

Staphylococcus epidermidis の産生する protease の性状について

二宮健司*¹ 美祢弘子*²

要 約

健康なヒトの右手人差し指から90株の *Staphylococcus epidermidis* を分離した。CaCl₂-カゼイン平板法によって protease 産生量の測定をおこなったところ、90株中84株(93.3%)が活性を示した。活性の最も強かった UNO67株を選び以後の実験に使用した。UNO67株の培養上清を protease 液として生化学的性状の検査をおこなった。まず最初に protease の耐熱性テストをおこなった。70℃10分間の加熱処理で protease 活性が完全に失われることから、本 protease は易熱性であると判定した。次に protease の pH 依存性を調べたところ至適 pH は広い中性域であった (pH5~9)。

Protease 活性は EDTA, phosphoramidon, phenanthroline および HgCl₂ によって阻害され NEM, pepstatin A および SBTI では阻害を受けないことから、本 protease は metaroprotease であると判定した。定性的な金属インディケーター (メルコクアント) により含有金属種を検討したところ Al, Co, Cu, Fe, Mn および Pb に対する反応は陰性であったが Zn に対する反応だけは陽性であった。

透析した UNO67株の培養上清を DEAE-Sephadex を用いて精製した。Protease 活性は0.2M KCl で溶出される画分に局在していたため、この画分を凍結乾燥し精製 protease とした。

Protease は SDS-PAGE により一本のタンパク質バンドとなり、精製されていることが示された。

結 言

生体が外界に接する部位、すなわち鼻腔、咽頭、口腔、腸管、皮膚、膣等には常在菌叢が存在する。常在菌叢を構成する微生物は定住菌と通過菌に大別される。定住菌は宿主に対する共生関係が強く通過菌は弱い。ヒトの皮膚を例にすると、定住菌としては coagulase negative *Staphylococci* (CNS), *Propionibacterium acnes*, *Micrococcus* spp., *Pityrosporum* spp. などがあげられ、通過菌としては coagulase positive *Staphylococci* (CPS) の一種である *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Escherichia coli*., *Pseudomonas* spp., *Candida* spp. などの数多くの微生物があげられる¹⁾。

われわれは、*Staphylococcus* 属のうち *S. aureus* は通過菌であるのに、CNS は定住菌となることに興味を持った。そこで、18種類の CNS の中で最も分離頻度の高い²⁾ *S. epidermidis* を実験材料に選び、定住のメカニズムについて検討を行うこととした。ヒ

ト皮膚には数種類の protease や protease inhibitor が存在して外来の微生物の定着を阻止すると考えられているので³⁾、*S. epidermidis* の数多い定住因子の中から protease に着目した。

今回は健康なヒト手指より分離・同定した数多くの *S. epidermidis* の protease 産生力を測定比較し、protease の産生力の強い株を選び、その産生する protease を精製し、生化学的性状について調べた結果を報告する。

実験方法

1. ヒト皮膚よりの *Staphylococcus epidermidis* の分離同定

健康なヒト23名の右手人差し指を Brain Heart Infusion Agar 培地 (BHIA) になすりつけて35℃で48時間培養して肉眼により白色、小型、smooth な性状を示す colony を選択した。つぎに Gram 染色をほどこし、ブドウの房状の形態と Gram positive の性状を顕微鏡で調べ *Staphylococcus* 属であることを確認した後、coagulase test⁴⁾を行い、coagulase neg-

*1 川崎医療福祉大学大学院 医療技術学研究科 臨床栄養学専攻 *2 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科
(連絡先) 美祢弘子 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学

ative 株を選択した。Coagulase positive の control としては *Staphylococcus aureus* 209p 株を用いた。このようにして coagulase negative *Staphylococci* (CNS) を選択した後、市販の API-STAPH (日本ビオメリユー・バイテック株式会社) を使用して菌種同定をおこなった⁵⁾。今回は同定確率90%以上のものを *S. epidermidis* 菌株とした。

分離 *S. epidermidis* 株は0.01M の場合に CaCl_2 を添加した保存用の BHIA に移植培養後、4℃で保存し、1ヶ月に1度継代培養を行った。各種性状検査を行う場合には保存株を BHIA に移植し35℃で24時間培養した新鮮培養菌を用いた。

2. Protease 活性の測定

Protease 活性の測定は CaCl_2 casein 平板法⁶⁾ によった。まず分離 *S. epidermidis* 株を90mm のシャーレに分注した20ml の casein 液体培地で35℃で4日間培養して培養菌液を作成した。Casein 液体培地は N 源として1% enzymatic hydrolysate of casein (Sigma社) C 源として0.25% glucose, 塩類ビタミン液として0.17% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate (Difco社) を含み、0.5% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を用いて pH を7.0に調整したものである。

培養菌液を3,000rpm 15分間遠心して菌体を除去した培養上清の protease 活性を測定した。 CaCl_2 -casein 平板培地は直径90mm のシャーレに1% casein sodium 液 (nutrose: NAKARAI 社, 0.01% NaN_3 添加) 2 ml, 0.1M CaCl_2 液 2 ml, 0.2M Tris HCl buffer (pH7.0) 2 ml, 蒸留水 6 ml および2% 寒天液10ml を混合して作成した。白濁した CaCl_2 -casein 平板培地が固まったら直径5mm の寒天穿孔吸引管で6~7個のホールを作成した。各ホールに培養上清を50 μl ずつ分注した。35℃で24時間培養後、培養上清に protease 活性があれば活性の強さに応じた透明環がホール周辺に形成される。菌株によっては透明環の境界線が不明瞭なため、今回は透明環の直径の大小を肉眼で判定してランク0からランク4の5段階に分けて比較した。

3. *S. epidermidis* の protease の生化学的性状の検査

分離株のうち最も protease 活性の強かった株の casein 液体培地の培養上清を用いて protease の性状を調べた。Protease の熱耐性の測定は培養上清を5本のチップに500 μl ずつ分注し、70℃に調整したウオーターバスに一定時間つけておこなった。未処理のものをコントロールとし、ウオーターバスから5分、10分、15分、20分後にそれぞれ取り出し氷冷水中に置いた。これら処理液を CaCl_2 -casein 平板

培地のホールに50 μl ずつ分注し、35℃で24時間培養して protease 活性を測定比較した。

Protease の至示適 pH を検査するためにはまず pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11の9種類の1/25M Britton Robinson の広域 buffer を準備した。この buffer 2 ml を CaCl_2 -casein 平板培地の Tris-HCl buffer 2 ml に変えて、pH の異なる9種類の CaCl_2 -casein 平板培地を作成した。平板培地の中央に1個ずつホールを開け、ここに培養上清50 μl を注入し、35℃で24時間培養して protease 活性を測定比較した。

Protease の性状を調べるため7種類の protease inhibitor を準備した。EDTA2Na (Dotite社) は40mM 水溶液, pepstatin A (Sigma社) は20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ メタノール液, N-ethylmaleimide (NAKARAI社) は20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 水溶液, Soybean Trypsin Inhibitor (Sigma社) は20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 水溶液, phosphoramidon (Sigma社) は40mM 水溶液, phenanthroline (Sigma社) は40mM DMSO 液, HgCl_2 は5mM 水溶液とし、マイクロプレート中で前記の inhibitor と培養上清を等量比で混合した後、これら混合液を50 μl ずつ CaCl_2 -casein 平板培地のホールに分注し35℃で24時間培養して protease 活性を測定比較した。コントロールとしては水溶液の場合には蒸留水を、pepstatin の場合にはメタノールを、phenanthroline の場合には DMSO を阻害剤に変えて等量加えた。

4. Protease の精製

Enzymatic hydrolyzate of casein (EHC) 50g を500ml の蒸留水に加え加熱溶解し (10% EHC 液), 分子量8,000カットの透析チューブに入れ、外液に4倍量の2,000ml の蒸留水を入れて4℃で2日間透析を行った。この操作で分子量8,000以下の EHC の透析外液2,000ml (2% EHC) を得た。このようにして得られた分子量8,000以下の透析外液 EHC を N 源とした casein 液体培地4,000ml を作成し、protease 産生活性の高かった菌株を移植して35℃で4日間培養した。Protease 活性が十分高いことを確認後、8,000rpm で30分間遠心して培養上清4,000ml を得た。培養上清を分子量8,000カットの透析チューブに入れて4℃で4日間透析を行い、培地に含まれる低分子物質を除去した。最後に透析外液を蒸留水から5mM CaCl_2 添加, 10mM Tris HCl buffer (pH 7.0)⁶⁾ (以後 CaCl_2 -Tris HCl buffer と省略する) に対し4℃で1日間透析後、内液4,000ml を透析菌液として protease 精製実験に使用した。

Protease の精製には DEAE Sephacel (Pharmacia Biotech社) を用いて行った⁷⁾。ブツ

フナーロートに CaCl_2 -Tris-HCl buffer で平衡化冷却した DEAE Sephacel を600ml 充てんし、ここに4,000ml の透析菌液に含まれるタンパク質を吸着させた。続いて KCl を0M, 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M の6段階の濃度で加えた CaCl_2 -Tris HCl buffer を4,000ml ずつ適下して DEAE Sephacel に吸着したタンパク質を分別溶出した。濾液及び6種類の溶出液中のタンパク質量は280nm の吸光度 (A_{280}) で測定した。各溶出液の protease 活性は CaCl_2 -casein 平板を用いて測定した^{8,9)}。予備実験により、protease の活性を有するタンパク質は0.1M KCl 添加 CaCl_2 -Tris HCl buffer で溶出されることが示されたので、この分画はさらに400ml ずつの小分画に分けてタンパク質量及び protease 活性を測定した。最後に活性の最も高かった小分画400ml を4℃で2日間透析して KCl や CaCl_2 などの塩類を除去した後、精製 protease として20ml ずつ遠沈管に分注し-80℃で凍結保存した。一部は凍結乾燥粉末として実験に用いた。

5. SDS-PAGE による protease の精製の確認

精製 protease の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)¹⁰⁾をおこなった。ラピダス2連ミニスラブ (AE-6400: Atto 社) と高精度安定化電源装置 (MP-7612D: Marysol 社) を使用して常法に従い電気泳動を行った。コントロールタンパク質としては carbonic anhydrase (分子量21,000: Sigma 社) と phosphorylase b (分子量97,400) を用いた。凍結乾燥した精製 protease をコントロールタンパク質2種類とともにそれぞれ試料処理液に溶解後、加熱処理をおこなった。1枚のゲルあたり20mA の定電流で約70分泳動後、染色・脱色し、デジタルカメラでタンパク質バンドパターンを撮影した¹¹⁾。

6. 含有金属の検出

凍結乾燥粉末とした精製 protease を10mg/ml となるように蒸留水に溶解し、ポアサイズ0.45 μm のフィルター (Millipore 社) で濾過したものを検査材料とした。Al, Co, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn の7種類の金属定性検出紙 (Merck 社) を用いてストリップの着色の程度をカラースケールを参照として肉眼で判定した。

実験結果と考察

1. 分離 *Staphylococcus epidermidis* の protease 活性

23名の健康なヒトの右手人差し指より肉眼により白色、小型、smooth な colony 性状を示す菌株を191個選択した、Gram 染色をほどこして顕微鏡観

察を行った結果、95.3%に相当する182株が *Staphylococcus* 属であった。さらに coagulase test を行ったところ、88.5%に相当する169株が coagulase negative *Staphylococci* (CNS) であった。169株の CNS を API-STAPH を用いて菌種同定を行った結果47.1%に相当する90株が確率90%以上の *S. epidermidis* と同定された。以後の protease 産生実験はこの90株の *S. epidermidis* を用いて行った。

Protease 活性を0～4の5ランクに分類したところ、全く活性の見られなかったランク0には6株 (全体の6.7%) が、活性の弱いランク1には17株 (18.9%)、同様にランク2には50株 (55.5%) が、活性の強いランク3には9株 (10%)、同様にランク4には8株 (8.9%) であった。ランク2に相当するものが最も多かった。また全体の93.3%は強弱はあるものの protease を産生することが判明した (図1)。ランク4に属する8株の中から安定して活性の強かった UNO67株を選び、以後の protease の性状検査実験に使用した。

2. *S. epidermidis* UNO67株の産生する protease の生化学的性状

Protease を70℃で処理したところ、10分間の処理で完全に失活し、5分間処理でも殆どの活性が失われることが示された (図2)。このように今回実験した protease は易熱性であると判定した。至適 pH を検討した結果、pH 5～pH 9 の広い中性域において同等の強い活性が見られた。PH 3, pH 4 の酸性域および pH10, pH11のアルカリ性域では活性が弱いか殆ど見られなかった (図3)。この結果より今

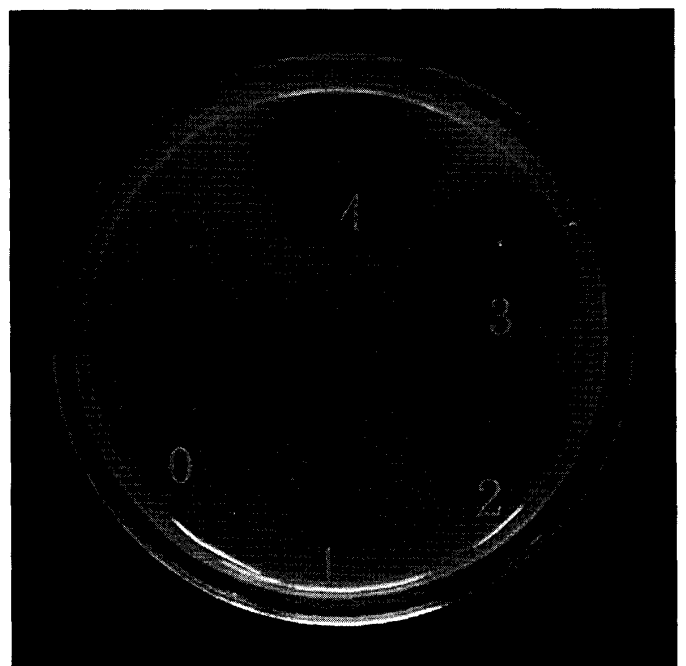


図1 protease 活性のランク分け
図中の数字はそれぞれランクをあらわす。数字が大きいほど活性が強い。

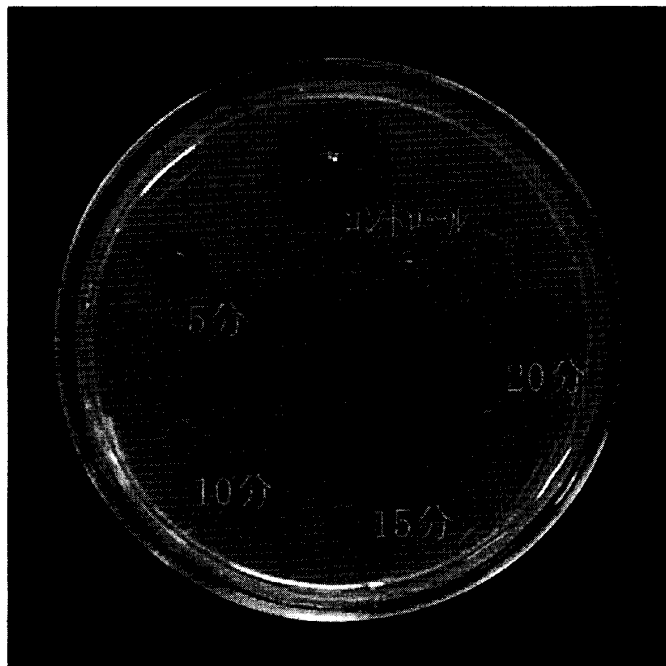


図2 protease 活性に及ぼす熱処理の影響
図中の数字は70℃での処理時間を表す。コントロールは未処理 protease の活性を示す。70℃で10分間処理すると protease 活性は完全に失われた。

回実験した protease は中性 protease であると判定した。

次に protease を分類するため metaro protease の inhibitor である EDTA, aspartic protease の inhibitor である pepstatin A, serine protease の inhibitor である SBTI, cysteine protease の inhibitor である NEM による阻害作用を調べたところ(図4), EDTA においてのみ強い阻害が見られたため, metaro protease であると判定した。確認のため, metaro protease の inhibitor として知られる phosphoramidon, phenanthroline, HgCl_2 の阻害効果も調べたところ(図5), phosphoramidon と HgCl_2 において EDTA 同等の, phenanthroline では EDTA よりやや弱い阻害作用が見られた。これらの実験結果から今回われわれが *S. epidermidis* UNO67株から得た protease は中性で易熱性の metaro-protease^{12,13)}であると判定した。

3. Protease の精製

S. epidermidis UNO67株の casein 培地培養上清

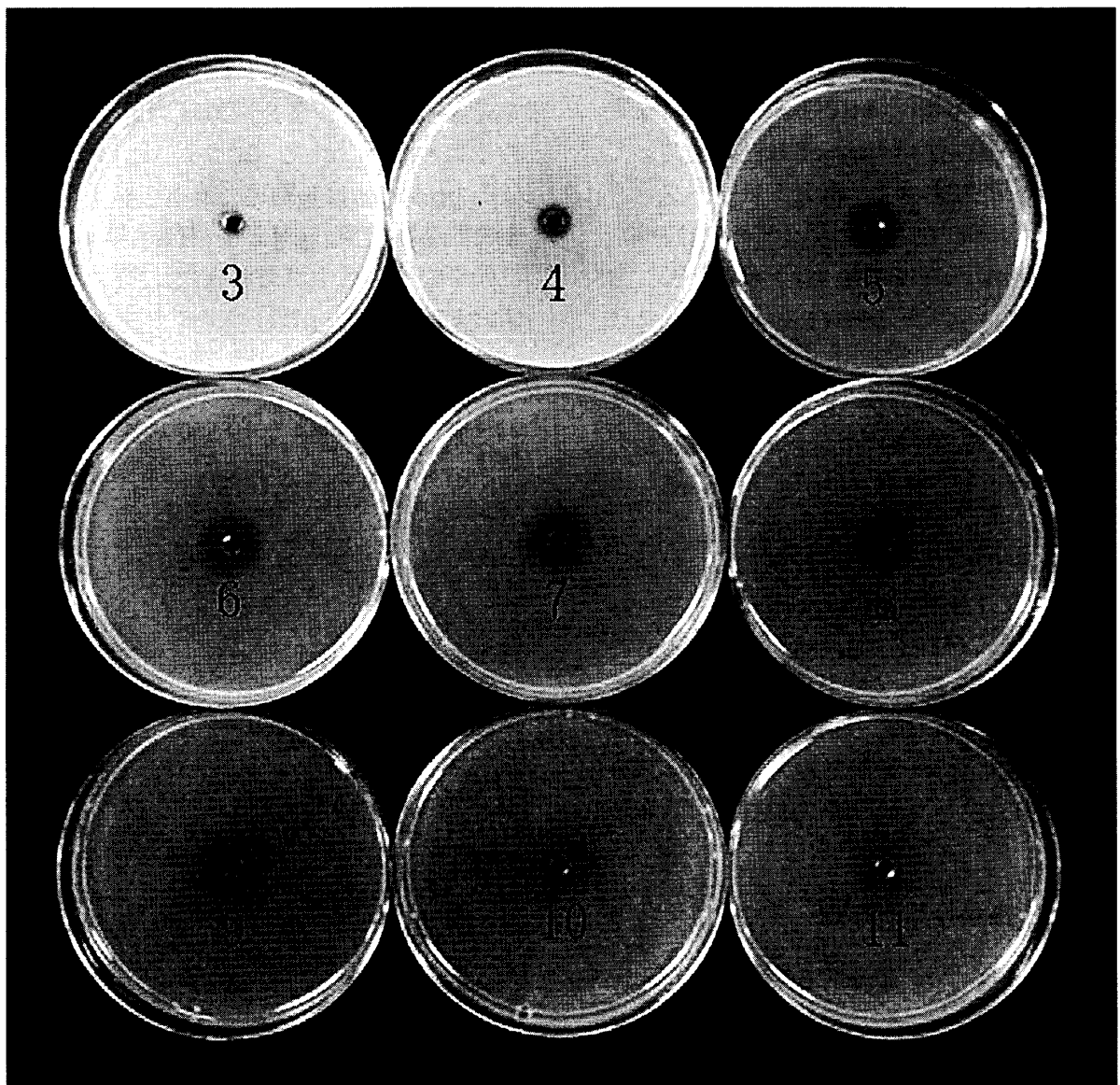


図3 protease 活性に及ぼす pH の影響
図中の数字はそれぞれの培地の pH をあらわす。pH5~9の中性域においてはほぼ強い活性が見られる。

の透析菌液4,000ml ($A_{280} = 0.471/\text{ml}$) を CaCl_2 -Tris HCl buffer で平衡化した後、DEAE Sephacel 600ml に滴下・吸着させた。得られた濾液4,000ml の A_{280} は $0.141/\text{ml}$ であり、29.9%のタンパク質は吸着せずに濾液中に出て、残る70.1%のタンパク質

が樹脂に吸着した。続い5段階の濃度の KCl を加えた同上 buffer で分別溶出した結果、吸着タンパク質の87.8%のタンパク質は分別溶出され、残る12.2%のタンパク質は樹脂に吸着したままであった。分別溶出された溶出液の中で protease 活性を示したのは

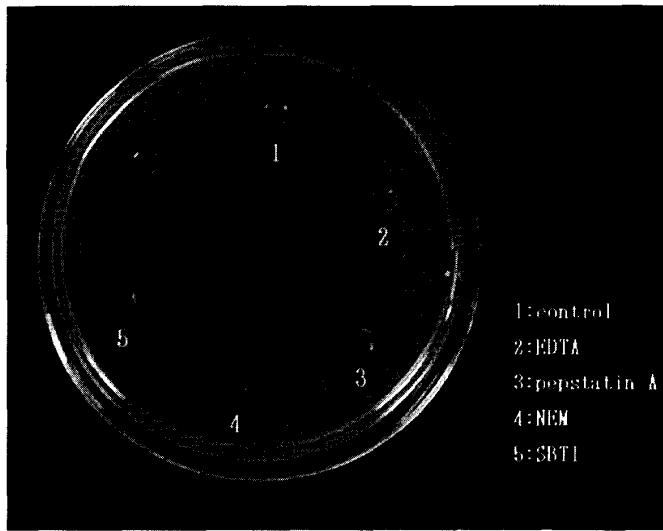


図4 protease 活性に及ぼす各種 protease inhibitor の影響
inhibitor の濃度については本文参照。EDTA のみが強い活性阻害を示す。

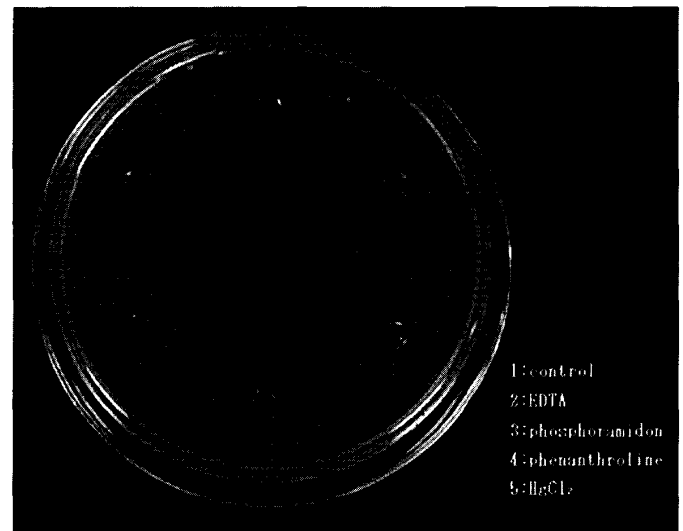


図5 protease 活性に及ぼす metalloprotease inhibitor の影響
inhibitor の濃度については本文参照。強弱のあるもののすべての inhibitor が活性阻害を示す。

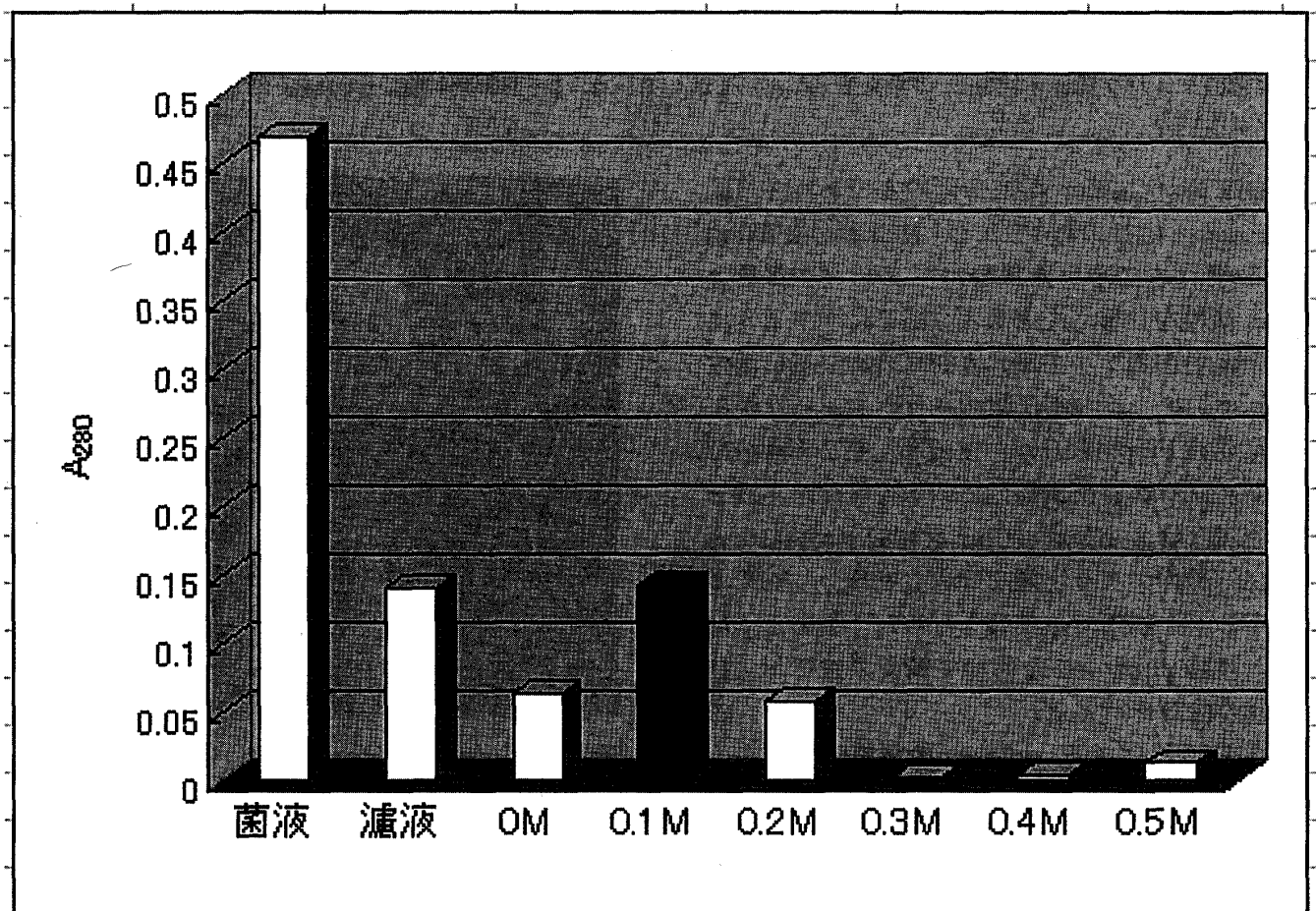


図6 protease の DEAE Sephacel を用いた分画溶出
横軸の0M~0.5M はそれぞれの濃度の KCl を添加した buffer を用いた場合の溶出液、濾液は最初の吸着操作で素通りして溶出した溶出液を示し、縦軸はそれぞれの溶出液のタンパク質量を280nm の吸光度 (A_{280}) であらわしている。図中0.1M に KCl 溶出画分にも protease 活性 (図中黒塗り) が局在している。

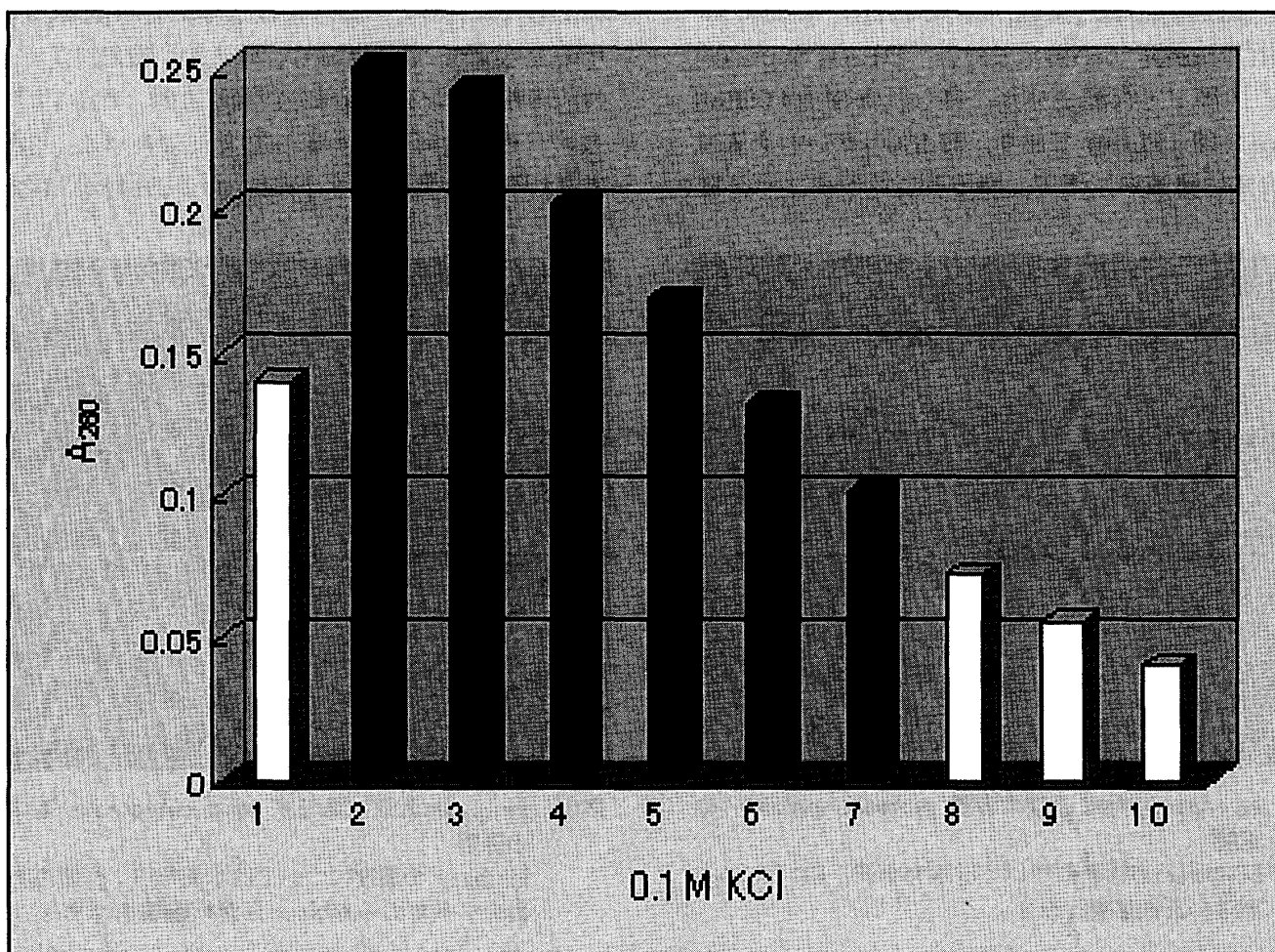


図7 DEAE Sephacel 吸着 proteaseの0.1M KCl 添加 buffer による溶出

横軸の数字は DEAE Sephacel に吸着した protease の0.1M KCl 添加 buffer による溶出小分画を示す。縦軸は各小分画のタンパク質量を280nm の吸光度 (A_{280}) で示している。2～7の小分画に protease 活性が(図中黒塗り)が局在している。

0.1M KCl 添加 buffer 溶出分画のみであった(図6)。Protease 活性のあった0.1M KCl 画分4,000ml を400ml ずつの10小分画に分けてタンパク質量と protease 活性を比較したところ、図7に示すように第2小分画から第7小分画にかけて protease 活性が見られた。第1小分画に溶出されたタンパク質に protease 活性が見られなかったため、第2小分画は2種類のタンパク質が混在している可能性があると考え、今回は第3小分画400ml を精製 protease として選び、透析により塩類を除去した後、 -80°C で凍結保存し、一部は凍結乾燥を行った。このようにして得た精製 protease を用いて精製の確認および含有金属の検査を行った。

4. SDS-PAGE による protease の精製の確認

精製 protease と2種類のコントロールタンパク質の SDS-PAGE 像を図8に示す。分子量97,400のフォスクホリラーゼbと分子量29,000の carbonic anhydrase のバンド同様、精製 protease のバンドは1本であり、精製されていることが確認された¹⁴⁾。細菌由来の protease については分子量17,000～540,000^{15,16,17)}の様々なものが報告されているが、

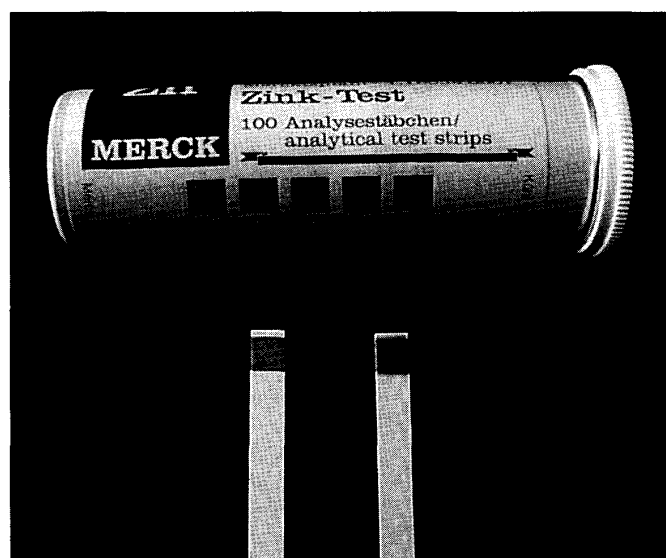


図9 protease の Zinc テスト

下左のストリップはコントロール、下右のストリップは protease を滴下後 Zn の呈色反応を行ったものである。上のカラースケールに示されるように下右のストリップが Zn 陽性を示している。

一般には分子量30,000近辺であり、分子量100,000以上のものは2量体、4量体、8量体になっているものが多い^{18,19,20)}。精製 protease の SDS-PAGE で

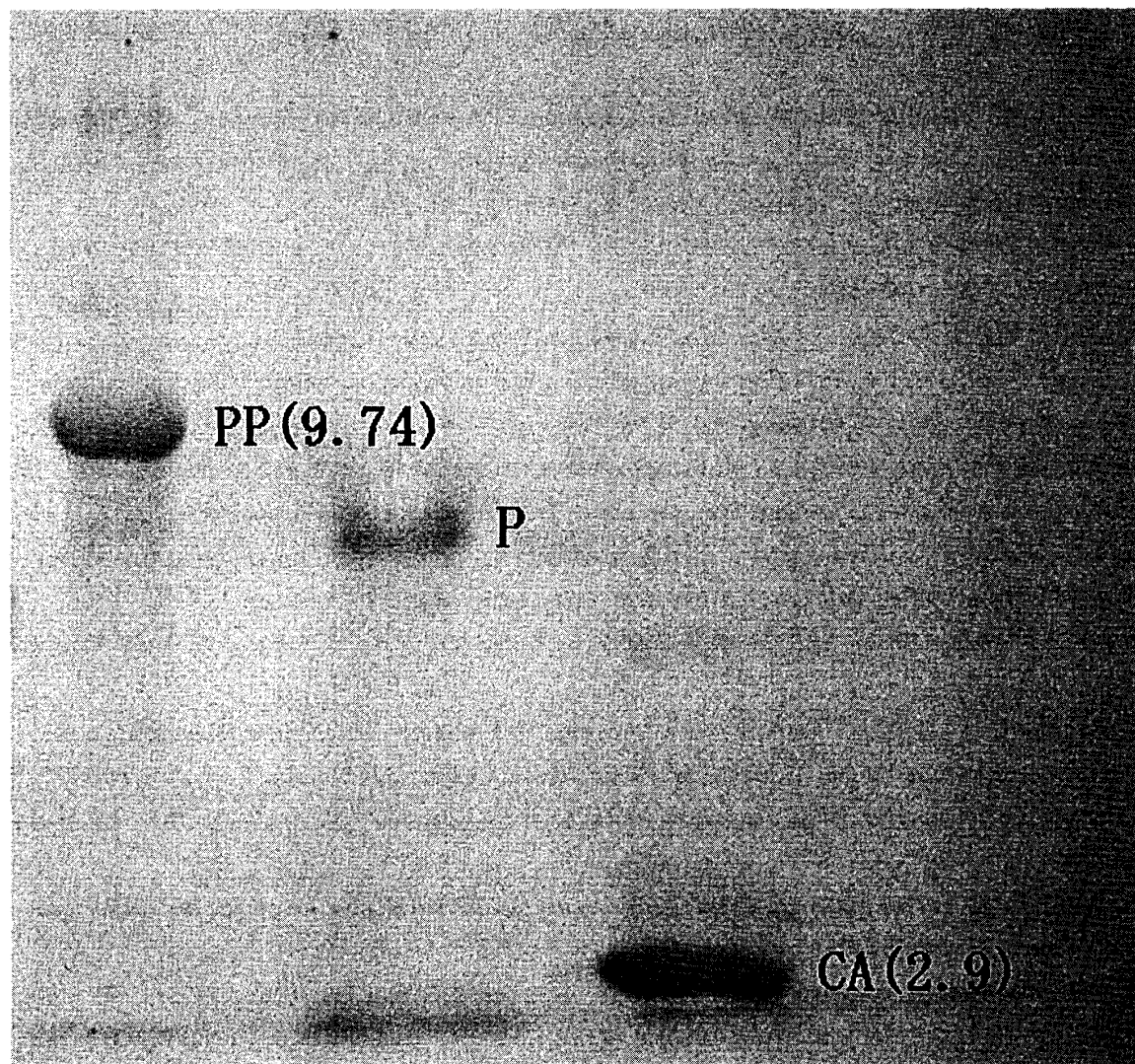


図8 精製 protease の SDS-PAGE 像

精製 protease (P) を2種類のコントロールタンパク質, phosphorylase b (pp: 分子量97,400) と carbonyl anhydrase (Ca: 分子量29,000) とともに電気泳動した結果, protease が単一バンドであることが示された。

得られたバンドがやや不明瞭であるため, 今回は分子量の計算をおこなわなかった。今後, SDS 処理を強力にするなどして明瞭なバンドを得て分子量の測定をおこないたい。

5. Protease 含有金属の推定

メルコクアント定性濾紙を使用して protease 中の Al, Co, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn の7種類の金属の含有の可能性を調べた。この結果, Zn テストにお

いてのみ陽性の反応が見られ(図9), 残る6種類の金属テストは陰性であった。今回の実験により *S. epidermidis* UNO67株の産生する metaro protease の金属は Zn と判定した。文献的にも細菌の産生する metaro protease の含有金属は Zn が最も普遍的である^{21,22,23)}。今後は原子吸光法等により定量的な含有金属の検出を行いたい。

文 献

- 1) 朝田康夫(1978)臨床細菌学・講義編。小沢 敦, 波岡茂夫, 坂崎利一, 松本文夫, 玉熊正悦編, 講談社サイエンティフィック, 東京, pp71-83.
- 2) 田中美智男, 浦 敏郎(1996)コアグラゼ陰性ブドウ球菌に関する研究: 臨床情報菌株情報から見たCNS感染症分析。メディアサークル, 41, 430-439.
- 3) 前田 浩(1995)微生物プロテアーゼの病原性に関する研究。日本細菌学雑誌, 50, 921-936.
- 4) Cowan ST(1980)特徴づけのテスト。Cowan ST 編, 坂崎 利一訳, 医学細菌同定の手引き, 第2版, 近代出版, 東京, pp245-245.
- 5) Gemmell CG and Dawson JE(1982) Indification of Coagulase-Negative Staphylococci with the APISTAPH system. *Journal of Clinical Microbiology*, 16, 874-887.

- 6) 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**(1), 175-181.
- 7) Drapeau G (1976) Protease from *Staphylococcus aureus*. *Methods in Enzymology*, **45**, 469-475.
- 8) Arridson SO (1983) Extracellular enzymes from *Staphylococcus aureus*. In: Jeljaszewics J, ed. *Staphylococci and Staphylococcal Infections*, Academic Press, London, pp745-808.
- 9) 高取美保, 口羽由記, 美祢弘子 (1995) *Bacillus subtilis* MT-19株の産生するプロテアーゼの分離精製と性状検査. 川崎医療福祉学会誌, **5**(2), 145-152.
- 10) 五十嵐富三男, 中山年正 (1982) スラブ式 SDS-PAGE. 臨床検査, **26**, 1508-1515.
- 11) Heussen C and Dowdle EB (1980) Electrophoretic analysis of Plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium Dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry*, **102**, 196-202.
- 12) Arridson SO (1973) Studies on extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*, II. Isolation and characterization of an EDTA-sensitive protease. *Biochemica et Biophysica Acta*, **302**, 149-157.
- 13) Drapeau GR, Bioly Y and Houmard J (1972) Purification and Properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*, **247**, 6720-6726.
- 14) 五十嵐富三男, 中山年正 (1982) スラブ式 SDS-PAGE — 分子量測定とペプチドマップについて —. 臨床検査, **26**, 1508-1515.
- 15) Teufel P and Goty F (1993) Characterization of an extracellular Metalloproteases with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology*, **175**, 4218-4224.
- 16) Miller CG and Mackinnon K (1974) Peptidase mutants of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, **120**, 355-363.
- 17) Tanaka S and S Iuchi (1971) Induction and repression of an Extracellular proteinase in *Vibrio parahaemolyticus*. *Biken Journal*, **14**, 81-96.
- 18) Sawamura T, Kasuya Y, Matsushita Y, Suzuki N, Shinmi O, Kishi N and Sugita Y (1991) Phosphoramidon inhibits the Intracellular conversion of big endothelin-1 to endothelin-1 in Cultured endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **174**, 779-784.
- 19) Sloma A, Rufe CA, Rudolph CF, Sullivan BJ and Pero J (1990) Bacillopeptidase F of *Bacillus subtilis*: purification of the protein and Cloning of the gene. *Journal of Bacteriology*, **172**, 1470-1477.
- 20) Cho HY, Tanigawa K, Tanaka H and Soda K (1988) Thermostable dipeptidase from *Bacillus stearothermophilus*: Its purification, characterization, and comparison with aminocyclase. *Journal of Biochemistry*, **103**, 622-628.
- 21) 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.
- 22) Lukasovich T, Baliko G, Orsz A, Balla F and Venetianer P (1990) New approaches to increase the expression and stability of cloned foreign genes in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, **13**, 243-250.
- 23) Machuga EJ and Ives PH (1984) Isolation and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus acidophilus*. *Biochemica et Biophysica Acta*, **789**, 26-36.

(平成11年5月12日受理)

Properties of Protease Produced by *Staphylococcus epidermidis*

Kenji NINOMIYA, Hiroko MINE

(Accepted May 12, 1999)

Key words : *Staphylococcus epidermidis*, PROTEASE, RESIDENT FLORA CNS, ZINC

Abstract

Ninety strains of *Staphylococcus epidermidis* were isolated from the right forefingers of healthy people. The amount of protease activity produced by those 90 strains was measured by the calcium-casein agar plate method. Eighty-four out of 90 strains tested (93.3%) showed protease activity, and the most active strain, UNO67, was selected for use in future experiments. Some biochemical properties were examined by using the culture supernatant of the UNO67 strain as a protease solution. The heat tolerance was tested first. Protease activity completely disappeared when it was heated for 10 minutes at 70°C. As a result, this protease was classified as a heat labile enzyme. Next, pH dependency was measured and it was shown that the optimal pH had a wide neutral range (pH 5 to 9).

Protease activity was inhibited by EDTA, phosphoramidon, phenanthroline and HgCl₂ but NEM, pepstatin A and SBTI had no effect. This indicated that the protease was a metaroprotease. According to the quantitative metal indicator test (mercoquant), the reactions to Al, Co, Cu, Fe, Mn and Pb were negative while the reaction of Zn was positive.

A dialyzed crude preparation of the protease was purified by DEAE Sephadex chromatography and enzyme activity was found to be localized in the 0.1 M KCl eluted fraction. A purified powder was prepared by freeze drying the active fraction. SDS-PAGE of the powder resulted in a single protein band which suggests that it was pure.

Correspondence to : Hiroko MINE

Department of Clinical Nutrition, Faculty of Medical Professions
Kawasaki University of Medical Welfare
Kurashiki, 701-0193, Japan
(Kawasaki Journal of Medical Welfare Vol.9, No.1, 1999 103-111)