

放線菌 *Streptomyces griseus* ATCC 3463 の 耐熱性プロティナーゼについて

四十九院成子*・大内 毅・平松 昭

Studies on the thermophilic proteinase from *Streptomyces griseus* ATCC 3463

SHIGEKO TSURUSHIIN, TAKESHI OUCHI and AKIRA HIRAMATSU

I 緒 言

放線菌の蛋白分解酵素に関しては多数の報告がある。そのうちアルカリ性プロティナーゼに関して、1958年に大内らは^{6,7)}*Streptomyces griseus* ATCC 3463の生産する同酵素の精製、酵素化学的性質およびパン酵母チトクロームCに対する基質特異性¹¹⁾について報告し、岩浅らは⁹⁾*Streptomyces sp. No. 41*の生産する同酵素の精製と酵素化学的性質について報告している。また水沢らは^{15,16)}*Streptomyces rectus* var. *proteolyticus*¹⁰⁾の生産する2種の耐熱性酵素について報告し、森原らは¹⁰⁾*Streptomyces fradiae*の生産する5種のプロティナーゼの酵素化学的性質について報告し、これらの酵素のうちの1種が耐熱性酵素であることを見出ししている。

著者らは、近年Sephadexによるゲルろ過法、イオン交換Sephadexによるクロマトグラフィー法、等電点分画法等、相續いて新しい分画法が報告されたのを機会に、放線菌 *Streptomyces griseus* ATCC 3463 の生産するアルカリ性プロティナーゼの精製法を再検討し、アルコール分画沈澱、Sephadex G-100およびCM-セルロースクロマトグラフィーにより3種のアルカリ性プロティナーゼを相互分離した。これらの酵素はいずれもDFP*で阻害を受けるセリン酵素である。これらのうち1種のプロティナーゼは 10^{-2} MのCa⁺⁺存在下で80℃に最適温度をもち、90℃で10分間の加熱に対して70%の活性を保持することを見出した。

耐熱性プロティナーゼに関する報告は比較的少なく、放線菌の場合は前述の*Streptomyces rectus* var. *proteolyticus*^{15,16)}の生産するプロティナーゼAおよびBならびに¹¹⁾*Streptomyces fradiae*の生産するI aお

よびI b酵素¹⁰⁾がある。その他の微生物系ではWilliamson¹⁷⁾が*Streptococcus lactis*の生産するプロティナーゼについて報告し、また遠藤が¹⁸⁾*Bacillus thermoproteolyticus*の生産するThermolysinについて報告している。さらに動物系では近年Berret¹⁹⁾らがウニの胞胚に存在する耐熱性プロティナーゼを報告した。

著者らは*Streptomyces griseus* ATCC 3463がアルカリ性プロティナーゼの外に耐熱性プロティナーゼを生産することを見出したので、その精製と酵素化学的性質について報告する。

本研究を発表するに当たり、菌の培養に御便宜を賜わった日研化学株式会社小山田孝一氏に対し厚く御礼申し上げる。また本実験に関し助言を得た児玉治氏に対し謝意を表する。

II 実 験 方 法

1. 培養法

培養液の組成は次のようにした。

ポリペプトン (武田)	1%
肉エキス (極東)	1%
グルコース (純正)	1%
食 塩 (純正)	0.3%

pH 7.0に調整後殺菌し、*Streptomyces griseus* ATCC 3463を丸菱理化装置研究所製MST-10型ジャーファーメンターを用いて(培養基液量15ℓ/基)27℃で5日間培養した。培養後、冷却遠心機(富永製作所製S-62型)で菌体を除去し、この上澄液を酵素原液とした。

2. エタノール分画沈澱酵素

上記の酵素原液はフラッシュエバポレーター(濃縮速度1.5ℓ/h)を用いて約4倍に濃縮し、あらかじめ十分に冷却(4℃以下)した後、-20℃に冷却したエタノール(99%以上)をその濃度が50%(V/V)になる

*お茶の水女子大学食物化学研究施設

*DFP:Diisopropylfluorophosphate の略

よう攪拌しながら徐々に加えた。添加後1時間静置し、沈澱を十分に生成させた後、連続式冷却遠心機(富永製作所S62型, №15ローター)を使用して0℃, 10,000 r. p. m., 流速300 ml/minで遠心分離した。この沈澱部分は酵素活性を示さなかった。上澄液はさらに前記同様の操作によりエタノール濃度を80% (V/V)にして沈澱を生成させた後、連続遠心分離し、得られた沈澱(50~80%エタノール分画沈澱)を真空乾燥した。酵素原液1ℓ当り9gの乾燥粉末を得た。このエタノール分画沈澱乾燥粉末を以下の実験に供試した。

3. 酵素活性の測定法

i) プロティナーゼ活性の測定法

萩原の考案したカゼイン-275nm法²⁰⁾を改良した測定法¹²⁾を用いた。ただし基質濃度は0.4% (消化混液中0.2%)とし、ホウ酸-NaOH緩衝液(pH10.5, 消化混液中0.005M)とした。

消化温度60℃で30分間消化し、蛋白質沈澱試薬Bで除蛋白して、275nmの吸光度を測定した。プロティナーゼの酵素単位は、
[PU] cas. 275, B, pH10.5, 60° /ml of enzyme soln.
μ mole Tyr.

を示した。これを単に unit/ml と略記し、比活性 (unit/mg と略記した) は酵素蛋白質重量で除した値を用いた。

ii) ペプチダーゼ活性の測定法

Metheson と Tattrie の方法²¹⁾を多少改良した方法により測定した。基質としてL-ロイシルグリシン(H-Leu-Gly-OH)およびカルボベンゾキシグリシル-L-ロイシン(Z-Gly-Leu-OH)をHessの方法²²⁾により合成して使用した。遊離したアミノ基の増加をニンヒドリン法で測定し、酵素活性とした。

iii) 酵素蛋白質の測定法

Lowry法²³⁾によって測定した。標準物質として、結晶 egg albumin (2回結晶, Sigma社, 米国)を使用した。

4. Sephadex およびイオン交換体

Sephadex G-100はPharmacia社, CM-セルロースはミドリ十字社(0.72mEq/g), DEAE-Sephadex A-50 およびCM-Sephadex A-50はそれぞれPharmacia社より購入した。それぞれのイオン交換体は常法により精製して使用した。

5. 等電点分画法

AmpholineはpH範囲3~10(40%(V/V)水溶液のもの)をLKB社より購入し、Vesterbergと

Svensen²⁴⁾の方法に従って等電点分画を行なった。装置は当研究室で設計し、野村化学機器社が製作した。

III 実験結果

1. *Streptomyces griseus* ATCC 3463の生産する耐熱プロティナーゼの精製

前記のエタノール分画沈澱乾燥粉末5gを30mlの0.001M酢酸カルシウムを含む0.005M酢酸塩緩衝液pH6.8に溶解し、生ずる不溶性物質を遠心分離(8,000 r. p. m., 0℃, 10分)して除き、この上澄液(黒褐色)を向上緩衝液で平衡化したSephadex G-100カラム(5×70cm)の上端にのせ、39.6ml/hrの流速で展開した。溶出液は6mlずつ分画採取した。この結果を第1図に示した。この操作により得られたプロティナーゼ活性の回収率および比活性は、47%および4.71であった。またこの区分にはペプチダーゼ活性が混在し、その比活性は2.2で、大部分の色素区分を除去することが出来た。

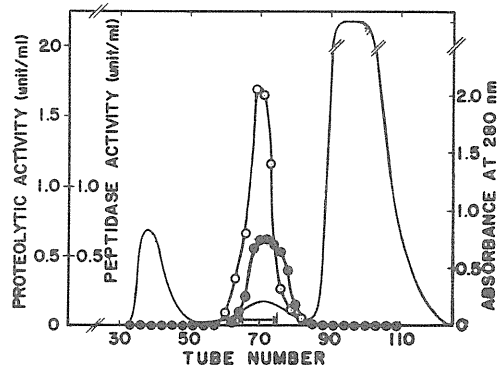


Fig. 1. Chromatography of the thermophilic proteinase on a column of Sephadex G-100.

The enzyme solution fractionated by ethanol was placed on the top of the column(5×7cm) of Sephadex G-100 which had been equilibrated with 0.005M acetate buffer, pH6.8 containing 0.001M calcium acetate. The flow rate was 39.6 ml per hr and fractions of 6 ml were collected. Horizontal arrow indicated fractions pooled. —, ultraviolet absorption at 280 nm: ○—, proteolytic activity; ●—, peptidase activity.

このプロティナーゼ区分(液量 85ml)をCM-セルロースイオン交換クロマトグラフィーに供試した。すなわち 0.001 M 酢酸カルシウムを含む 0.005 M 酢酸塩緩衝液, pH 6.8 で平衡化したCM-セルロースカラム(2 × 15 cm)にのせ, 69 ml/hr の流速で吸着させ, 同上緩衝液で 280nm の吸光がベースラインに下がるまで洗浄した。ついで同上緩衝液と 0.1 M 食塩を含む同上緩衝液とを同量ずつ(150 ml)を混合槽に入れ, いわゆる "linear gradient elution system" で溶出を行った。溶出液は 7.5 ml ずつ採取した。この結果を第 2 図に示した。

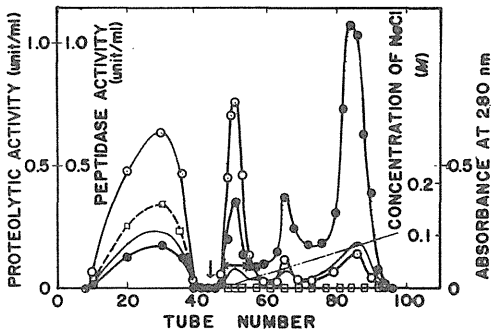


Fig. 2. Chromatography of the thermophilic protease on a column of CM-cellulose. The enzyme solution fractionated by chromatography on Sephadex G-100 was placed on the top of the column (2×15 cm) of CM-cellulose which had been equilibrated with 0.005 M acetate buffer, pH 6.8, containing 0.001 M calcium acetate. The enzyme was eluted with a linearly increasing concentration of NaCl from 0 to 0.1M in the starting buffer at the position indicated in the figure (↓). The flow rate was 69 ml per hr and fractions of 7.5 ml were collected. Horizontal arrow indicated fractions pooled. —, ultraviolet absorption at 280 nm; ○—, proteolytic activity at 60°C; —●—, proteolytic activity at 40°C; —□—, peptidase activity; — — —, concentration of NaCl.

この結果 280 nm の吸光値からタンパク質区分は 4 つに大別された。そして非吸着区分にはペプチダーゼ活性およびプロティナーゼ活性が見出され, 吸着区分には 3 つのタンパク区分にそれぞれペプチダーゼ活性を示さないアルカリ性プロティナーゼ活性が認められた。この操作で酵素原液中に含まれたペプチダーゼとアルカリ性プロティナーゼを相互分離することが出来, かつ少くとも

3 種のアルカリ性プロティナーゼが存在することが明らかになった。これらのアルカリ性プロティナーゼを溶出順にそれぞれ耐熱性プロティナーゼ, アルカリ性プロティナーゼ I および II とした。この 3 種のプロティナーゼの活性の回収率は 24.2%, 10.2% および 18.3% で, それぞれの酵素の比活性は, 38.3, 6.6 および 7.42 であった。なおこれら 3 種のプロティナーゼは DFP によってそれぞれ阻害を受けた。以下の実験では耐熱性プロティナーゼ区分について実験した。

この耐熱性プロティナーゼ区分を脱塩後, 等電点分画法で均一性を調べた結果(第 3 図参照), 等電点(pI) 8.8 と 5.0 にそれぞれプロティナーゼ活性が認められた。耐熱性プロティナーゼは等電点 8.8 であった。よってこの混在する等電点 5.0 のプロティナーゼ区分を除去するために, さらに DEAE-Sephadex および CM-Sephadex カラムクロマトグラフィーを行なった。

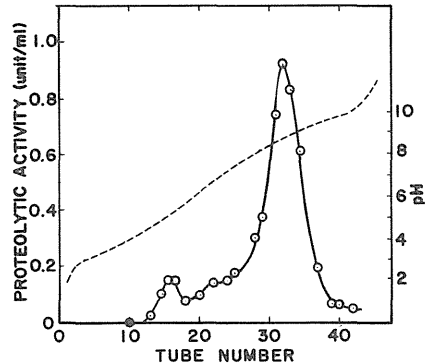


Fig. 3. Isoelectric focusing patterns of the thermophilic protease. Isoelectric focusing patterns was obtained by the method of Vesterberg and Svensen (24), using the pH range from 3 to 10. 220 μg of the enzyme was applied and electrophoresis was carried out at 300 V for 18.75 hr. — — —, pH; —○—, proteolytic activity. Fractions of 2.7 ml were collected.

前記のCM-セルロースカラムクロマトグラフィーで最初に溶出された耐熱性プロティナーゼ区分(液量 50 ml)を 0.001 M 塩化カルシウムを含む 0.005 M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.5 に対して 4°C, 18 時間透析し, あらかじめ同上緩衝液で平衡化した DEAE-Sephadex カラム(1.5 × 16.5 cm)に供試した。すなわち, 10.8 ml/hr の流速で吸着させ, 同上緩衝液で洗浄した。ついで同緩衝液中の食塩濃度を 0 ~ 0.2 M の範囲で直線的に

上昇させる "linear gradient elution system" で溶出した。溶出液は 3.8 ml ずつ採取した。(第 4 図参照) この結果耐熱性プロティナーゼは DEAE-Sephadex に吸着されずに素通り区分に溶出された。回収率 19.5%, 比活性 45.8 であった。

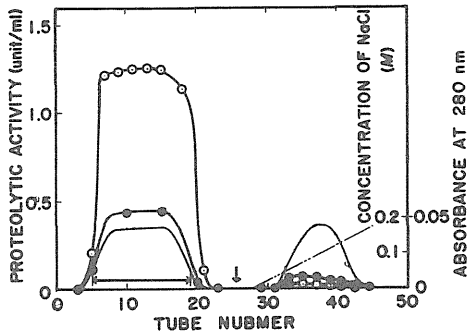


Fig. 4. Chromatography of the thermophilic protease on a column of DEAE-cellulose. The enzyme solution fractionated by chromatography on CM-cellulose was placed on the top of the column (1.5 × 16.5 cm) of DEAE-cellulose which had been equilibrated with 0.005 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 0.001 M calcium chloride. The enzyme was eluted with a linearly increasing concentration of NaCl from 0 to 0.2 M in the starting buffer at the position indicated in the figure (↓). The flow rate was 10.8 ml per hr and fractions of 3.8 ml were collected. Horizontal arrow indicated fractions pooled. —, ultraviolet absorption at 280 nm; —○—, proteolytic activity of 60 °C; —●—, proteolytic activity of 40 °C; ----, concentration of NaCl.

前記の素通りの耐熱性プロティナーゼ区分(液量 56 ml)を 0.001 M 酢酸カルシウムを含む 0.005 M 酢酸塩緩衝液 pH 6.8 に対して 4 °C, 18 時間透析し, あらかじめ同上緩衝液で平衡化した CM-Sephadex カラム(1.5 × 14.5 cm)に, 7.8 ml/hr の流速で吸着させた。同上緩衝液で洗浄後, 同緩衝液中の食塩濃度を 0 ~ 0.15 M の範囲で直線的に上昇させて溶出した。溶出液は 3.1 ml ずつ採取した。

この結果耐熱性プロティナーゼは第 5 図の様に, CM-Sephadex に吸着され, 塩濃度 0.06 M 付近に溶出された。回収率 15.2%, 比活性 62.0 となり酵素原液の 397 倍に精製された。耐熱性プロティナーゼの精製過程の一覧を要約して第 1 表に示した。

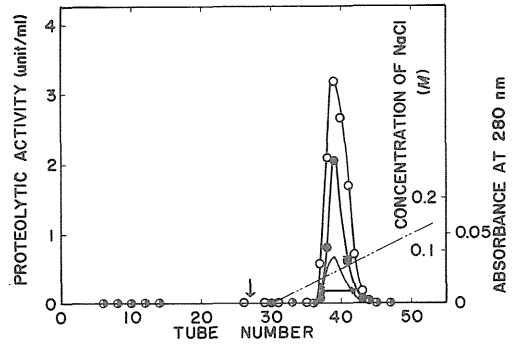


Fig. 5. Chromatography of the thermophilic protease on a column of CM-Sephadex. The enzyme solution fractionated by chromatography on DEAE-cellulose was placed on the top of the column (1.5 × 14.5 cm) of CM-Sephadex which had been equilibrated with 0.005 M acetate buffer, pH 6.8, containing 0.001 M calcium acetate. The enzyme eluted with a linearly increasing concentration of NaCl from 0 to 0.15 M in the starting buffer at the position of indicated in the figure (↓). The flow rate was 7.8 ml per hr and fractions of 3.1 ml were collected. Horizontal arrow indicated fractions pooled. —, ultraviolet absorption at 280 nm; —○—, proteolytic activity at 60 °C; —●—, proteolytic activity at 40 °C; ----, concentration of NaCl.

2 耐熱性プロティナーゼの均一性

耐熱性プロティナーゼ標品の均一性を等電点分画法によって検討し第 6 図に示した。この結果耐熱性プロティナーゼ標品の等電点は 8.82 で, 純度は 99.3% の高純度であった。なお第 3 図に示した等電点 5.0 に認められたプロティナーゼは除去することが出来た。

3 耐熱性プロティナーゼの酵素化学的性質

精製した耐熱性プロティナーゼを用いて, 酵素化学的性質を検討し以下に述べる様な結果を得た。

1 酵素濃度と活性

精製した耐熱性プロティナーゼの各種濃度において, 基質濃度 0.2%, pH 10.5 の条件で 30 分間 60 °C で incubation した時の酵素活性について第 7 図に示した。ミルクカゼイン水解において, この耐熱性プロティナーゼの酵素活性は 275 nm の吸光度で 0.493, 酵素濃度で 1.15 μg/ml までは直線的に上昇し, 濃度がそれ以上高くなるとこの直線性が失われることが認められた。酵素活性の測定にはすべてこの直線性を有する酵素濃度の

Table 1. Purification of the Thermophilic Proteinase from *Streptomyces griseus* ATCC 3463

Fraction	Volume	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)
Crude enzyme solution	854	286	1830	0.16	100
Ethanol precipitation	30	200	436	0.46	70
Sephadex G-100 Chromatography	85	145	31	4.7	51
CM-Cel lulose chromatography	50	69	1.8	38.3	24
DEAE-Sephadex chromatography	56	55.7	1.2	45.8	20
CM-Sephadex chromatography	18	43.6	0.7	62.0	15

One unit of the proteolytic activity was defined as the amount of the enzyme that liberates TCA soluble hydrolysate from casein corresponding to one μ mole of L-tyrosine per min per ml of the enzyme solution. Specific activity was expressed in units per mg of protein of the enzyme solution.

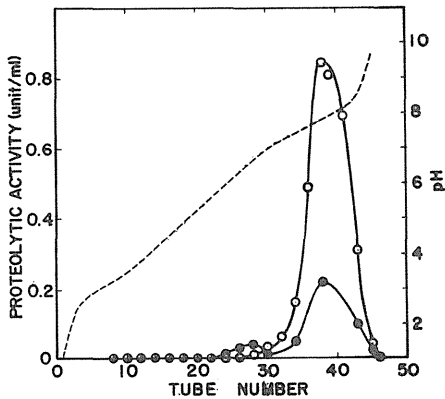


Fig. 6. Isoelectric focusing of the purified thermophilic proteinase. 780 μ g of the enzyme was applied. The conditions of run were the same as those illustrated in Fig. 3. \cdots , pH; \circ —, proteolytic activity of 60°C \bullet —, proteolytic activity of 40°C. Fractions of 2.7 ml were collected.

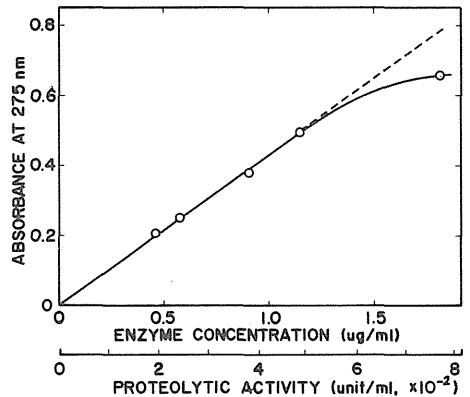


Fig. 7. Standard curve for assay of the proteolytic activity by the casein-275 nm method. The reaction mixture contained 1.0 ml of 0.2 per cent milk casein in 0.01M borate buffer pH 10.5, and 1.0 ml of the enzyme solution of various concentrations. Incubation was carried out for 30 min at 60°C.

範囲で行なった。

ii 基質濃度と活性

酵素濃度を一定にして, ミルクカゼインの各種濃度における水解作用を検討した結果を第8図に示した。この

結果0.2%以上において基質阻害による活性の減少がみられた。また, ミルクカゼイン水解時における速度論的解析を行い, Lineweaver-Burkの式よりKmを求めると, 0.045(%)であった。

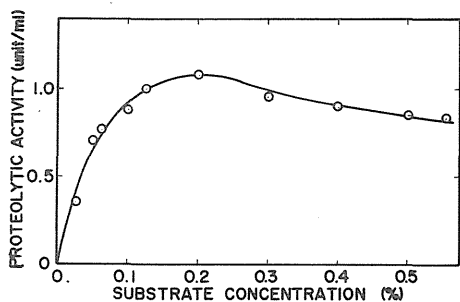


Fig. 8. Effect of substrate concentration on the activity of the purified thermophilic proteinase.
The reaction mixture contained 1.0 ml of the enzyme solution (0.448 μ g of protein) and 1.0 ml of various concentration of milk casein 0.01 M borate buffer, pH 10.5.

iii 最適 pH

ミルクカゼインおよび尿素変性ヘモグロビンを基質として酵素作用の最適 pH を検討した。その結果第 9 図に示す様に 2 つの基質とも pH 10.5 付近で最もよく水解された。水沢らが報告した *Streptomyces rectus* var. *proteolyticus* の 2 種のプロテイナーゼはとも最適 pH は 10.6 ~ 10.8 にあり、よく類似していた。

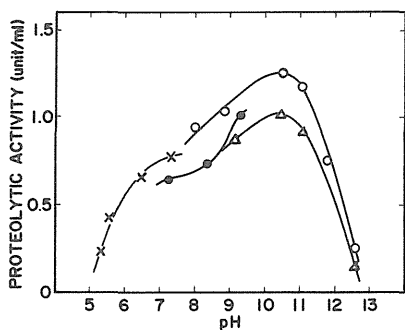


Fig. 9. Effect of pH on the activity of the purified thermophilic proteinase.
The reaction mixture contained 1.0 ml of the enzyme solution (0.48 μ g of protein) and 1.0 ml of substrate buffer solution at various pH's. —x—, 0.2 % milk casein in 0.05 M phosphate buffer, pH 5 ~ 8, —●—, 0.2 % milk casein in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7 ~ 10; —△—, 0.2 % milk casein in 0.01 M borate buffer, pH 9 ~ 13; —○—, 0.2 % hemoglobin (denatured with 1.2 M urea) in 0.01 M borate buffer, pH 8 ~ 13.

IV 最適温度

ミルクカゼインを基質として最適温度を検討した。この結果第 10 図に示す様に 10^{-2} M の Ca^{++} が存在する時は 80 °C に最大活性を示し、 Ca^{++} が 2×10^{-5} M の存在下では、70 °C に最大活性を示した。一般に蛋白分解酵素は、40 °C 前後で最大活性を示すのであるが、本酵素は非常に高温で活性を発現し興味深い。またこの結果から Ca^{++} が高温下における酵素の安定性に何らかの影響を与えることが示唆された。

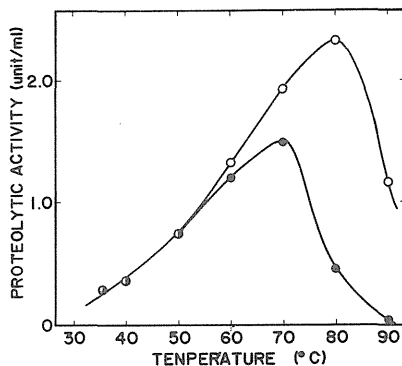


Fig. 10. Effect of temperature on the activity of the purified thermophilic proteinase.
The reaction mixture contained 1.0 ml of enzyme solution (0.448 μ g of protein) and 1.0 ml of 0.2 per cent milk casein in 0.01 M borate buffer, pH 10.5. The assay solution was incubated at various temperatures for 30 min —●—, in 2×10^{-5} M calcium ion; —○—, in 1×10^{-2} M calcium ion.

V 酵素の安定性と Ca^{++} の影響

イ pH 安定性

酵素液を 0.1 N HCl あるいは 0.1 N NaOH を用いて所定の pH に調整し、室温 (22 °C) で 3 時間放置した後 pH を 10.5 に戻して、これら処理酵素液の残存酵素活性を測定して酵素の各 pH における安定性を調べた。この結果を第 11 図に示した。ここで示した様に、 Ca^{++} が 10^{-2} M 存在する時は 22 °C で 3 時間放置の際の残存活性は pH 8 ~ 11 付近までは、85 % 以上の残存率を示した。

ロ 熱安定性

酵素液を 10 分間各温度に放置後、氷水中で 10 分間急冷した後直ちに常法に従って消化試験を行ない残存活性を測定した。この結果は第 12 図に示した様に、本酵素は 10^{-2} M Ca^{++} の存在する時は 80 °C までほとんど

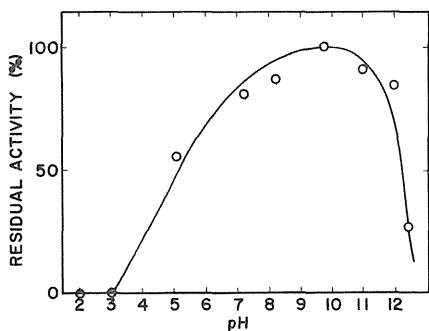


Fig. 11. pH stability of the purified thermophilic proteinase.
0.448 μg of the enzyme was preincubated with the buffer at the indicated pH's for 3 hr at 22 $^{\circ}\text{C}$, in a total volume of 1.0 ml.

熱に対して安定で、90 $^{\circ}\text{C}$ でもなお70%の残存率を示し、著しい耐熱性を示した。Ca⁺⁺濃度が 2×10^{-5} Mの場合、70 $^{\circ}\text{C}$ までは100%安定で90 $^{\circ}\text{C}$ では完全に失活した。このことから熱に対するCa⁺⁺の保護作用が明らかに認められた。また水沢らの^{15), 16)}2種の耐熱性プロティナーゼが 10^{-2} M Ca⁺⁺の存在下で共に90 $^{\circ}\text{C}$ 10分間の放置で完全に失活するが、これと比較してさらに安定であった。また熱安定性に及ぼすCa⁺⁺濃度の影響を検討して第13図に示した。この結果Ca⁺⁺の効果は 10^{-3} Mから現われ、 10^{-2} Mが最も高いことが認められた。

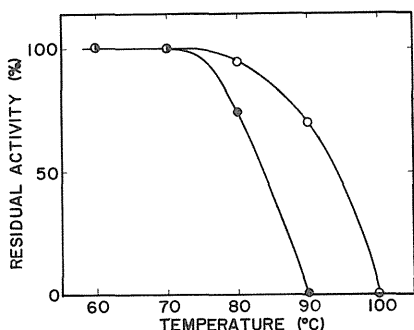


Fig. 12. Thermal stability of the purified thermophilic proteinase.
0.448 μg of the enzyme was heated at indicated temperature for 10 min in 1.0 ml of 2×10^{-5} M (—●—) and 1×10^{-2} M (—○—) calcium acetate, pH 6.8, and then immediately cooled at 0 $^{\circ}\text{C}$.

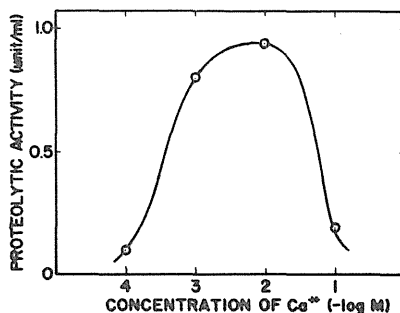


Fig. 13. Effect of concentration of calcium ion on the thermal stability of the purified thermophilic proteinase.
0.448 μg of the enzyme was heated at 90 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min in 1.0 ml of various concentration of calcium chloride, pH 6.8, and then immediately cooled at 0 $^{\circ}\text{C}$.

ハ 凍結保存に於ける安定性

10^{-3} M 酢酸カルシウムを含む耐熱性プロティナーゼ標品の凍結保存時における安定性を検討した。この結果57日間の凍結保存で活性は80%残存しほぼ安定であることが認められた。

Vi 各種金属イオンの影響

金属イオンの酵素活性に及ぼす影響をpH 7.5, 0.2% カゼインを基質として検討し、その結果を第2表に示した。

Table II. Effect of Metal Ions on the Activity of the Purified Thermophilic Proteinase

Metal ions	Residual activity (%)
NaCl	100
NaNO ₃	112
Na ₂ SO ₄	97
MgCl ₂	100
AlCl ₃	43
CaCl ₂	99
MnCl ₂	68
FeCl ₂	107
FeCl ₃	7
CoCl ₂	63
CuCl ₂	47
ZnCl ₂	11
SrCl ₂	99
AgNO ₃	30
CdCl ₂	16
HgCl ₂	0
HgNO ₃	10

0.448 μg of the enzyme was treated with the indicated metal ions at concentrations of 1×10^{-3} M (pH 6.8) for 10 min at room temperature, in a total volume of 1.0 ml. The enzyme activity was assayed by the casein digestion method (12).

この結果、水銀は 1 価の $HgCl_2$ の場合は残存率 0 %、2 価の $HgNO_3$ の場合は 10 % で、ともに強く阻害し、亜鉛の場合は 11 %、カドミウムの場合は 16 % であり、これらの金属はいずれも阻害作用を示していた。また鉄は 3 価の $FeCl_3$ の場合には残存率 7 % で強く阻害作用を示したのに対し 2 価の $FeCl_2$ は 107 % で完全に活性が残存していた。その他に、銀の場合は 30 % であり、阻害作用を示す傾向がみられた。また特定の賦活金属イオンは認められず、陰イオン Cl^- 、 SO_4^{2-} および NO_3^- 等はいずれも活性に影響はなかった。

VII 各種試薬の影響

各種試薬の精製耐熱性プロティナーゼ活性に対する影響を pH 7.5、0.2 % カゼインを基質として検討した結果を第 3 表に示した。本酵素は金属キレート試薬 EDTA*

Table III. Effect of Various Chemicals on the Activity of the Purified Thermophilic Proteinase

Chemicals	Residual activity
Diisopropylfluorophosphate (DFP) ¹⁾	0
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ²⁾	0
Protease inhibitor from potato ²⁾	7
Trypsin inhibitor from soybean ²⁾	70
Tosyllsine chloromethylketone (TLCK)	61
Tosylphenylalanine chloromethylketone (TPCK)	90
Ethylenediamine tetraacetate (EDTA)	9
8-Hydroxyquinoline	8
Monoiodoacetic acid	8
ω -Chloroacetophenone	6
p-Chloromercuribenzoate (PCMB)	109
N-Ethylmaleimide (NEM)	107
Potassium cyanide (KCN)	100
L-Cysteine	0
Semicarbazide	106
N-Bromosuccinimide	4
Iodine	0
Potassium permanganate	0
Sodium thiosulfate	100

0.448 μ g of the enzyme was treated with the indicated chemicals at concentrations of 1×10^{-3} M (pH 6.8) for 10 min at room temperature, in a total volume of 1.0 ml. The enzyme activity was assayed by the casein digestion method. 1) 6×10^{-4} M, 2) 10 μ g.

* EDTA: Ethylenediamine tetraacetate の略

SH 試薬 (ICH₂COOH, ω -chloroacetophenone, PCMB,¹⁾ NEM,²⁾ KCN, L-cysteine), チオ硫酸ソーダおよびセミカルバジドなどで阻害されず、ヨウ素、NBS³⁾ および $KMnO_4$ などで阻害が認められた。また DFP と PMSF⁴⁾ で失活し、酵素タンパク質分子中の Ser 残基が活性に関与することが認められ、セリン酵素に分類されることが明らかになった。TLCK⁵⁾、TPCK⁶⁾ による阻害の有無はトリプシン様酵素およびキモトリプシン様酵素の分類を可能にするが、ともに顕著な阻害は認められなかった。

IV 考 察

当研究室においては大内らの報告以来放線菌 *Streptomyces griseus* ATCC 3463 の培養液に生産される蛋白分解酵素の相互分離並びにそれらの酵素化学的性質、物理化学的性質および構造と機能について検討が続けられてきた。そして大内ら⁷⁾はこの培養液中に最適 pH を 10.0 にもち、EDTA で阻害されず、馬鈴薯のプロテアーゼインヒビターで阻害を受けるアルカリ性プロティナーゼ一種とともに、プロティナーゼ区分として他に 2 種存在することを報告した。アルカリ性プロティナーゼの等電点はデンブ層電気泳動により 9.6 であるが、2 種のプロティナーゼ区分はともに陽極側に移動し、等電点を酸性側にもつ酵素タンパク質であると考えられた。この様に当初から *Streptomyces griseus* ATCC 3463 は数種のプロティナーゼを生産することが示唆されていた。また近年この放線菌にはセリン酵素としてのアルカリ性プロティナーゼが 2 種存在することを認めた。そのうち 1 種は酸性側に等電点をもつものであった。Jurásek²⁵⁾らは“プロナーゼ”中のタンパク分解酵素の相互分離を検討し、ピリジン-酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いた CM-Sephadex により、endopeptidase 3 種、aminopeptidase 2 種、carboxypeptidase 1 種の計 6 種を認めている。

1 PCMB: p-Chloromercuribenzoate の略

* 2 NEM: N-Ethylmaleimide の略

* 3 NBS: N-Bromosuccinimide の略

* 4 PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride の略

* 5 TLCK: N-Tosyl-L-lysine chloromethylketone の略

* 6 TPCK: N-Tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone の略

著者らは, *Streptomyces griseus* ATCC 3463 の培養液からペプチダーゼ活性を含まない3種のアルカリ性プロティナーゼを分離することが出来た。これら3種のアルカリ性プロティナーゼのうち1種は耐熱性を示した。耐熱性プロティナーゼは, エタノール分画沈澱, Sephadex G-100 クロマトグラフィー, CM-セルロースクロマトグラフィー, DEAE-Sephadex クロマトグラフィーおよびCM-Sephadex クロマトグラフィーを用いて酵素原液の397倍に精製することが出来た。

水沢ら^{15,16)}は, 放線菌 *Streptomyces rectus* var. *proteolyticus* より2種のプロティナーゼA, Bを分離し, この両者がともにpH 10.6~10.8に最適pHを有し, 10^{-2} M Ca^{++} の存在下で80°C, 10分で65~70%の活性を有する耐熱性プロティナーゼであることを報告した。彼らはその報告の中で, 何れもDFP, 馬鈴薯のプロテアーゼインヒビター, $KMnO_4$, NBS, I_2 , PCMBの各試薬並びに Cu^{++} , Zn^{++} , Cd^{++} , Hg^{++} , Pb^{++} および Ag^+ などの重金属イオンで阻害されると述べている。また Ca^{++} の保護作用は著しく, 耐熱性に及ぼす Ca^{++} 濃度は 10^{-2} Mの時最も効果的であった。

Williamsonら¹⁷⁾は *Streptococcus lactis* のアルカリ性プロティナーゼが98°C, 60分間の加熱に対してなお32%の活性が残存していることを報告した。またDFPはこの酵素に阻害を示さず, PCMBは非拮抗的に阻害した。

その報告の中でDFPで阻害を受けないのは恐らく酵素タンパク質分子の活性部位にSer残基がないからであり, PCMBの阻害は活性発現に遊離のSH基が必要であるが, 非拮抗的な阻害型式からSH基が活性中心にあるのではないと考えた。

この *Streptomyces griseus* ATCC 3463 の耐熱性プロティナーゼは最適pHを10.5にもち, 耐熱性に及ぼす Ca^{++} の保護作用は 10^{-2} Mのとき最も顕著であり, 各試薬の酵素活性に及ぼす影響などの点で, 水沢ら^{15,16)}の *Streptomyces rectus* var. *proteolyticus* に類似している。しかし耐熱性の温度範囲はこれよりやや広く, Williamsonら¹⁷⁾の *Streptococcus lactis* ほど強くはなかった。また速藤は *Bucillus thermoproteolyticus* の生産するThermolysinは80°C, 60分の加熱で50%の活性を有し, EDTAで阻害され, 馬鈴薯のプロテアーゼインヒビターで阻害されず, 最適pHは7.5~8.5であると報告しているが, このことから本酵素は強い耐熱性を有するものと考えられる。動物系

の耐熱性プロティナーゼとしては近年Berretら¹⁹⁾の胞胚から沸騰水浴中で60分間の加熱に対して98%の活性を保持し得るといって著しく熱に安定なプロティナーゼを分離した。この酵素はDFPで阻害されなかった。従ってこれら各種の耐熱性プロティナーゼの阻害剤による影響は異っており, 活性発現の機構もまた異なるものと考えられる。

文 献

- 1) A. A. Tytell, J. Charney, W. A. Bolhofer and C. Curren: Fed. Proc., 13, 312 (1954)
- 2) 三宅 捷, 吉田貞彦, 柳下一愛: 兵庫農科大学研究報告, 1, 471 (1954)
- 3) M. Nomoto and Y. Narahashi: J. Biochem., 46, 653, 839, 1481, 1643 (1958); 48, 453 (1960)
- 4) M. Nomoto, Y. Narahashi, and M. Murakami: J. Biochem., 48, 593, 906 (1960)
- 5) Y. Narahashi and M. Yanagita: Sci Paper I. P. C. R., 59, 44 (1965)
- 6) 大内 毅, 平松 昭: 茨城大学農学部学術報告, 6, 67 (1958)
- 7) T. Ouchi: Agr. Biol. Chem., 26, 723, 728, 734 (1962)
- 8) A. Hiramatsu and T. Ouchi: J. Biochem., 54, 462 (1963)
- 9) 岩浅 孝, 杉本 洋, 茂田井宏, 横塚 保: 日農化, 38, 90 (1964)
- 10) 森原和之, 岡達, 続木博茂: 第18回酵素化学シンポジウム予稿集, p.238 (1966) (共立出版)
- 11) A. Hiramatsu: J. Biochem., 61, 168 (1967)
- 12) A. Hiramatsu: J. Biochem., 62, 353, 364 (1967)
- 13) Y. Narahashi and J. Fukunaga: J. Biochem., 66, 743 (1969)
- 14) A. Hiramatsu and T. Ouchi: J. Biochem., 71, 767 (1972)
- 15) K. Mizusawa, E. Ichijima and F. Yoshida: Agr. Biol. Chem., 28, 884 (1964), 30, 35 (1966)
- 16) K. Mizusawa and F. Yoshida: J. Biol. Chem., 247, 6978 (1972)
- 17) W. T. Williamson, S. B. Tove, and M. L. Speck: J. Bact., 87, 49 (1964)
- 18) S. Endo: J. Ferment Tech. Japan., 46, 346 (1962)
- 19) D. Berret: Biochem. J., 117, 61 (1970)

- 20) B. Hagihara, H. Matsubara, M. Nakai and K. Okunuki : J. Biochem., 45, 185 (1958)
- 21) A. T. Metheson and L. B. Tattrie : Can. J. Biochem., 42, 951 (1964)
- 22) J. C. Sheehan and G. P. Hess : J. Am. Chem. Soc., 77, 1067 (1955)
- 23) O. Folin and V. Ciocalteu : J. Biol. Chem., 73, 627 (1927)
- 24) O. Vesterberg and H. Svendsen : Acta. Chem. Scand., 20, 820 (1966)
- 25) L. Jurásek, P. Johnson, R. W. Olafson and L. B. Smillie : Can. J. Biochem., 49, 1195 (1971)

Summary

1. The purification of *Streptomyces griseus* ATCC 3463 alkaline proteases from the culture filtrate was attempted by the fractional precipitation with ethanol, chromatography on a column of Sephadex G-100 and CM-cellulose. We achieved a success in the separation of alkaline proteases, namely, the thermophilic proteinase, alkaline proteinase I and II.
2. A single thermophilic proteolytic enzyme was isolated from the media supernatant with 15 % yield and 397-fold purification by means of stepwise alcohol fractionation with ethanol, Sephadex G-100, CM-cellulose, DEAE-cellulose and CM-Sephadex.
3. The purified thermophilic proteinase had optimum activity at pH 10.5 and the isoelectric point at pH 8.8. The enzyme had a remarkable thermostability, and the proteolytic activity decreased gradually to about 70 % for 10 minutes at 90 °C.