

28

助成番号 0128

## 好塩性細菌からの好塩性 且つ 耐熱性酵素の高効率分離と産業的利用

Masao Tokunaga, Matsujiro Ishibashi, Hiroko Tokunaga and Mayumi Miyauchi  
Applied and Molecular Microbiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University

特殊環境に生育する微生物は、通常生物では成し得ない特殊な能力を発揮してその環境に適応している。我々は高濃度塩存在下(味噌・醤油醸造、岩塩等)で生育する特殊環境微生物である好塩性菌が生産する好塩性酵素について研究してきた。通常生物や通常酵素が働けないような高濃度塩存在下で働く好塩性微生物・酵素は、例えば高濃度塩存在下、オープンな環境で腐敗の懸念なく廃棄物処理等様々な反応を遂行できる。我々は好塩性酵素を研究する過程で、極めて興味深い結果を得た。それは、多くの好塩性酵素は耐熱性を示すという事実である。熱に強い酵素は産業的に利用価値が高い。好熱性細菌から分離される好熱性酵素は、至適温度が高く耐熱性も有する。しかし、通常酵素が働く温度や中間的な温度では、逆に反応温度が低すぎて活性が弱い事がある。これに比べ、通常温度で生育する生物から分離されてしかも耐熱性を有する酵素は、通常温度から高温まで幅広い反応温度で働き産業的利用価値が高い。本研究は、耐熱性酵素を好塩性細菌を分離源として効率良く分離することを目的とした。塩存在下・高温での酵素反応は、生物生産における高塩分濃度環境のすぐれた利用法と考えられる。

好熱性・耐熱性酵素は産業的利用価値が高く、新規酵素の開発・利用は重要な課題である。好耐熱性酵素の探索は、好熱菌からの探索と、通常酵素の改変による好耐熱性の付与という2つの方法がとられている。我々は耐熱性酵素発見の効率が極めて高いと考えられる第3の方法を提案し実施した。すなわち、好塩性菌由来酵素は耐熱性を持つという事実に基づいて、好塩性細菌から新規有用性耐熱性酵素をスクリーニングするという方法である。

高度好塩性古細菌の Nucleoside diphosphate kinase の熱安定性を調べたところ、70°Cの熱処理まで安定であった。また、部分精製した中度好塩菌由来の他の酵素についても、熱処理に高い耐性を示すものが分離できた。

そこで産業的利用価値が高い加水分解酵素、特に耐熱性のプロテアーゼについて、当研究室保存の多数の好塩菌をスクリーニングした。粗酵素を調製し、これを70°C、90°Cで処理した後のプロテアーゼ活性を検索した結果、いくつかの株で耐熱性プロテアーゼ活性を検出した。そのうちの1菌株の粗酵素を陰イオン交換樹脂カラムで精製し、約100倍に精製したプロテアーゼ部分精製標品を得た。このプロテアーゼ活性は、極めて熱処理に耐性で、活性に対する至適塩濃度は、1.5~2.0 Mであった。今後さらに精製をすすめる諸性質を明らかにするとともに、遺伝子のクローニングを行いたいと考えている。



## 好塩性細菌からの好塩性 且つ 耐熱性酵素の高効率分離と産業的利用

助成研究者：徳永正雄（鹿児島大学 農学部 生物資源化学科）

共同研究者：石橋松二郎（鹿児島大学 農学部 生物資源化学科）

共同研究者：徳永廣子（鹿児島大学 農学部 生物資源化学科）

共同研究者：宮内まゆみ（鹿児島大学 農学部 生物資源化学科）

## 1. 目的

特殊環境に生育する微生物は、通常生物では成し得ない特殊な能力を発揮してその環境に適応している。我々は高濃度塩存在下（味噌・醤油醸造、岩塩等）で生育する特殊環境微生物である好塩性菌が生産する好塩性酵素について研究してきた。通常生物や通常酵素が働けないような高濃度塩存在下で働く好塩性微生物・酵素は、例えば高濃度塩存在下、オープンな環境で腐敗の懸念なく廃棄物処理等様々な反応を遂行できる。我々は好塩性酵素を研究する過程で、極めて興味深い結果を得た。それは、多くの好塩性酵素は耐熱性を示すという事実である。熱に強い酵素は産業的に利用価値が高い。好熱性細菌から分離される好熱性酵素は、至適温度が高く、耐熱性も有する。しかし、通常酵素が働く温度や中間的な温度では、逆に反応温度が低すぎて、活性が弱い事がある。これに比べ、通常温度で生育する生物から分離されて、しかも耐熱性を有する酵素は、通常温度から高温まで幅広い反応温度で働き産業的利用価値が高い。本研究は、耐熱性酵素を、好塩性細菌を分離源として効率良く分離することを目的とする。塩存在下・高温での酵素反応は、生物生産における高塩分濃度環境のすぐれた利用法と考えられる。

好熱性・耐熱性酵素は産業的利用価値が高く、新規酵素の開発・利用は重要な課題である。好熱性酵素の探索は、好熱菌の探索と、通常酵素の改変による好熱性の付与という2つの方法がとられている。我々は新規発見の効率が極めて高いと考えられる第3の方法を提案したい。すなわち、好塩性菌由来酵素は耐熱性を持つという事実に基づいて、好塩性細菌から新規有用性好熱・耐熱性酵素をスクリーニングするという方法である。アフリカ等の岩塩採掘現場は、劣悪な高温環境にあり、そこで生育する好塩菌は生物的にも高温に強い。好塩菌は古細菌に属する高度好塩菌と、真性細菌に属する中度好塩菌に分類され、その菌相も広く現在までに見つかっていないような反応を触媒する新規好塩・耐熱性酵素を発見できる可能性も考えられる。我々はすでに1000株におよぶ独自に自然界から分離した好塩菌を保持しており、通常のランダムスクリーニングより遙かに効率良く新規好塩・耐熱性酵素を分離できると考えている。特に産業的利用価値の高い加水分解酵素（蛋白分解酵素、バイオマス分解酵素等）を優先的にスクリーニングする。当研究室では、中度好塩菌・高度好塩菌の遺伝子組換え系についても研究が進んでおり、遺伝子の分離に

よるこれら酵素の大量生産も可能と考えられる。

## 2. 方法

高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の培地は、SGC (1% yeast extract, 0.3% Na-citrate, 0.2% KCl, 2% MgSO<sub>4</sub>, 0.0023% FeCl<sub>2</sub>, 0.75% vitamin free casamino acids, pH7.0)-3M NaCl を用いた<sup>1)</sup>。 中度好塩菌の培地は、NB(1% beef extract, 1% polypeptone)-2M NaCl を用いた。

Nucleoside diphosphate kinase の精製には、ATP アガロースカラムを用いた。ATP アガロース(SigmaA2767)樹脂を Bio-Rad polyprep カラムにつめ、50mM Tris-HCl buffer, pH7.5, 25 mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub> 溶液で平衡化した。サンプルをかけた後、同 buffer でカラムを洗浄し、3mMATP を含む同 buffer で吸着した蛋白を溶出した。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動は、Laemmli の方法を用いた<sup>2)</sup>。 蛋白量は、Lowry 法を用いて定量した<sup>3)</sup>。

Protease 活性は、いくつかの基質を試したが、最終的には、カゼインと、合成基質としては L-Alanine-p-nitroanilide を用いた。0.6 ml のカゼイン (Hammarsten)-50 mM リン酸バッファ (pH7.5) 1% 溶液、0.45 ml の 50 mM リン酸バッファ (pH7.5) を混合し、37℃で5分間プレインキュベーションし、これに0.15 ml の酵素液を加えて37℃で60分間反応させる。酵素反応は TCA を終濃度5%になるように加えて停止させ、氷上に30分間おいて、未反応の基質カゼインを変性沈殿させる。14,000rpm, 10 分の遠心分離処理後その上澄みの 280 nm の吸収を測定して酵素活性とした。

L-Alanine-p-nitroanilide は、10mg/ml DMSO に溶解し、この 0.01 ml を 50 mM リン酸バッファ (pH7.5) 0.44 ml と混合し、これに酵素溶液 0.05 ml を加えて、37℃で405 nm の吸収の増加を活性とした。

## 3. 研究結果 及び 考察

### 3.1. 高度好塩菌由来 Nucleoside diphosphate kinase の精製と熱安定性

現在までに報告されている高度好塩菌由来の蛋白質は、その安定性に高濃度の塩の存在を必要とする。この為これら蛋白質を高度に精製することは容易でなく、好塩性酵素の研究が進展しない大きな要因となっていた。

我々は、高度好塩菌由来 DnaK 蛋白を研究する過程の ATP カラムの実験において、NaCl 濃度が0でも ATP カラムに吸着するみかけの分子量 24,000 の蛋白質を発見した。この蛋白質を同定する目的で、SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、プロテインシーケンサーにより N 末端アミノ酸配列を決定したところ、多くの他の生物由来の Nucleoside diphosphate kinase に高い相同性を示した。塩非存在下でも、ATP カラムに吸着するという事実は、この酵素が塩非存在下でも酵素活性を保持することを強く示唆し、今までにない極めて珍しい性質であるとともに、従来好塩性酵素と違い高度に精製

してその諸性質を明らかにし、好塩性のメカニズムを追求する良きモデル材料となると考えられた<sup>45)</sup>。

本酵素は、塩非存在下でも ATP カラムに吸着するが、他のほとんど全ての蛋白質はこの条件下で変性してカラムに吸着しないので、この ATP カラム一回で約 600 倍精製され、97%以上均一に精製された。この精製酵素の諸性質を明らかにしたが、その熱安定性が注目される。Fig. 1 に示したように、75℃、5分の熱処理でも70%近い活性を保持し、高い耐熱性を示した。この実験を契機に、以後の実験で好塩性酵素の耐熱性について検討した。

### 3.2. 抗生物質加水分解酵素の熱安定性

我々は、自然界から分離した中度好塩菌のなかには様々な異物に対して高い耐性を示す菌株が存在することを見だし、抗生物質の分解性についても考察した。中度好塩菌#560株が生産するセファロスポリン分解性の酵素についてその性質を調べ、特にその熱安定性については詳細に検討した。Fig. 2 に示すように部分精製した本酵素は、10分間の煮沸処理後も75%の活性を保持していた。他生物由来の同酵素はこのような耐熱性を示すものの報告はなく、好塩性酵素に極めて特徴的な性質である。

この実験結果に鑑み、好塩性菌より好塩性・耐熱性酵素をスクリーニングすれば、産業的に有用な酵素が得られるのではないかとというアイデアで実験を進めることとした。

### 3.3. 好塩菌から好塩性・耐熱性プロテアーゼのスクリーニング

#### 3.3.1. 耐熱性プロテアーゼのスクリーニング

プロテアーゼは多種類の性質の異なる酵素が知られているので、なるべく広い範囲のプロテアーゼを検出できるように、活性測定の基質に関して種々検討した。Azocoll, Azocasein, Hammerstein casein、牛血清アルブミン等について中度好塩菌の粗酵素と proteinase K を用いて基質としての有用性を検討した。反応条件は種々検討の結果、前項2. 方法に記載したとうり行った。Fig. 3 に proteinase K による casein 分解の蛋白量変化依存性を示しているが、きれいな直線性を示して、この条件下で assay が正しく進行していることが示された。

当研究室には1000株に及ぶ自然界から独自に分離した菌株を保存しているが、耐熱性プロテアーゼを上記カゼイン分解活性を指標にスクリーニングした。粗酵素を70℃もしくは90℃で熱処理し、その上澄みについてカゼイン分解活性を測定した。結果の一部を Fig. 4 に示した。熱処理後多くの菌株でプロテアーゼ比活性が上昇しており、これはこの熱処理で変性除去される蛋白質と耐熱性プロテアーゼの存在を示していると考えられた。この中で、菌の生育が良く、プロテアーゼ活性も高い#1Na株を用いてより詳細に検討することとした。

### 3.3.2. アミノペプチダーゼ活性の検出

プロテアーゼには様々な基質に対して、様々な反応機構を示すものがあり、特定の合成基質を使ってその基質特異性を類推できる。種々市販されているプロテアーゼ合成基質を用いて、中度好塩菌粗酵素中に、どのような種類のプロテアーゼが存在しているのか類推しようとした。試した Bz-DL-Arg-pNA, Bz-Tyr-pNA, Leu-pNA, Ala-pNA, Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, Z-Ala-Ala-Leu-pNA, Pyr-Phe-Leu-pNA のうち、Fig. 5 に示したように、Leu-pNA, Ala-pNA において活性が認められ、アミノペプチダーゼ様酵素が存在することが示唆された。そこでこの酵素の耐熱性を調べるために、部分精製を行った。精製は陰イオンクロマトグラフィー(リソースQカラム)でおこない、アミノペプチダーゼ活性は Fig. 6 に示すように食塩の濃度勾配(0.1-1.0 M)の約0.5 M 辺りに溶出された。そこでこの部分精製標品を用いてこのアミノペプチダーゼの耐熱性を調べたが、残念ながら高い熱安定性は示さなかった。耐熱性ではなかったが、本中度好塩菌より初めてアミノペプチダーゼ活性を検出した。

### 3.3.3. 耐熱性プロテアーゼの部分精製と諸性質

耐熱性プロテアーゼを部分精製することを試みた。粗酵素を80%硫酸塩析して低分子物質を除き、透析後Qセファロースカラムにかけ、食塩の段階的溶出を行った。0.5-0.6 M 食塩画分にプロテアーゼ活性が検出されたので、この画分を集め、再度Qカラムにかけ、今回は0.3-0.8 M の食塩の直線的濃度勾配で溶出した。各画分のプロテアーゼ活性を測定してグラフにしたものが、Fig. 7 である。A, B, C と3つのプロテアーゼ活性ピークが検出できた。A, B, C の精製度合いは、粗酵素からそれぞれ91, 95, 195倍であった。ここでは一応A, B, C の3種として扱うが、もちろん精製は完全でなく、相互に混在していると思われるし、また、もっと多種類のプロテアーゼが混合されていることも十分考えられる。以下諸性質を調べたが、これはあくまで部分精製標品での結果であり、完全精製した酵素標品での検討が今後の課題として残されている。

まず、熱安定性について考察した。Fig. 8 に示すように、A, B, C の3画分をそれぞれ70, 90, 100°Cで10分間処理後、活性を測定したところ、3種ともいずれの熱処理でもほとんど活性を失わず、極めて高い熱耐性を示した。

次に、酵素活性に及ぼす塩濃度の影響を調べた。結果はFig. 9 に示すように、A, B は2 M 食塩存在下、C は1.5 M 食塩存在下で最大活性を示し、好塩性をしめした。しかし、塩を添加しなくとも最大活性の少なくとも50%以上の活性を示し、これらプロテアーゼ活性は、その安定性に必ずしも高い塩を要求しないということが示唆され、これは産業的利用をめざすときに、好塩性酵素の「通常環境での不安定性」というハンディを克服した大量生産、大量利用にとって有利な条件である。

最後に各種プロテアーゼ阻害剤の添加効果を検討した。Fig. 10の結果に示すごとく、このプロテアーゼは汎用されるプロテアーゼ阻害剤に極めて高い耐性を示した。ただし、酵素が失活するであろう0.1%のSDSの添加では活性がホが完全に抑制され、未知の非酵素的反応のようなものではないことは確かである。この阻害剤の結果より、これらプロテアーゼは、高濃度の阻害剤を必要とする、もしくは、異なった基質特異性を持つ等の新規な性質を持っている可能性も示唆された。完全精製標品での詳細な検討が必要と思われる。

#### 4. 今後の課題

本助成研究によって、好塩性酵素には高い耐熱性を示すものが多数見られ、この利点を生かして好塩性酵素の広範囲にわたる産業的利用の可能性がさらに強く示されたと考える。好塩性酵素の好塩性メカニズムは未だ解明途中であるが、耐熱性の機構もこの好塩性の機構と関係していることはほぼ間違いないであろう。好塩性酵素は、酸性アミノ酸に富み、塩基性アミノ酸や分子量の大きい疎水性アミノ酸が少ないという明かな構造的特徴を有しているため、好塩性・耐熱性酵素の分子育種もこのような特徴を生かして行なってゆけば良さそうだということは容易に想像できる。好熱菌が生産する好熱性酵素の好熱性メカニズムは、多くの可能性が示唆されており、よって通常酵素の好熱性酵素への改変・分子育種はなかなか難しいが、それよりもストラテジーがより明確な通常酵素から好塩性酵素・耐熱性酵素への分子育種はより成功の可能性が高いと考えられる。今後も、より広範囲の好塩性菌からより多くの好塩性・耐熱性酵素をスクリーニングしてゆくことが必要である。

耐熱性プロテアーゼについては、基質特異性の問題等々これから解明すべき問題が多くあり、精製を進め、蛋白化学的・酵素化学的性質を明らかにして、さらに、遺伝子クローニングを成功させ、大量発現系の構築等、順次精力的に研究を進展させる計画である。

#### 5. 参考文献

- 1) Shegal, S. N., and Gibbons, N. E. (1960) *Can. J. Microbiol.* 6, 165-169
- 2) Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, 227, 680-685
- 3) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275
- 4) Ishibashi M. et al. (2001) *FEBS Lett* 493, 134-138 (2001)
- 5) Yonezawa, Y. et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 2343-2346 (2001)

(文献4)5)は、ソルトサイエンス研究財団の助成(番号 9931)により当研究室で成された成果である。)

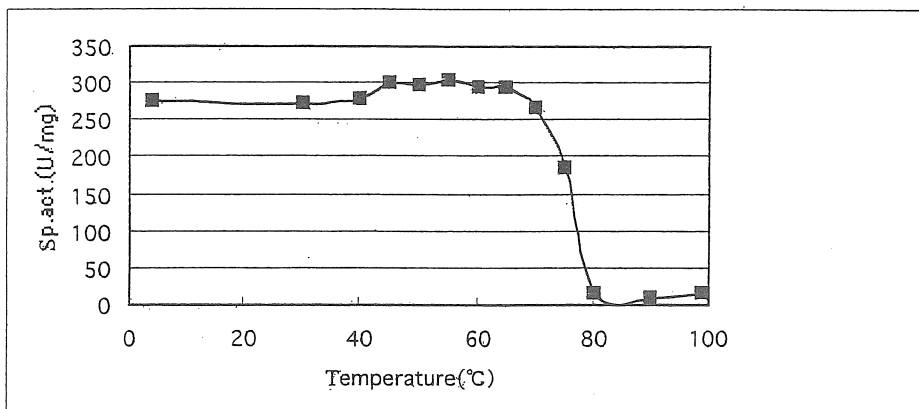


Fig. 1. Thermo-stability of nucleoside diphosphate kinase.

Purified enzyme was heat-treated at various temperature for 5 min and assayed activity.

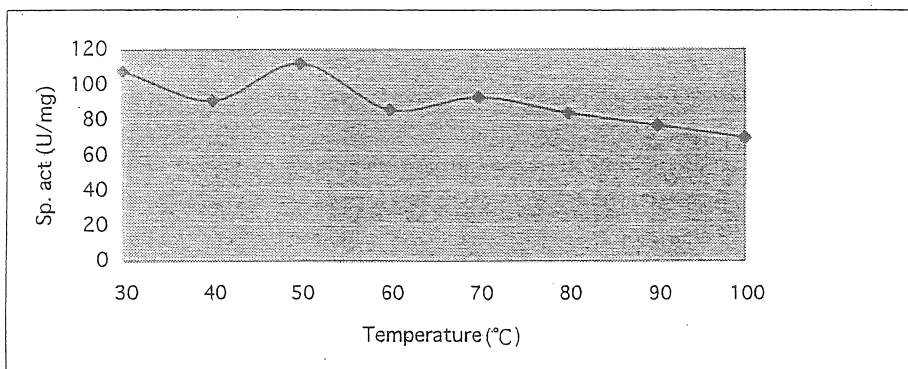


Fig. 2. Thermo-stability of antibiotic hydrolyzing enzyme.

Partially purified enzyme was heat-treated at various temperature for 10 min and assayed activity.

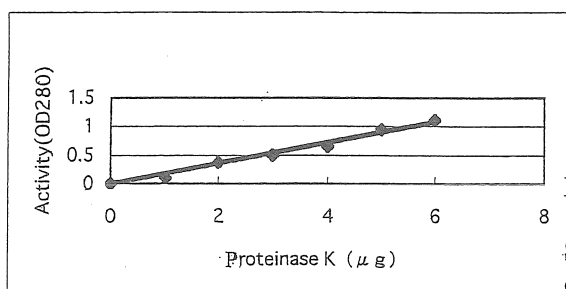


Fig. 3. Protease assay using casein as a substrate.

Standard protease assay was carried out as described in Methods using casein as a substrate and proteinase K as a protease.



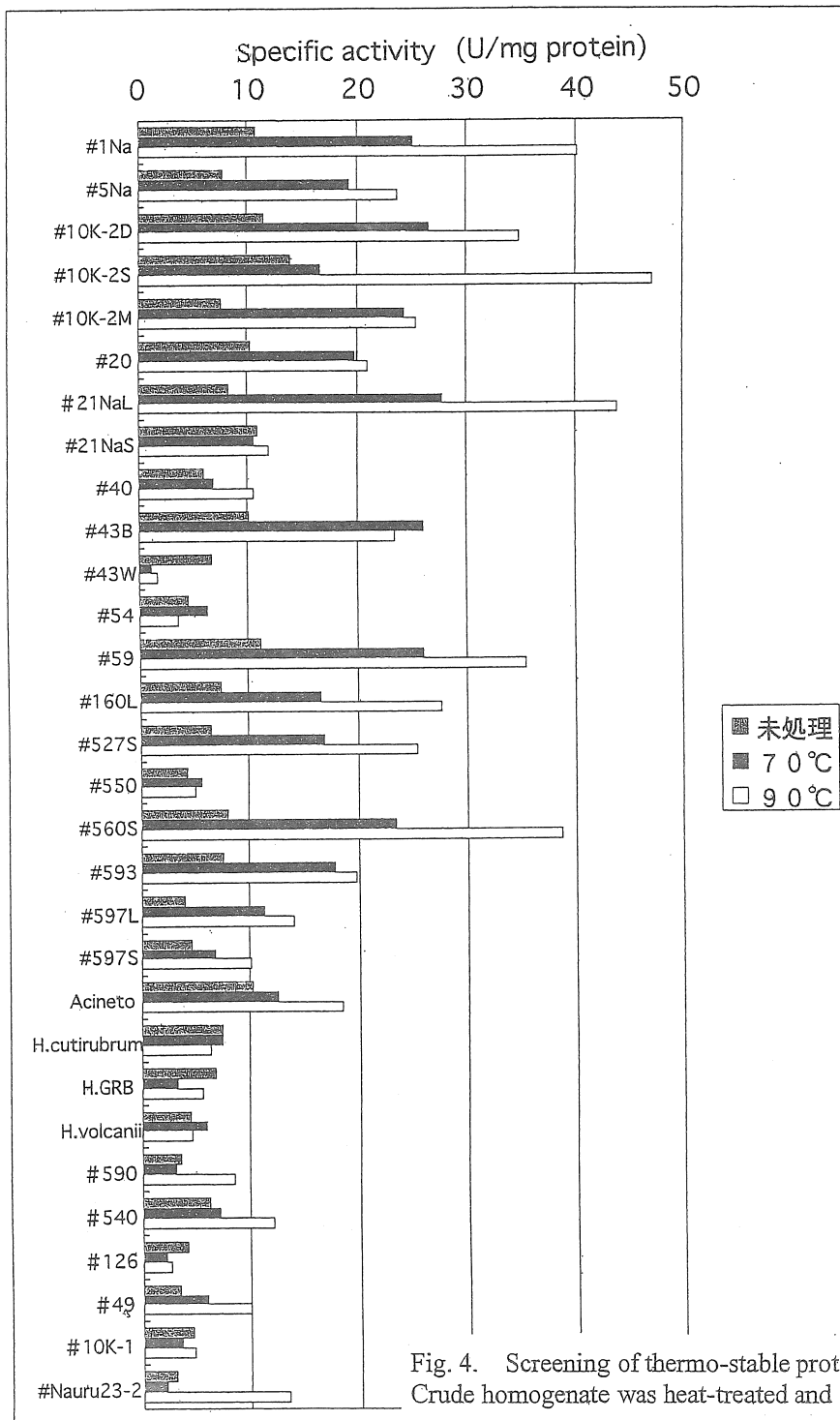


Fig. 4. Screening of thermo-stable protease. Crude homogenate was heat-treated and assayed.

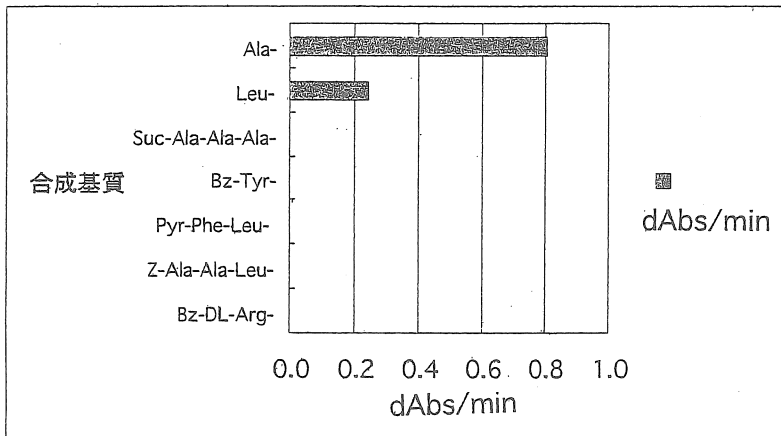


Fig. 5. Protease assay using synthetic protease substrates.

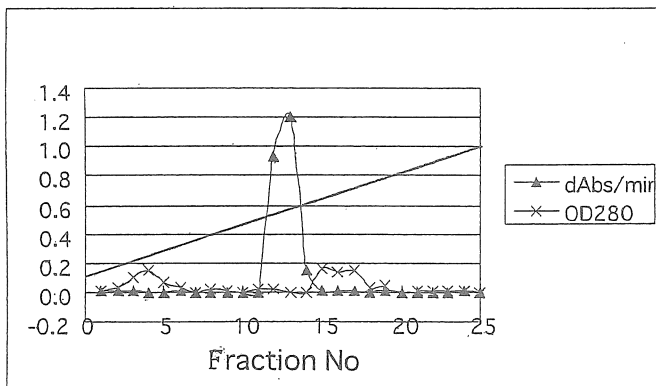


Fig. 6. Elution pattern of aminopeptidase activity on Q column.

Crude homogenate was applied to Resource Q column and eluted with linear gradient of NaCl (0.1-1.0 M). Aminopeptidase activity was assayed.

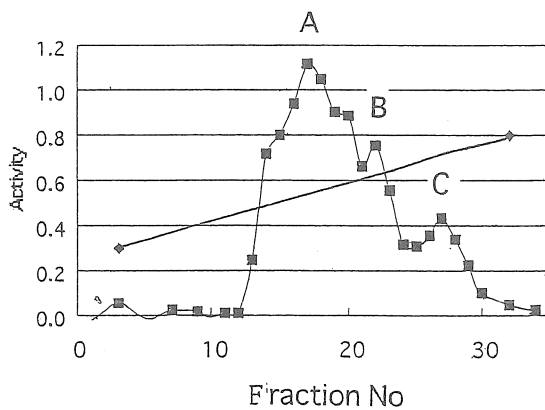


Fig. 7. Elution pattern of protease activity on Resource Q column.

Partially purified enzyme was applied to Resource Q column and eluted with 0.3 to 0.8 M NaCl gradient. Protease activity was assayed using casein as a substrate.

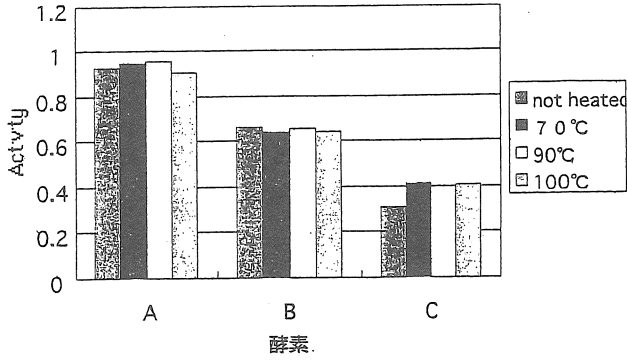


Fig. 8. Thermo-stability of partially purified proteases. Partially purified proteases were heat-treated at 70, 90 and 100 C for 10 min and assayed enzyme activity using casein as a substrate.

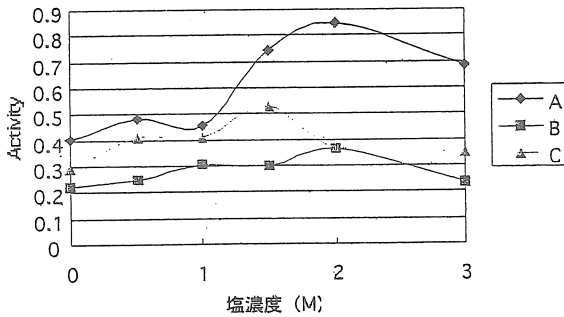


Fig. 9. Optimum salt concentration for protease activity. Protease activity was assayed in the presence of 0 to 3 M NaCl.

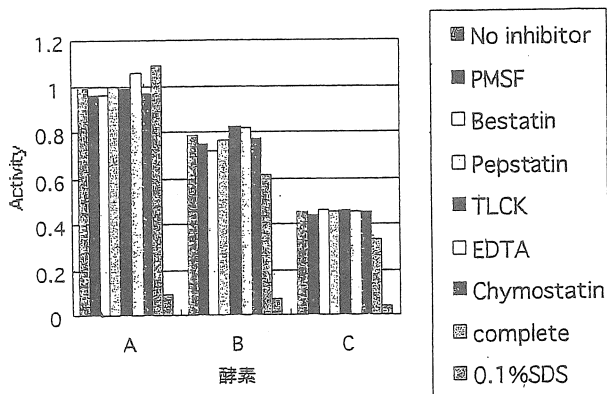


Fig. 10. Effects of protease inhibitors. Enzyme was preincubated with various protease inhibitors for 5 min and then assayed activity in the presence of inhibitors.

Halophilic and thermo-stable enzymes from halophilic bacteria.

Masao Tokunaga, Matsujiro Ishibashi,  
Hiroko Tokunaga and Mayumi Miyauchi  
Faculty of Agriculture, Kagoshima University

### Summary

We have attempted to characterize halophilic enzymes, aiming at expansion of their industrial applications. Extremely halophilic archaea and moderately halophilic bacteria require more than 2.5 M and 0.5 M NaCl for growth, respectively and accumulate high concentration of ions and compatible solutes inside the cells. Thus, the industrial application of halophilic enzymes is very attractive, since these enzymes can function under the extreme conditions where most of the 'normal' enzymes cannot. In addition, we have found that many halophilic enzymes showed obvious thermo-stability against heat treatment of enzymes. This property is another advantage of halophilic enzymes for industrial applications. Nucleoside diphosphate kinase from extremely halophilic archaea was stable up to 70 °C, and a certain hydrolytic enzyme from moderately halophilic bacteria maintained 70% activity after boiling for 10 min.

In this study, we attempted to screen thermo-stable proteases from halophilic bacteria, which we have isolated from the natural habitat and stocked in this laboratory. Crude homogenates from these strains were treated at 70 °C or 90 °C for 5 min, and protease activities were assayed for Azocoll, Azocasein, and Hammerstein casein as well as several synthetic protease substrates. Several strains contain thermo-stable protease activities. We partially purified proteases from one of these strains, and confirmed that these proteases remained fully active after boiling for 10 min.