

| | |
|--------------|---|
| Title | 海洋細菌プロテアーゼに関する研究 |
| Author(s) | 牧野, 和夫 |
| Citation | 大阪大学, 1978, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/32255 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

| | |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 牧 野 和 夫 |
| 学位の種類 | 薬 学 博 士 |
| 学位記番号 | 第 4 3 8 2 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和 53 年 9 月 12 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 | 海洋細菌プロテアーゼに関する研究 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 近藤 雅臣 (副査) 教授 上原喜八郎 教授 青沼 繁 教授 三浦 喜温 |

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

海洋においては、動植物により生産される有機物質、動植物の残がい、あるいは河川などにより地圏から海洋へもたらされる有機物質など多種多様な物質が存在する。このように、きわめて多種類の有機物が流入するにもかかわらず、海洋の自然状態が保持されていることはそこに棲息する微生物が、それぞれの物質に対する分解能を発揮し、あるいは分解能を獲得してこれらを代謝分解しているからであって、海洋の自然浄化作用において大きな役割を演じているものといえる。

したがって、ある種の化学物質を分解する酵素を得る目的でそれを生産する微生物を分離しようとする際、海洋微生物はその母体として大きな価値を有するものといえる。この意味で、最近、海洋微生物の利用度が増大し、これまでたんぱく質、脂質、でん粉、セルロース、キツラン、アルギン酸、寒天、キチン、あるいはリグニンなどを分解する海洋細菌の分離が報告されている。

また、海水は陸水に比較し、高濃度の塩分を含有し、水素イオン濃度、温度、圧力、有機物質濃度などにおいて特異な環境を呈し、そこに棲息する微生物は、陸棲のものとは異なった生理機能を有している。とくに浸透圧の変化に対する細胞構造のき弱性は海洋細菌の特徴のひとつといえ、塩濃度のきわめて低い水中では容易に自己融解をおこす。このように海洋微生物は多くの特徴を有しているが、これらの特徴を利用した研究はきわめて少ない。

一方、わが国においては近年産業廃水に対してきわめてきびしい規制が設けられ、それぞれの排出成分に応じた処理方法が開発され、設置稼働しているが、たんぱく質、とくに従来難分解性とされているセリシンを主成分としたたんぱく質を多量に排出する製糸工業廃水に対する処理法はまだ充分完

成されておらず、蛋白質を主体とするために河川、海水の汚濁の原因となっている。そこで、製糸工業の廃水の主体であるセリンを多量に含むたんぱく質（セリシン）を分解する微生物を海洋から求め、その酵素の性質を明らかにするとともに、分離菌の特徴的な生理現象を利用した廃水処理法を検討することにした。

本 論

(1) 菌体外プロテアーゼ産生海洋細菌の分離ならびにプロテアーゼ産生条件の検討

海洋細菌の定義として、海水中より分離された細菌で、低度の好塩性および K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} の無機イオン要求性を示すことがあげられている。宇和海の海水中より分離した好塩菌、耐塩菌56株のうち、32%は海洋細菌で、他の68%は無機塩の要求を示さない陸棲菌であった。プロテアーゼ産生菌の分離は、廃水処理などを目的とした場合、広範囲のpH域でよく増殖し、また強いプロテアーゼ産生を示し、継代培養において変異の少ないことが必要であると考え、145-2菌を選び以下検討した。

本菌は、S. T. Cowan および清水らの方法により、同定した結果、*Pseudomonas*属の海洋細菌であることがわかった。

本菌のプロテアーゼ産生は増殖期において菌の増殖と平行してプロテアーゼ産生は増大し、定常期に達した時点においてプロテアーゼ産生は停止し、以後徐々に活性が低下する傾向を示した。また本菌は30℃で、0.5~1.0%のカゼインのようなペプチド結合の多い有機物質を用い、513.3mM (3% NaCl) の Na^+ 、9.4mMの K^+ 、6.8mMの Ca^{2+} 、および75.0mMの Mg^{2+} 存在下で培養した場合、最も良いプロテアーゼ産生を示すことがわかった。

(2) *Pseudomonas* 145-2菌の菌体外プロテアーゼの精製

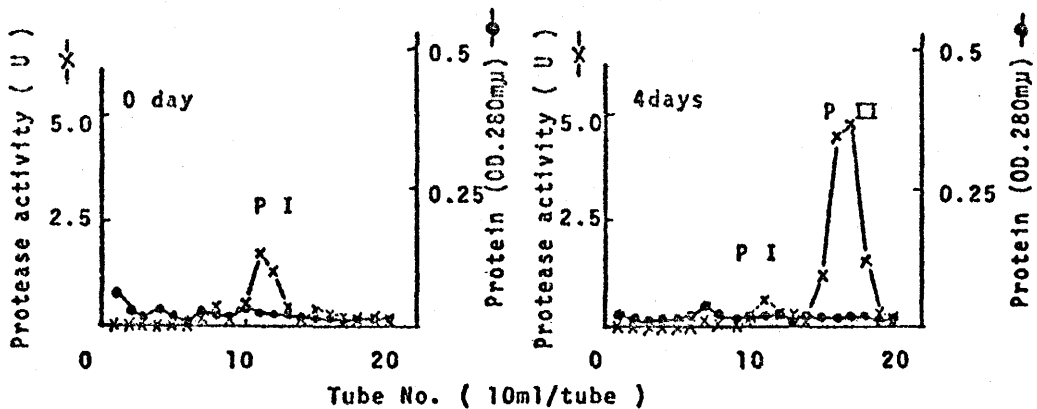
本菌の菌体外プロテアーゼは2度の硫酸による塩析により約10倍に精製され、さらにSephadex G-100およびG-75でゲルろ過することにより、二つのプロテアーゼに分離された。(プロテアーゼ I、プロテアーゼ II) これらのプロテアーゼはアクリルアミドゲル電気泳動で単一であることが証明され、またプロテアーゼ I は、免疫電気泳動においても単一性が証明された。

(3) 菌体外プロテアーゼの性状

本菌のプロテアーゼは分子量 $50,000 \pm 5,000$ のプロテアーゼ I と分子量 $14,500 \pm 1,200$ のプロテアーゼ II からなり、プロテアーゼ I はヘキソースおよびヘキソサミン(グルコサミンおよびガラクトサミン)を含有する特徴的なプロテアーゼであることが明らかとなった。また、プロテアーゼ I、プロテアーゼ II は、0.05M Tris-HCl(pH 8.0) 緩衝液中において安定であり、さらに両プロテアーゼは、アルカリ性域で強いプロテアーゼ活性を示し、1mMのPCMB, DFP, EDTAで活性が阻害されず、50mM EDTAで完全に活性が阻害されることから、金属キレート剤感受性のアルカリプロテアーゼであることがわかった。本菌プロテアーゼの基質特異性は、酸化インシュリンB鎖により検討した結果、両プロテアーゼとも、切断点のカルボキシル側のアミノ酸残基が、Tyr, Phe., His., Ser., Leu. が存在する場合に切断を示し、陸棲の*Pseudomonas*属の金属キレート剤感受性のアルカリプロテアーゼとは異なった切断点を示すことが明らかとなった。

本菌のプロテアーゼは分子量においてプロテアーゼ I はプロテアーゼ II の約3倍の値を示したが、

アミノ酸組, 至適pH至適温度, pHならびに温度に対する安定性, 金属イオンならびに阻害剤の影響および基質特異性などにおいて類似した性質を有することが明らかになった。さらに, 精製プロテアーゼ I の抗血清を用いた double-immunodiffusion において, プロテアーゼ I およびプロテアーゼ II の沈降線が完全に融合を示すことから, 両酵素間に密接な関係があることが判明した。H. Neuman らはペプシノーゲンから酸性条件下で糖が分離することにより活性体であるペプシンが生成することを報告している。本菌のプロテアーゼ II は比活性においてプロテアーゼ I の約3倍の活性を示すが, プロテアーゼ I を4℃のHerbstの人工海水中で放置すると, 24~72時間後に約50%の全活性の上昇が認められ, Sephadex G-100によるゲルろ過パターン (Fig. 1) から, プロテアーゼ I が解離 (分解) してプロテアーゼ II が生成していることが明らかとなった。プロテアーゼ I は糖を含むたんぱく質であり人工海水中でプロテアーゼ II を生成することから, H. Neuman らが報告したペプシノーゲンからのペプシンの生成機序とよく似た反応が菌体外でおこっているものと推察された。



column: sephadex G-100 (2×90cm) elution buffer: 0.05M Tris-HCl
 sampling volume: 0 day 2ml, 4 days 3ml

Fig. 1 Conversion of Protease I to Protease II in Artificial Sea water

(4) Pseudomonas 145-2 菌による製糸廃水の処理効果

Pseudomonas 145-2 菌の産生する菌体外プロテアーゼは, 芳香族アミノ酸, Leu., Ser. に対して基質特異性を有することから, たんぱく質成分の約30%を Ser. が占める, セリシンを主成分とする製糸工場より排出される煮繭廃液を対象とし, たんぱく質量の減少およびアルブミノイド窒素の減少を対象として本菌の処理効果の検討をおこなった。この結果, 繭および蛹の抽出液より作成した製糸廃水モデルにおいては, 培養6時間後には, たんぱく質量約 3.5%, アルブミノイド窒素34.4%に減少し, 製糸廃水においてもたんぱく質量は4時間後において約18%に減少し, アルブミノイド窒素は6時間で約50%に減少した。

(5) 結 論

1. 愛媛県の宇和海の海水中より継代培養による変異が少なく, 広い pH 域でプロテアーゼ産生を示す Pseudomonas 145-2 菌を分離した。

2. 本菌は通性低温菌で、513.3mM (3%NaCl)のNa⁺、9.4mMのK⁺、6.8mMのCa⁺、および75.0mMのMg⁺存在下で窒素源としてカゼインのようなペプチド結合の多いものを用いて、30℃で培養した場合、プロテアーゼの産生量は最高値を示した。

3. プロテアーゼの精製は、2度の塩処理をおこなった後、Sephadex G-100, Sephadex G-75でゲルろ過することにより、プロテアーゼⅠ、プロテアーゼⅡが得られ、両酵素はアクリルアミドゲル電気泳動により単一性が証明され、プロテアーゼⅠは免疫電気泳動的にも単一であることが証明された。

4. プロテアーゼⅠはヘキソースおよびヘキソサミンを含む特徴的なプロテアーゼであった。また両プロテアーゼは、たんぱく質化学的、酵素化学的によく似た性状を示す、金属キレート剤感受性のプロテアーゼで、プロテアーゼの抗血清を用いたdouble-immunodiffusionにより同一の抗原性を有するたんぱく質であることが明らかとなった。

また、プロテアーゼⅠを人工海水に放置した場合、活性の増加が認められ、活性上昇時のプロテアーゼをSephadex G-100でゲルろ過することにより、プロテアーゼⅡが生成していることが証明された。

5. *Pseudomonas* 145-2菌のプロテアーゼにより、セリシンを多量に含有する製糸廃水を効率よく処理できることがわかった。

論文の審査結果の要旨

Marine bacteria Pseudomonas 145-2菌を海水中より分離し、これの生産するプロテアーゼの性質ならびに応用面を検討した。本酵素は金属キレート剤感受性のアルカリプロテアーゼであり、カルボキシル側のアミノ酸残基がチロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、セリン、ロイシンのばあいには切断することを明らかにした。また、本酵素を精製する過程で、分子量50,000±5,000と14,500±1,200の2種のもが存在することを明らかにし、両者を免疫化学的手法その他の方法で比較した結果、きわめて類似した性質を有することが判明した。そこで、分子量の大きい前者の酵素を人工海水中で保温したところ、分子量の小さい後者の酵素に変化することがわかり、本菌のプロテアーゼは生産されたのち海水中に放出されると海水イオンの働きでより活性の強い分子量の小さいプロテアーゼに変化するものと推定した。本酵素がセリン部分を切断する性質を有することから、製糸廃水の主成分であるセリシンの分解に利用し、廃水処理への応用に成功した。以上の研究成果は薬学博士を授与するに値するものと判断した。