

原 著

Bacillus subtilis MT-19 株の産生するプロテアーゼの 部分精製と性状検査

高取美保¹⁾ 口羽由記²⁾ 美祢弘子³⁾

草加病院 栄養給食部¹⁾

岡山大学 医学部 公衆衛生学教室²⁾

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科³⁾

(平成7年10月18日受理)

Partial Purification and Examinations on the Properties
of Protease produced by *Bacillus subtilis* MT-19

Miho TAKATORI¹⁾, Yuki KUCHIBA²⁾ and Hiroko MINE³⁾

Department of Nutrition, Kusaka Hospital¹⁾

Department of Public Health

Faculty of Medicine

Okayama University²⁾

Department of Clinical Nutrition

Faculty of Medical Professions

Kawasaki University of Medical Welfare³⁾

Kurashiki, 701-01, Japan

(Accepted Oct. 18, 1995)

Key words : *Bacillus subtilis*, metal protease, isolated bacillus, casein agar plate

Abstract

Isolated airborne *Bacillus subtilis* MT-19 excreted protease into a chemically defined culture medium containing dialyzed enzymatic hydrolyzate of casein as a sole source of nitrogen.

The supernatant of the culture medium was lyophilized after dialysis against distilled water. Crude protease was then purified through chromatography on DEAE-Sephacel and several chemical properties were studied using the partially purified sample. Protease activity was assayed using S-2586 as synthetic enzyme substrate.

Molecular weight was estimated to be 20,000 by the method of casein-agar enzymography after SDS-PAGE and 21,000 by the method of gel-filtration using sephadex G-75.

It was clearly shown that the protease had an optimal activity at pH 9 and was specifically inhibited by the metal protease inhibitor, EDTA. The activity completely disappeared after heating 10 minutes at 80°C or 40 minutes at 70°C.

要 約

空中より分離した *Bacillus subtilis* MT-19 株は透析カゼイン酵素加水分解物を単一の窒素源とする合成培地中にプロテアーゼを産生する。培養上清を蒸留水に対して透析した後、凍結乾燥してプロテアーゼの粗標品を得た。粗プロテアーゼを DEAE-Sephacel を用いたクロマトグラフィーにより部分精製して各種の生化学的性状の検査をおこなった。一連の実験のプロテアーゼ活性は S-2586 を酵素の合成基質として測定した。

この結果得られたプロテアーゼは分子量が20,000 (SDS-PAGE 後カゼイン寒天転写法による) ~21,000 (Sephadex G-75 を用いたゲル濾過法による) と計算された。また、このプロテアーゼの至適 pH は9であり、メタロプロテアーゼの阻害剤である EDTA によってのみ活性化が低下する事が明確に示された。さらに、プロテアーゼ活性は、80°Cで10分間または70°Cで40分間の加熱処理により完全に消失した。

緒 言

著者らは、川崎医療福祉大学内でプロテアーゼ産生活性を有する20種類の *Bacillus* 属を分離し¹⁾、特に酵素活性の強い YK-11 株と MT-19 株について菌種の同定を行うとともにプロテアーゼ産生の最適条件を検討してきた²⁾。今回は *Bacillus subtilis* 種と同定された MT-19 株を用いて最適培養条件下で産生されたプロテアーゼの精製を試み、部分精製されたプロテアーゼについて各種の性状を検討したので報告する。

実験方法

1. プロテアーゼの精製

a) プロテアーゼ含有培養上清の作成

Bacillus subtilis MT-19 株 (以後 MT-19 と省略する) を 1%カゼイン酵素加水分解物 (シグマ社、透析して分子量8,000以下にしたもの:後述) を N源として添加した YEAST CARBON BASE (Difco 社、pH7.0に調整) を培地として29°Cで培養した。YEAST CARBON BASE 中には C源としてグルコースが 1%の割合に含まれている。カゼイン酵素加水分解物 8 g を 100ml の蒸留水に溶解後、分子量8,000カットの透析チューブに入れ、300ml の蒸留水を含むビーカー中で 4°Cで2日間透

析して約 2%のカゼイン酵素加水分解物を含む透析外液300mlを作成した。YEAST CARBON BASE 4.68 g を 200ml の蒸留水に溶解し、ここに透析した 2%カゼイン酵素加水分解物200mlを加え、5%Na₂HPO₄液を用いて pH7.0 に調整して培地を作成した。培地は濾過除菌し、MT-19 を移植後直径90mmのシャーレ20枚に20mlずつ分注し29°Cで3日間静置培養して培養菌液400mlを作成した。菌液のプロテアーゼ活性を測定後(後述)8,000回転30分の遠心により菌体を除去した培養上清を MT-19 の産生するプロテアーゼの出発材料とした。次に、培養上清400mlを透析チューブに入れ、4,000mlの蒸留水に対して4°Cで4日間(1日に2回蒸留水を交換した)透析内液を8,000回転で30分遠心して不溶物を除去し、凍結乾燥したものをプロテアーゼの粗標品とした。

b) DEAE-Sephacel 用いたプロテアーゼの精製

DEAE-Sephacel (Pharmacia 社) を 4 mM の Britton-Robinson の緩衝液 (pH7.0) で平衡化し、50×200mmのカラムに充填した。同緩衝液50mlに溶解したプロテアーゼの粗標品(400mlの培養上清より得られたもの)をこのカラムに負荷し、0 M, 0.25M, 0.5Mおよび1 M の4種類の濃度の NaCl を添加した同緩衝液

で吸着したタンパク質を分別溶出した。各濃度の NaCl を含む緩衝液をそれぞれ500mlずつ流した。各 NaCl 濃度の溶出液は50mlごとに分別収集してタンパク質量とプロテアーゼ活性の測定をおこなった。タンパク質量は280nmの吸光度により測定した。プロテアーゼ活性画分を集めて蒸留水に対して1日間、4℃で透析した後凍結乾燥して精製プロテアーゼ標品として以後の実験に使用した。

2. プロテアーゼ活性の測定法

プロテアーゼ活性は合成基質法により測定した³⁾。用いた合成基質は S-2586 (Chromogenix 社)であり、蒸留水に 5 mMとなるように溶解して基質液とした。緩衝液は40mMの Britton-Robinson の緩衝液を用いた。通常は pH7.0 の緩衝液を用いたが、プロテアーゼ活性に対する pH の影響を調べる場合には異なる pH の緩衝液を使用した。酵素液は各精製段階のものまたは凍結乾燥標品の場合には蒸留水に溶解したものを酵素液とした。96穴の ELISA プレートに基質液、緩衝液、酵素液を各50 μ lずつ入れ、さらに添加液として蒸留水を50 μ l追加し(阻害剤の効果を調べる場合には、ここに阻害剤を入れる)合計200 μ lとして37℃で60分間反応させた。反応終了は50%酢酸液100 μ lの添加によっておこなった。

酵素活性はマイクロプレートリーダーにより415nmの吸光度を測定してもとめた。コントロールとして、酵素液のかわりに蒸留水を入れたものを使用した。

3. ゲル濾過による分子量の測定

Sephadex G-75(Pharmacia 社)ゲルを10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) で平衡化し、15mm×500mmのカラムに充填した。精製酵素標品10mgを同緩衝液1mlに溶解し、ゲル上層部に負荷した。同緩衝液を0.5ml/分のスピードで滴下し、3mlずつ分画して280nmの吸光度によりタンパク質量を測定した。コントロールタンパク質としてリボヌクレアーゼA (シグマ社、分子量13,700) とウシ血清アルブミン (シグマ社、分子量67,000)、Vo 値測定用にブルーデキストラン2,000 (Pharmacia 社) のそれぞれ 5 mgを 1 mlの同緩衝液に溶解して精製酵素標品液と同様の分画をおこな

った。ブルーデキストラン量は631nmの吸光度により測定した。

4. SDS-PAGE およびカゼイン寒天転写による分子量の測定

二連電気泳動装置 (アート社, ラビダス・ミニスラブ) に10%アクリルアミドゲル2枚を装填し、SDS 添加 Laemmli 法により定電流40mAで90分電気泳動をおこなった。精製酵素標品およびコントロールタンパク質として Low Molecular Kit (Pharmacia) をそれぞれタンパク質濃度が1 mg/mlとなるように試料調整用溶液に溶解した。試料調整用溶液は0.5M Tris-HCl 緩衝液 (pH6.8) 10ml, 10% SDS 液10ml, グリセリン20ml, 0.1% BTB 液1mlと蒸留水59mlを混合して作成した。メルカプトエタノールは添加しなかった。

試料調整用溶液に溶解した精製酵素標品およびコントロールタンパク質液は加熱処理をほどこさず、そのまま電気泳動をおこなった。泳動終了後、1枚のゲルは定法に従いクマジーブリリアントブルーで染色して泳動バンド像を得た。もう1枚のゲルは、まずゲル中の SDS を除去する目的で1%トリトン添加100mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) で充分(トリトン緩衝液100ml中で4℃で30分間処理する操作を5回繰り返す)洗浄した。続いてトリトンを含まない同緩衝液でゲルを充分(100mlの緩衝液中で4℃で30分間洗浄する操作を5回繰り返す)洗浄してトリトンを除去した。洗浄ゲルはカゼイン寒天に密着させ(気泡が入らないように注意する)湿室内で37℃で3時間反応させた。この操作によりゲル中のタンパク質はカゼイン寒天に転写され、タンパク質中にプロテアーゼが存在すれば基質であるカゼインが溶解する⁴⁾。転写反応後、ゲルをクマジーブリリアントブルーで染色した。プロテアーゼ活性を示す泳動バンドの場所のみ染色されずに白く抜ける。カゼイン寒天は100mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) 90mlに1%カゼイン・ナトリウム (0.1% NaN 3 含有) 10mlと寒天 2 gを加え、加熱溶解したものを100mm×120mmの周辺にビニールテープを貼ったガラス板に流して作成した。

5. 生化学的性状の検査法

a) プロテアーゼ活性におよぼす阻害剤の影響の検査

精製したプロテアーゼの性状を調べる目的で4種類のプロテアーゼ阻害剤の影響を調べた^{5),6)}。N-ethylmaleimide (NEM:ナカラ社, チオールプロテアーゼの阻害剤)は40 μ g/ml (蒸留水), Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt (EDTA \cdot 2Na:Dotite社, メタロプロテアーゼの阻害剤)は40mM/ml (蒸留水), Soybean trypsin inhibitor (SBTI:シグマ社, セリンプロテアーゼの阻害剤)は40 μ g/ml (蒸留水), Pepstatin (シグマ社, アスパルテイツクプロテアーゼの阻害剤)は40 μ g/ml (メタノール)の各濃度に調整しておき, 実験方法2)の添加液の蒸留水のかわりに添加して酵素活性を測定した。

b) プロテアーゼ活性におよぼす pH の影響の検査

Britton-Robinson の pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 および 11 の 9 種類の緩衝液を準備し, 実験方法 2) の緩衝液のところに添加して酵素活性を測定した。

c) プロテアーゼ活性におよぼす加熱処理の影響の検査

精製酵素標品を pH7.0 の Britton-Robinson の緩衝液に溶解後, 50 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C, 70 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C, 90 $^{\circ}$ C および 100 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱処理, また 70 $^{\circ}$ C で 10 分, 20 分, 30 分, 40 分, 50 分 および 60 分加熱処理をおこなって実験方法 2) の酵素液のところに添加して酵素活性を測定した。

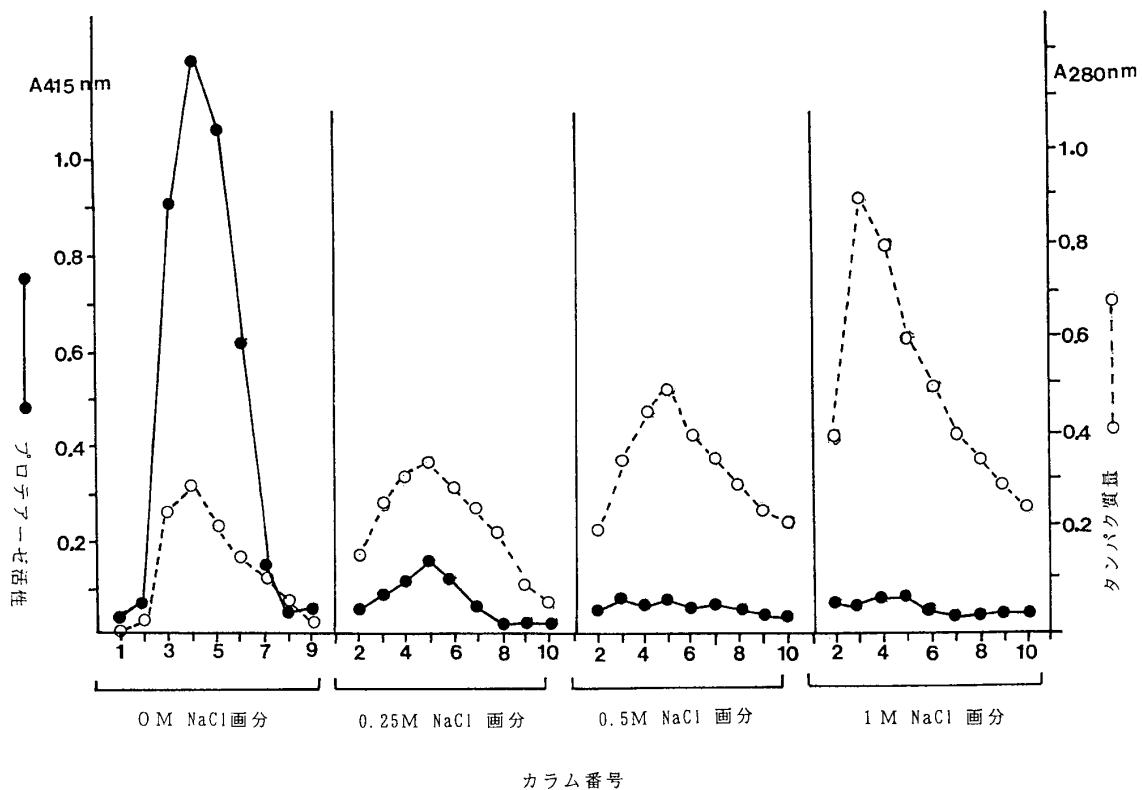


図1 DEAE-Sephacel を用いたプロテアーゼの精製

横軸の番号は4段階のNaCl濃度の分別溶出のカラム番号を示す。1種類のNaCl濃度は10本のカラムからなる。縦軸の黒丸印は415nmの吸光度で測定したプロテアーゼ活性を示す。白丸印は280nmの吸光度で測定したタンパク質量を示す。タンパク質は4種類のNaCl濃度のそれぞれに溶出されたが、プロテアーゼ活性は0M NaCl画分に溶出されたものが特に強かった。

実験結果

1. DEAE-Sephacel を用いたプロテアーゼの分画

0 M, 0.25M, 0.5Mおよび1 Mの NaCl を含む Britton-Robinson の緩衝液を流して, DEAE-Sephacel に吸着させた粗プロテアーゼを分画した結果を図1に示した. カラムに負荷した総タンパク質は約750mg(ウシ血清アルブミンをコントロールとして, タンパク質濃度と280nmの吸光度の関係を示すグラフを作成した)であり, 4分画のすべてにタンパク質が溶出された. しかしながら, 合成基質, S-2586 で測定したプロテアーゼ活性が強陽性であった分画は NaCl を含まない, 0 M画分のみであった. 0 M NaCl 画分10本の中の3~6の4本の小画分をプロテアーゼ活性の強い画分として集めた. 活性画分中のタンパク量は合計約75mgであり, 粗プロテア

ーゼ中の1/10量の精製プロテアーゼが得られた. 精製プロテアーゼ画分は蒸留水に対して透析後凍結乾燥し, 以後の実験に使用した.

2. ゲル濾過による分子量の測定

精製プロテアーゼおよびコントロールとして用いたリボヌクレアーゼA, ウシ血清アルブミン, ブルーデキストランのゲル濾過像を図2に示した. それぞれの溶出ピークから, MT-19の産生するプロテアーゼの分子量は約21,000と計算された⁷⁾.

3. カゼイン寒天転写法による分子量の測定

SDS-PAGEによる電気泳動後のタンパク質をカゼイン寒天に転写してプロテアーゼ活性を調べた結果, 分子量約20,000の場所に活性が存在する事が示された. この方法については再現性の高い結果が得るように現在実験条件の検討をおこなっている.

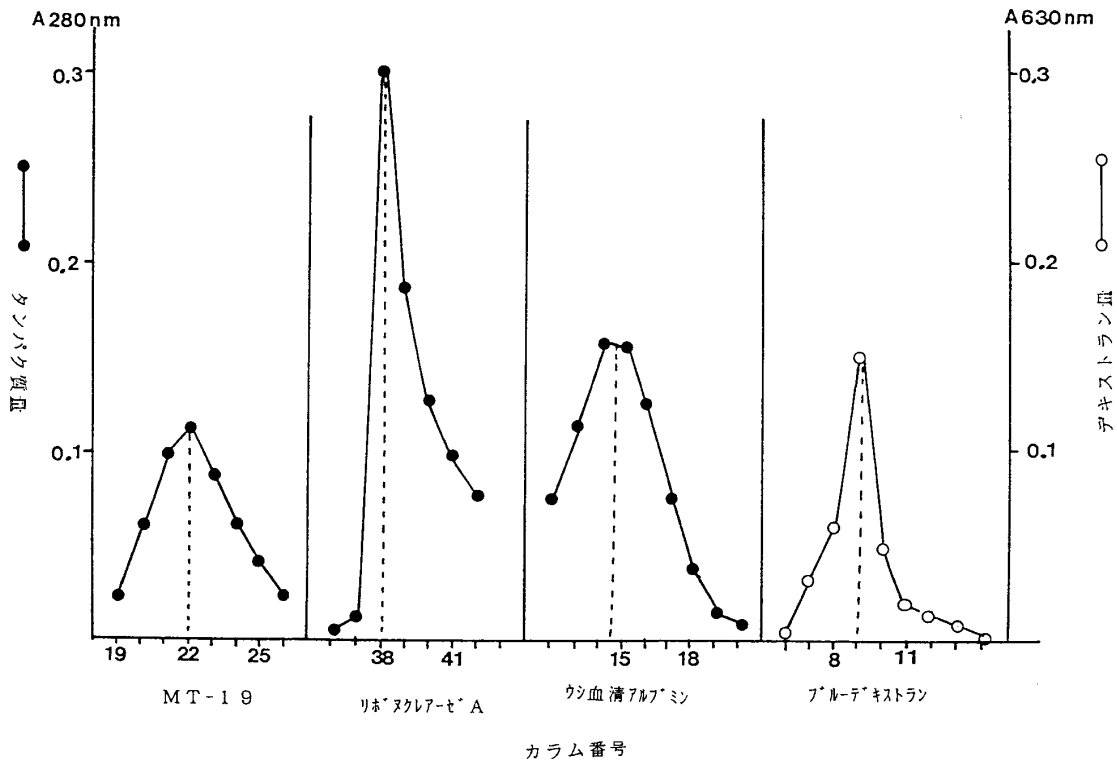


図2 Sephadex G-75 を用いたゲル濾過像

横軸の番号はゲル濾過をおこなった4種類の物質の溶出カラムの番号を示す. 左より, 今回精製をおこなっているプロテアーゼ (MT-19), リボヌクレアーゼA (分子量 13,700), ウシ血清アルブミン (分子量 67,000) およびブルーデキストラン2000 (分子量 2,000,000) である. 縦軸の黒丸印は280nmの吸光度で測定したタンパク質量を示す. 白丸印は630nmの吸光度で測定したブルーデキストラン量を示す. それぞれの溶出ピークのカラムを点線で示した.

4. プロテアーゼ活性におよぼす阻害剤の影響

4種類の阻害剤のプロテアーゼ活性におよぼす影響を表1に示した。阻害剤を加えないコントロールの活性を100とした場合の比較的な活性値で示されるように、プロテアーゼ活性はメタロプロテアーゼの阻害剤である EDTA によってのみ阻害を受けた⁸⁾。

5. プロテアーゼ活性におよぼす pH の影響

プロテアーゼ活性を9段階のpHで測定した結果を図3に示す。pH9における活性が最も強かった。pH5以下の酸性領域では急激に活性が低下するがpH7~pH11の中性からアルカリ性領域における活性はあまり大きくは変化しなかった。

6. プロテアーゼ活性におよぼす加熱処理の影響

50~100℃で10分間加熱処理をおこない、プロテアーゼ活性を調べた結果、表2-aに示すように80℃、90℃および100℃では活性が完全に消失した。70℃で活性が部分的に低下し、60℃以下では活性の低下はみられなかった。次に70℃で

10~60分間加熱処理をおこないプロテアーゼ活性の変化を調べた結果、表2-bに示すように70℃で40分間加熱処理する事よりプロテアーゼ活性は完全に消失する事が明らかとなった。

考 察

空中より分離した *Bacillus subtilis* MT-19 株はN源として、分子量8,000以下の透析カゼイン酵素加水分解物（各種の分子量のペプチドまたはアミノ酸の混合物と考えられる）を用いた合成培地（すべての含有物の分子量が8,000以下）中にプロテアーゼを合成分泌する。このため、産生されたプロテアーゼを培地成分の混入や菌体由来の高分子物質の混入無しに容易に精製できる。透析により培地成分や低分子（分子量8,000以下）の菌体産生物を除去した粗プロテアーゼ標品を DEAE-Sephacel で分画して得た精製画分はゲル濾過で単一の溶出ピークを示した。ただし今回は精製した標品についてのタンパク質以外の高分子物質の混入の有無についての検討をおこなっていないので、精製はまだ不十分であり、部分精製の段階であると考えている。

Sephadex-G75 を用いたゲル濾過像から計算した推定分子量が約21,000であるのに対してカ

表1 プロテアーゼ活性に及ぼす阻害剤の影響

左欄には阻害剤の種類とその終濃度を示した。右欄には415nmの吸光度で測定したプロテアーゼ活性を示した。（ ）は阻害剤を加えないコントロール活性を100%とした場合の相対活性を示している。メタロプロテアーゼの阻害剤として知られる EDTA によってのみプロテアーゼ活性の著しい阻害が見られた。

阻害剤 (濃度)	プロテアーゼ活性 A 415nm (相対活性：%)
コントロール (阻害剤なし)	1.493 (100%)
NEM (10 μ g/ml)	1.371 (91.8%)
EDTA (10mM/ml)	0.397 (26.6%)
SBTI (10 μ g/ml)	1.121 (75.0%)
Pepstatin (10 μ g/ml)	1.344 (90.0%)

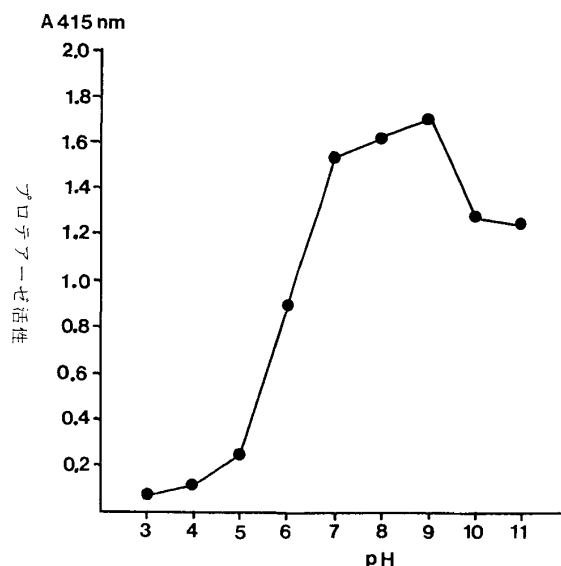


図3 プロテアーゼ活性に及ぼす pH の影響

横軸に pH 値を、縦軸に415nmの吸光度で測定したプロテアーゼ活性を示す。至適 pH は9であるが、pH7~pH11の広い範囲で高い活性が示された。

表2 プロテアーゼ活性に及ぼす加熱処理の影響

プロテアーゼを50℃～100℃の6段階の温度で10分間加熱処理した後未処理のものと比較した(表2-a)。プロテアーゼ活性は415nmの吸光度で表し、()内に未処理のコントロールの活性を100%とした場合の相対活性を%で表した。次に、プロテアーゼを70℃で10～60分の6段階の時間加熱処理した場合の活性の低下を調べた(表2-b)。この結果、プロテアーゼは80℃で10分以上、70℃で40分以上の加熱処理で完全に失活する事が明らかとなった。

表2-a

加熱処理条件	プロテアーゼ活性 A 415nm (相対的活性：%)
コントロール：未処理	1.400 (100%)
50℃, 10分	1.386 (99.0%)
60℃, 10分	1.377 (98.4%)
70℃, 10分	0.923 (65.9%)
80℃, 10分	0.042 (0%)
90℃, 10分	0.036 (0%)
100℃, 10分	0.033 (0%)

表2-b

加熱処理条件	プロテアーゼ活性 A 415nm (相対的活性：%)
コントロール：未処理	1.400 (100%)
70℃, 10分	0.923 (65.9%)
70℃, 20分	0.238 (17.0%)
70℃, 30分	0.091 (6.4%)
70℃, 40分	0.062 (0%)
70℃, 50分	0.022 (0%)
70℃, 60分	0.025 (0%)

ゼイン寒天転写法から求めた分子量は約20,000であった。ゲル濾過および SDS-PAGE のコントロールタンパク質として今回はリボヌクレアーゼAとウシ血清アルブミンを用いたが、今後はさらにタンパク質の種類を増やして検討を重ねる予定である。また、カゼイン寒天転写法の実験条件の改良も必要であると考えている。プロテアーゼ活性の測定は合成基質 S-2586 のみを

用いたが、他の合成基質⁹⁾やカゼインを基質とする方法¹⁰⁾も試みる予定である。

阻害剤を用いた実験に結果は、MT-19株の産生するプロテアーゼがメタロプロテアーゼである可能性を強く示唆しているが^{11),12)}、さらにメタロプロテアーゼの他の阻害剤や二価の陽イオンの影響等¹³⁾を調べて関係する金属の種類を決定する予定である。

文 献

- 1) 美祢弘子 (1994) プロテアーゼを産生する空中落下菌の分離と性状検査。川崎医療福祉学会誌, 4, 137-144.
- 2) 口羽由記, 高取美保, 美祢弘子 (1995) 分離 *Bacillus* の同定およびプロテアーゼ産生条件の検討。川崎医療福祉学会誌, 5, 175-181.
- 3) Hibino T (1984) Purification and characterization of keratin hydrolase in psoriatic epidermis: Application of keratin-agarose plate and keratin-polyacrylamide enzymo-graphy methods. *Analytical Biochemistry*, 147, 342-352.
- 4) Horie N, Fukuyama K, Ito Y and Epstein WL (1984) Detection and characterization of epidermal proteinases by polyacrylamide gel electrophoresis. *Comprehensive Biochemistry and Physiology*, 77, 349-353.
- 5) 坪井良治, 関口かおる, 小川秀興 (1992) *Trichophyton mentagrophytes* の産生するプロテアーゼ, 特に酸性プロテアーゼの生物的性状とその意義。日本医真菌学雑誌, 33, 147-151.

- 6) 坪井良治, 栗田依り幸, 松田和子, 根本 信, 小川秀興 (1984) *Candida albicans* に対する *protease inhibitor* の抗真菌作用について. 日本医真菌学雑誌, **25**, 387—390.
- 7) 志村憲助, 江尻慎一郎, 吉田充輝, 石原弘章 (1990) 生物化学実験法IIゲル濾過法. 第2版, 学会出版センター, 東京.
- 8) 佐々木寛 (1990) プロテアーゼの分類と生体内分布. プロテアーゼとそのインヒビター. 早石修監修, メディカルビュー社, 東京. pp11—25.
- 9) Tsushima H, Mine H, Hoshika K, Kawakami Y, Hyodoh F and Ueki A (1992) *Candida albicans* produces a cystatin-type cysteine proteinase inhibitor. *Journal of Bacteriology*, **174**, 4807—4810.
- 10) Tsushima H and Mine H (1995) Cleavage of human big endothelin-1 by *Candida albicans* aspartic proteinase. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **11**, 69—72.
- 11) Priest FG (1977) Extracellular enzyme synthesis in genus *Bacillus*. *Bacteriological Review*, **41**, 711—753.
- 12) Yang MY, Ferrati E and Henner DJ (1984) Cloning of the neutral protease gene of *Bacillus subtilis* and the use of the cloned gene to create an *in vitro*-derived deletion. *Journal of Bacteriology*, **160**, 15—21.
- 13) Tsuru D, Imano S, Morikawa S, Yoshimoto T and Ishiguro M (1993) Zinc protease of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*: Construction of a three dimensional model and comparison with thermolysin. *Journal of Biochemistry*, **113**, 101—105.