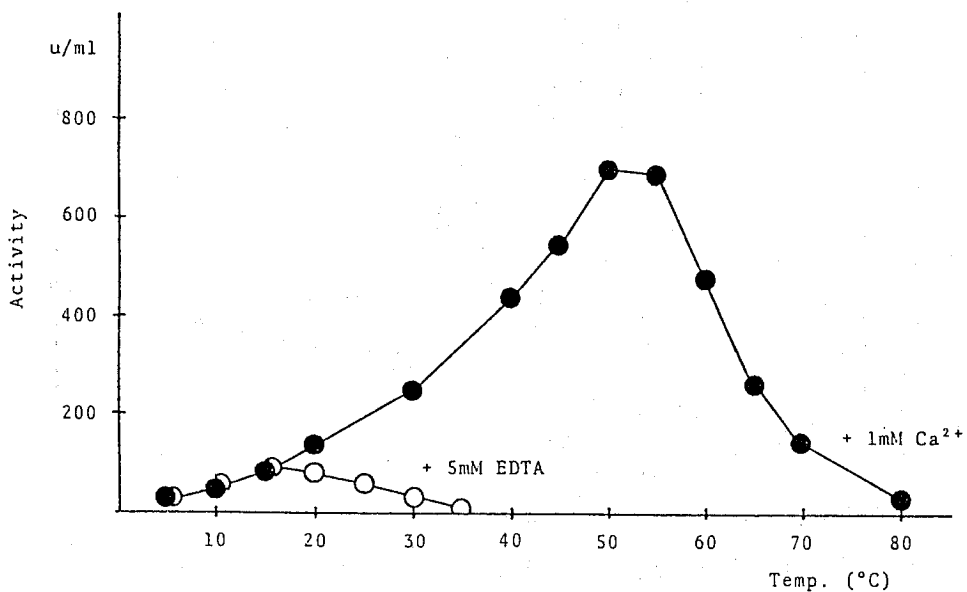


Fig.6

Effect of Temperature on Activity of Sfericase A with and without EDTA.

Caseinolytic activity of Sfericase A was assayed at various temperature at pH9.0.

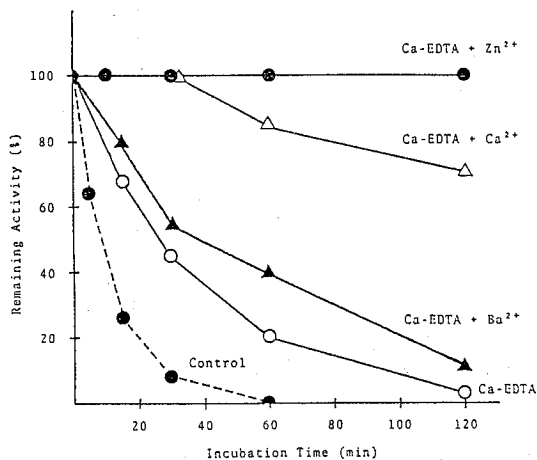


Fig.7

Stabilization of Ca-EDTA Treated 2 Ca-Sfericase by Addition of Divalent Cations.

Ten ml of 2Ca-Sfericase solution (pH9) and 10ml of 15mM Ca-EDTA solution were mixed then 10ml of 15mM calcium acetate, zinc chloride or barium chloride added at 0°C and incubated at 50°C for various time. Remaining activity was assayed at 40°C.

Table 6

Chelate Stability Constant of Divalent Cations.

Metal	log K (EDTA)
Ca	10.6
Mg	8.7
Ba	7.8
Sr	8.6
Zn	16.5
Co	16.3
Mn	14.0

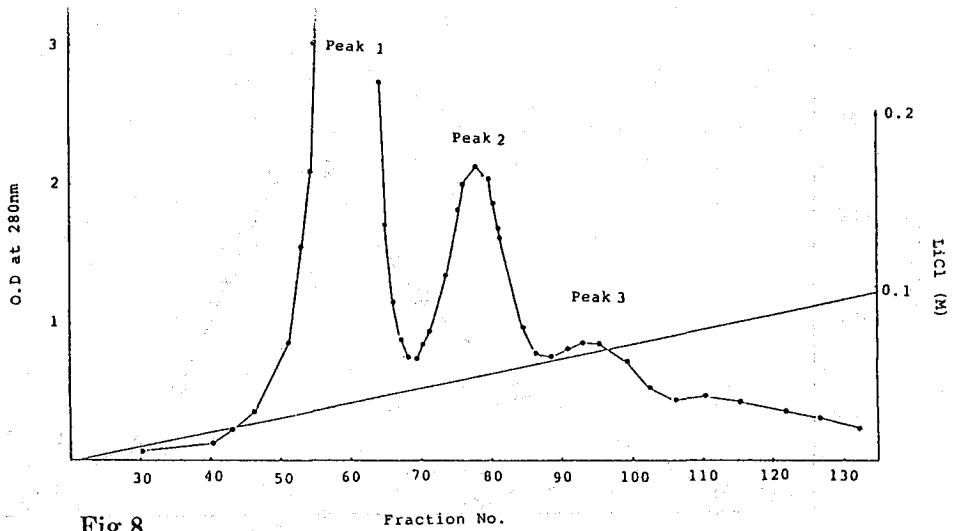


Fig.8

Chromatography of the Crude Crystal of Sfericase on DE Cellulose DE-52

About 160mg of Sfericase was loaded on a column (2x10cm) of DE Cellulose and eluted with the buffer containing 0~0.2M LiCl.

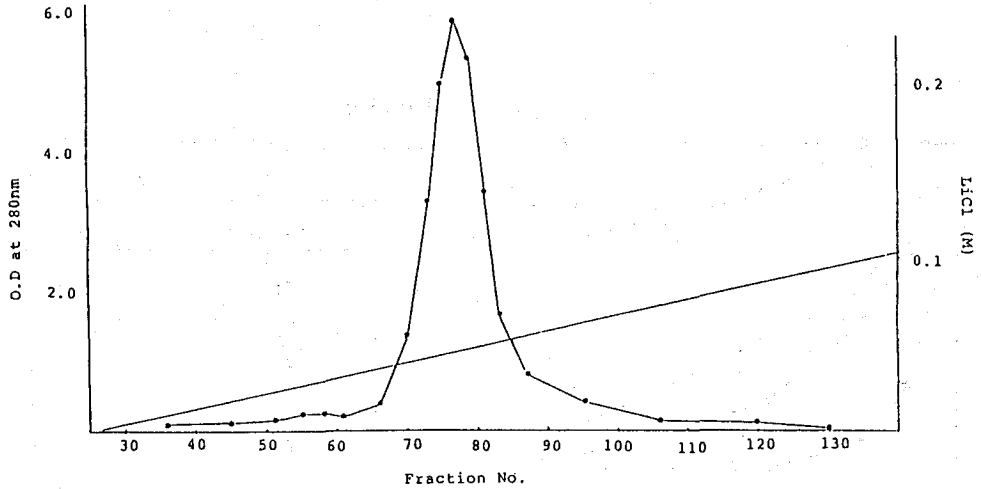


Fig.9

Purification of Sfericase B by Chromatography of DE Cellulose

Active fraction of peak 2 (Fig. 8) was pooled and dialyzed against 5mM Tris-HCl buffer pH8.0 containing 5mM calcium acetate, and loaded on a column (2x10cm) of DE-cellulose.

Sfericase B was eluted with a linear gradient in LiCl concentration.

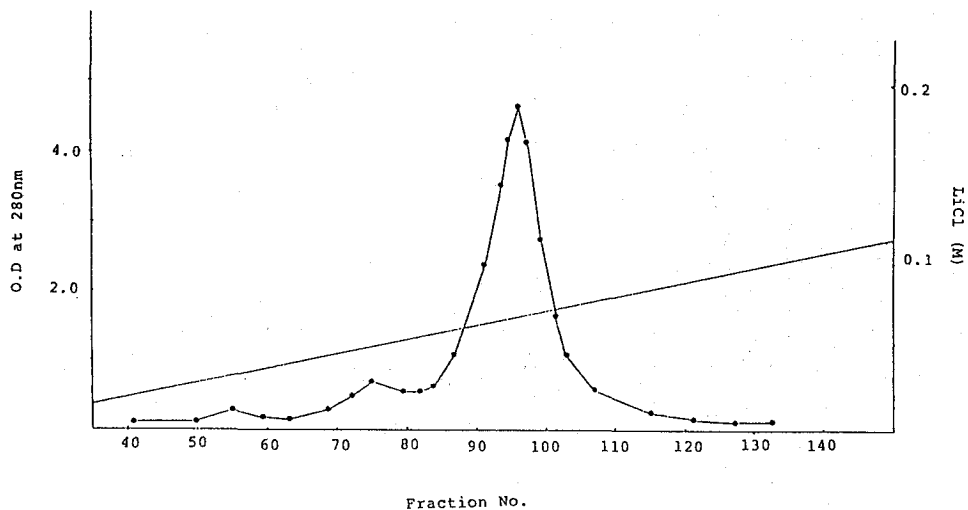


Fig.10

Purification of Sfericase C by Chromatography of DE Cellulose

Active fraction of peak 3 (Fig. 8) was pooled and dialized against 5mM Tris-HCl buffer pH8.0 containing 5mM calcium acetate, and loaded on a colmun (2x10cm) of DE-cellulose.

Sfericase C was eluted with a linear gradieut in LiCl concentration.

Table 7 Properties of Sfericase A.B.C

	A	B	C
Optimum pH	9.5	9.5	9.5
Optimum Temp(°C)			
With Ca ²⁺	55	55	55
With EDTA	15~20	15~20	15~20
Stability (pH)	6~11	6~11	6~11
Specific activity (caseinolytic. u/mg)	5600	5600	5800
Inhibitor	DFP.PMSF.SSI.Potato inhibitor		
1/2 cys/mole enzyme	2	2	2
Moleculor weight (gelfiltration)	27000	27000	27000
Isoelectric point	5.4	5.1	4.7
Immunoligical cross reaction	+	+	+

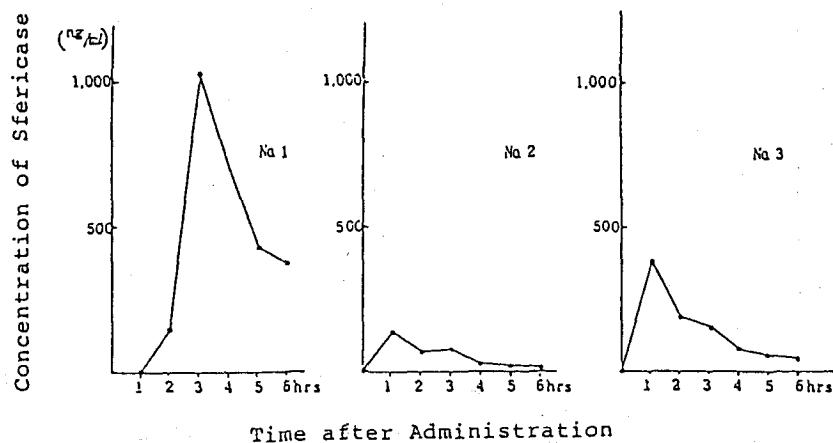


Fig.11

Sfericase Concentration in Serum after Intraduodenal Administration of Granules of Enteric-coated Sfericase in Rabbit. (Dosage:1000mg/body)

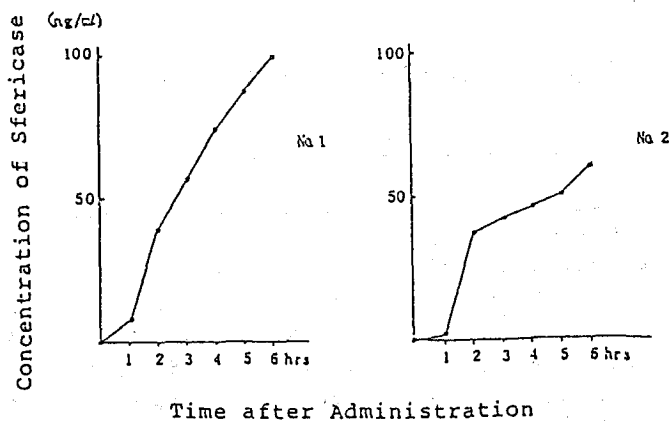


Fig.12

Sfericase Concentration in Serum after Intraduodenal Administration of Granules of Enteric-coated Sfericase in Rabbit (Dosage:100mg/body)

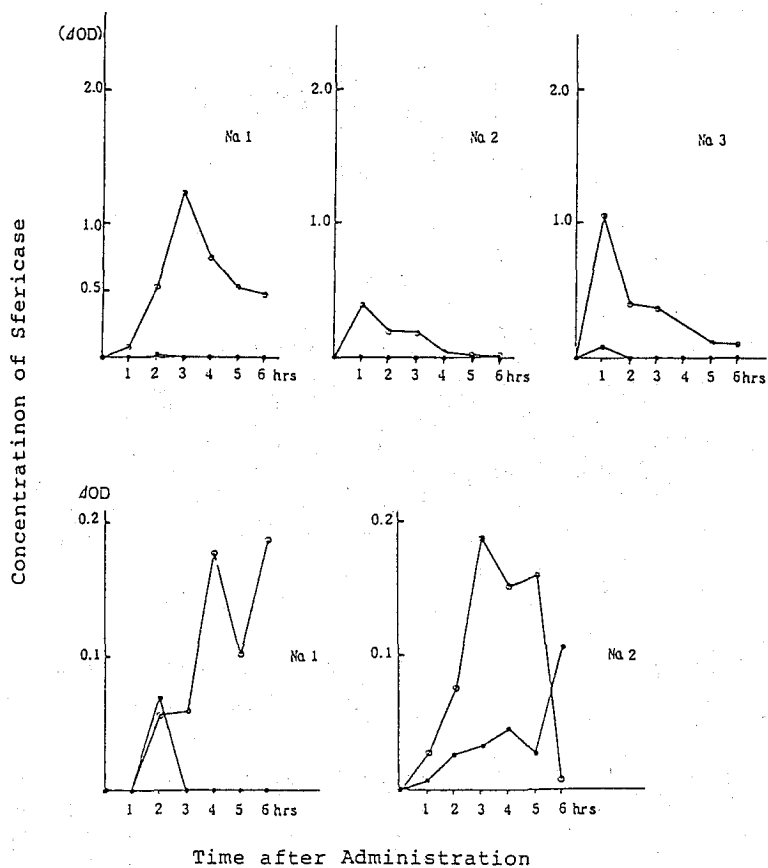


Fig.13

Inhibition of Sfericase Activity in Serum by Addition of Anti-Sfericase Serum.

Granules of enteric-coated Sfericase were administered to rabbits by the route of introduction and after various time, blood was drawn from the ear vein. Serum was mixed with one part of anti-Sfericase rabbit serum. The mixture was reacted overnight at 5°C and Sfericase activity was determined. Normal rabbit serum was used as control instead of antiserum.

- anti-Sfericase serum
- Normal serum

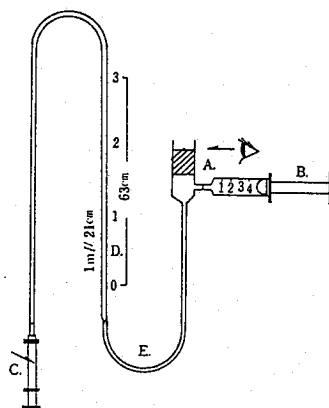


Fig.14 Equipment for measurement of rat paw volume.

- 1) Fill the bath (A) and the syringe (B) with 1% Tween 80 solution.
- 2) Lead Tween 80 solution to the pipette (D) by using the pipetter (C) and remove bubble between the line (A) and (D).
- 3) Adjust the meniscus of the pipette (D) to about zero by using the pipetter (C).
- 4) Adjust the meniscus of the bath (A) by using the syringe (B).
- 5) Measure the graduation of the pipette (D) by order of 10^{-3} ml.
- 6) Place the rat paw in the bath (A) and fit the meniscus and the mark on the rat paw.
- 7) Adjust the meniscus of the bath (A) by using the pipetter (C) and graduated the pipette (D).

$V - V_0$ is volume of the rat paw

V : volume graduated by 5)

V_0 : initial volume graduated by 5)

Table 8 Anti-edemic activity (%) of Sfericase by oral administration.

dose	N	Time (hr) after induction edema				
		2	3	5	7	24
10 mg/kg	10	45.4 ± 1.40	40.6 ± 2.11**	43.6 ± 2.27	43.0 ± 2.46	22.2 ± 3.11
25 mg/kg	20	33.7 ± 2.00**	34.1 ± 1.50**	34.6 ± 1.33**	35.9 ± 2.39**	16.5 ± 1.34**
50 mg/kg	25	34.1 ± 1.37**	32.1 ± 1.32**	33.1 ± 1.15**	31.0 ± 1.90**	15.3 ± 1.07**
100 mg/kg	20	35.6 ± 2.11**	35.8 ± 2.39**	43.8 ± 1.20**	33.7 ± 3.05**	17.3 ± 2.07**
control	30	40.6 ± 1.34	48.9 ± 1.48	47.8 ± 1.46	44.9 ± 1.34	21.7 ± 1.60

Ten minutes after administration of the antacid CaCO_3 (200 mg/kg), Sfericase was given to rats *per os*. Sixteen minutes after administration of Sfericase, a hammer (495g) was dropped from a height of 8cm and the volume of rat hind paw was measured at several intervals.

Table shows the percent of swelling of rat hind paw.

** Significant ($P > 0.01$) in comparison with the control which were given saline instead of Sfericase.

Table 9 Anti-edemic activity (%) of low molecular weight fractions from the sera of rats to which Sfericase was orally given.

Exp. No.	Sample	Time after induction of edema (hr)					
		1	2	3	4	5	6
1	Control	53.7 ± 7.3	61.3 ± 4.1	66.6 ± 4.1	67.2 ± 8.3	64.4 ± 5.5	65.8 ± 6.1
	Sample	47.8 ± 5.1	56.6 ± 4.5*	56.9 ± 7.2**	60.9 ± 8.3	61.7 ± 5.6	64.3 ± 6.2
2	Control	51.5 ± 5.2	68.5 ± 2.0	69.5 ± 4.3	69.5 ± 9.4	70.9 ± 6.0	70.9 ± 2.8
	Sample	47.2 ± 4.6	59.7 ± 4.8**	64.6 ± 3.8**	65.0 ± 5.2*	66.5 ± 5.4	70.7 ± 6.8
3	Control	42.7 ± 5.5	50.1 ± 8.6	59.8 ± 5.0	62.0 ± 3.8	55.4 ± 5.7	59.8 ± 7.6
	Sample	44.9 ± 5.9	52.1 ± 6.0	55.7 ± 6.1	56.9 ± 5.9*	54.9 ± 3.5	58.7 ± 5.9

Sfericase was orally given to fifty rats ten minutes after CaCO_3 (200 mg/kg/0.5 ml), an antacid.

Three hours after administration of Sfericase, rats were bled and administration of low molecular weight fractions were obtained from pooled serum by the method described in Table 3. Saline administered instead of Sfericase was used as control.

* Significant in comparison with control ($P > 0.01$)

** Significant in comparison with control ($P > 0.05$)

審査結果の要旨

プロテアーゼは抗炎症作用のあることが知られている。よって強い抗炎症作用を有し、副作用の少ないプロテアーゼを得る目的で、約3,500株の細菌を天然界よりスクリーニングし、*Bacillus sphaericus*に属する一菌株が強いプロテアーゼ生産菌であることを発見し、本酵素を Sfericase と命名した。本論文は、*Bacillus sphaericus*の生産するプロテアーゼ Sfericaseの酵素化学的、蛋白化学的性質、抗炎症酵素剤として経口投与された Sfericaseの消化管吸収の証明および抗炎症酵素剤としてのプロテアーゼの作用メカニズムに関して考察を加えた。

*Bacillus sphaericus*を培養し、新アルカリプロテアーゼ Sfericaseの結晶を大量に得る方法を確立した。得られた結晶中には、電気泳動的に少なくとも4種類のプロテアーゼが含まれている。DEAE-celluloseを用いて3種のプロテアーゼを単離した。得られたプロテアーゼは分子内に1/2 cysを2モル有し、主成分である Sfericase Aでは、1ヶのSS結合として存在していた。Sfericaseはセリン酵素であり、EDTAによる失活は分子内カルシウム原子のトラップによる極端な不安定化に起因した。Sfericase A, B, Cは電気泳動時の易動度のみ差を認め等電点はそれぞれ5.4, 5.1, 4.7でその他の諸性質は全く同一であった。以上述べたように Sfericaseは、従来知られているプロテアーゼと比較し極めてユニークな特徴を有していた。Acetyl Tyrosin Naphthyl Esterを基質とし、更に免疫学的手法の組合せで Sfericaseの腸管吸収を証明すると共に Sfericaseの抗炎症作用発現メカニズムは吸収された Sfericaseの直接の作用ではなく、吸収された Sfericaseがトリガーとなり、体内に新たな抗炎症物質を産生させることによるものであるとの見解を支持した。

以上本論文は、*Bacillus*属における新しい酵素を見出し、多量に得る方法を確立し、抗炎症作用の発現メカニズムを証明できたので、著者は農学博士の学位を授与する資格を有するものと判定した。