

助成番号 0820

耐塩性プロテアーゼ遺伝子の解析と組換え微生物による同酵素の大量生産

竹中 慎治

神戸大学大学院農学研究科

概要 耐塩性プロテアーゼ生産菌 *Bacillus subtilis* FP-133 株は、菌体外に2種類のプロテアーゼ Expro-I (endo 型セリンプロテアーゼ) および Expro-II (endo 型金属プロテアーゼ) を見だし、それらが 0~20% NaCl 中で酵素活性を示す特異なプロテアーゼであることを見出した。そこで、本研究では、これらの菌体外プロテアーゼについて酵素のアミノ酸配列から詳細に解析するため、同酵素遺伝子をクローニング・解析することを目的とした。また、同酵素の応用を最終目標として組換え微生物によるプロテアーゼの生産も試みた。

Expro-I 遺伝子をクローニングし、その塩基配列 1,149 bp を決定した。Expro-I は 107 アミノ酸残基からなるシグナル配列を成熟タンパク質の N 末端側に有していた。塩基配列から推定される成熟タンパク質のアミノ酸配列について相同性検索・系統解析した結果、既報の *Bacillus* 属由来のセリンプロテアーゼとアミノ酸レベルで非常に高い類似性を示した。類似性の高い既報のプロテアーゼは、植物寄生性の線虫の表皮コラーゲンの分解に関与する subtilisin タイプのセリンプロテアーゼであると報告されているが、耐塩性については明らかではなかった。そこで、代表的なセリンプロテアーゼと比較したところ、活性発現に関与するアミノ酸残基 (Asp³², His⁶⁴, Ser²²¹) について保存性が見られたが、Ala や Ser 等のアミノ酸残基がより親水性の高いアミノ酸残基 (Asp³⁶, Asp⁹⁹, Glu¹⁵⁶, Asp¹⁹⁷, Glu²⁵¹, Asp²⁵⁹) に置き換わっていることを見出した。

Expro-II 遺伝子をクローニングし、その塩基配列 1,566 bp を決定した。Expro-II は 221 アミノ酸残基からなるシグナル配列を成熟タンパク質の N 末端側に有していた。塩基配列から推定される成熟タンパク質のアミノ酸配列について相同性検索・系統解析した結果、既報の *Bacillus* 属由来の金属 (亜鉛) プロテアーゼとアミノ酸レベルで非常に高い類似性を示した。そのなかで、*Bacillus vietnamensis* 11-4 株由来金属プロテアーゼは、Expro-II と耐塩性の点で類似していた。また、代表的な金属 (亜鉛) プロテアーゼと比較したところ、活性発現に関与するアミノ酸残基 (Glu¹⁴³, Asp²²², His²²⁷) や亜鉛結合モチーフ (HEXXH) に保存性が見られた。

シグナル配列領域を含まない Expro-I 遺伝子をクローニングし、つづいて大腸菌形質転換株を得た。形質転換株を培養し、得られた菌体から調製した細胞抽出液のプロテアーゼ活性を調べたところ、インサート DNA を含まないプラスミドのみを有するコントロールと比較して高活性であった。

1. 研究目的

耐塩性酵素は、塩の存在下および非存在下の両方で活性を示す酵素と定義される。一方、好塩性酵素は、塩の存在下においてのみ活性を示す酵素と定義される。タンパク質を含む食品は、食塩 (NaCl) を加えた状態で加工することが多いため、耐塩性および好塩性タンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) が、加工の過程で重要な働きをする

と考えられる。本研究では、好塩性プロテアーゼに比べて、研究報告例の少ない耐塩性プロテアーゼを研究対象とする。

当研究室では、耐塩性プロテアーゼ生産菌 *Bacillus subtilis* FP-133 株を塩蔵食品から分離した。つづいて、本菌の菌体内に1種類 (Inpro-I)、菌体外に2種類のプロテアーゼ (Expro-I および II) を見だし、それらの酵素化学

的特性をすでに明らかにした¹⁻³⁾。Inpro-Iはexo型プロテアーゼ、Expro-Iはendo型セリンプロテアーゼ、Expro-IIはendo型金属プロテアーゼで、何れも0~20% NaCl中で酵素活性を示す特異なプロテアーゼであった。特に、Expro-IIは酵素分子内に鉄を含み、Fe²⁺またはFe³⁺によって活性化された。これらの性質は、細菌由来のプロテアーゼとしてはきわめて特異である。

本研究では、上記3種耐塩性プロテアーゼの内、菌体外プロテアーゼ2種について酵素のアミノ酸配列から詳細に解析するため、同酵素遺伝子をクローニング・解析することを目的とした。また、得られた遺伝子を用いて、同酵素の応用を最終目標として組換え微生物によるプロテアーゼの生産系の確立も試みた。

2. 研究方法

2.1 使用菌株および培養条件

2.1.1 使用菌株

プロテアーゼ生産菌 *Bacillus subtilis* FP-133 株および *Escherichia coli* XL1-Blue (遺伝子組換え用)を用いた。

2.1.2 培養条件

FP-133 株は、2.5%(w/v) スキムミルク -5%(w/v) NaClを含むスキムミルク培地 (pH 5.5)¹⁾にて保存した。本菌由来のゲノム DNA 調製の際は、2.5%(w/v) ポリペプトン-5%(w/v) NaClを含むポリペプトン培地 (pH 5.5)を用い、7.0 ml/tube の同培地にて30°Cで24時間培養後、前培養液1 mlを400 ml/3L 振とうフラスコの同培地に移植し、30°Cで17時間振とう培養した。培養液を遠心分離(8,000 × rpm, 10 min)することにより菌体を回収し、得られた菌体を100 mM EDTA・2NaCl-0.15 M NaCl溶液にて洗浄後、-80°Cにて保存した。

E. coli XL1-Blueは、Luria-Bertani 培地 (pH 7.0)を用いて37°Cにて培養した。また、必要に応じてアンピシリン(終濃度 100 µg/ml)、IPTG (0.2 mM)、X-Gal (0.04%)を同培地に添加し、培養した。

2.2 プロテアーゼ活性測定

酵素活性測定法は Kunitz の方法⁴⁾ および既報の方法¹⁾に従った。カゼインは、ICN Biomedicals Inc. (OH, Aurora)を用いた。

2.3 FP-133 株由来ゲノム DNA の調製と Expro-I および Expro-II 遺伝子断片の増幅

2.3.1 FP-133 株由来ゲノム DNA の調製

既報の方法⁵⁾に従い、本菌の湿菌体を溶菌し、エタノールによる巻き取り法にてゲノム DNA を回収した。

2.3.2 PCR による Expro-I および Expro-II 遺伝子断片の増幅

Expro-I 由来の N 末端アミノ酸配列 (AESVPYGVGS EIKAPAL) および Expro-II 由来の N 末端アミノ酸配列 (AAATGTGGTLKKGKTV) を DDBJ にて BLAST プログラムにて解析した。Expro-I 由来の N 末端アミノ酸配列は既報の *Bacillus subtilis* 由来 subtilisin 類と Expro-II 由来の N 末端アミノ酸配列は既報の *Bacillus subtilis* 由来中性プロテアーゼ類と高い類似性を示した。そこで、既報の類縁酵素について保存性を調べ、Table 1 に示すプライマーを設計した。本菌のゲノム DNA を鋳型として Expro-I 遺伝子用プライマー (primer 1, 2) を用いて Expro-I 遺伝子断片の増幅を試み、0.4 kb の DNA 断片の増幅が見られた。一方、Expro-II 遺伝子用プライマー (primer 3, 4) を用いて、0.52 kb の DNA 断片の増幅が見られた。

2.4 サザンハイブリダイゼーション

本菌由来ゲノム DNA (10 µg) を各種制限酵素にて消化後、エタノール沈殿により消化断片を回収した。回収サンプルの10分の1量を1%(w/v) アガロース電気泳動に供し、GeneScreen Plus (NEN Life Science Products, Boston) に VacuGene XL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて転写し、アルカリ条件下で DNA を固定した。ハイブリダイゼーションおよびメンブレンの洗浄等は、AlkPhos Direct (GE Healthcare) の使用マニュアルに従った。55°C で20時間ハイブリダイゼーションした後、55°Cでメンブレンを洗浄した。メンブレン1 cm²あたり35 µl の CDP-Star detection reagent (GE Healthcare) をメンブレンに滴下し、5分間放置した後、室温で12時間オートラジオグラフィーを行った。Expro-I 遺伝子および Expro-II 遺伝子はそれぞれ HindIII 消化断片 (約3 kb) および BclI 消化断片 (約3 kb) に含まれていることを見出した。

2.5 PCR 増幅断片のクローニングと形質転換株からのプラスミド精製

PCR 用酵素は TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ) または KOD Plus DNA Polymerase (TOYOBO) を用いた。使用したプライマーは Table 1 に示す Expro-I 遺

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

Primer (Designation)	Sequence (5'-3')
1: expro-I F primer	TAYGTIGARGARGAYCA
2: expro-I R primer	TTIATIACRTCCATRTRTT
3: expro-II F primer	GARCCIGCAAYTGGGARG
4: expro-II R primer	ACICCRTGIGTCATYTCRTG
5: expro-I inverse PCR	CGCGAAGCTTGC GCGTACGCCTGTGCAAC
6: expro-I inverse PCR	GCGCAAGCTTGG AATTGAGTGGGCGATCGC
7: expro-II inverse PCR	GCGCGGATCCTGTTTCCGCATCAACGGT
8: expro-II inverse PCR	ATATGGATCCGGTTCAATGGACGTAACGGC
9: expro-I KOD F primer	expro-I inverse PCR と同じ
10: expro-I KOD F primer	TTGCAAGCTTGGTTATTCTGCAAATGA
11: expro-I KOD R primer	expro-I inverse PCR と同じ
12: expro-I KOD R primer	GTTTAAGCTTCCACCCGTCGATCATGGAGC
13: expro-II KOD F primer	ATGCGGATCCTCAACACGTGCTCTCG
14: expro-II KOD R primer	GGTTGGATCCGTAAATCATTTGGTCGCCG
15: expro-II KOD R primer	CGTTGGATCCTTGTTTACAAGCCGACCG
16: expro-II direct primer	AGGAGGAGTGGAGATGGCCGCTGCAACCGGAAC
17: expro-I expression F primer	AGGAGGACAGGCGATGGCGCAGTCCGTG
18: expro-I expression R primer	GTTTAAAGCTTCCACCCGTCGATCATGGAGC

伝子用プライマー (primer 1, 2) または Expro-II 遺伝子用プライマー (primer 3, 4) を用いた。Taq polymerase による増幅断片は、pGEM T-easy Vector System I (Promega, Madison, US) とライゲーションし、*E. coli* XL1-Blue を Hanahan の方法⁶⁾ に従って形質転換した。形質転換株を、アンピシリンを含む 3 ml の LB 培地にて、37°C で 16 時間振とう培養した。得られた菌体から FlexPrep Kit (GE Healthcare) を用いてプラスミドを精製した。

2. 6 DNA シーケンシング

塩基配列決定のための PCR は、KOD Plus DNA Polymerase (TOYOBO) を用い、Expro-I 遺伝子用プライマー (primer 9~12) および Expro-II 遺伝子用プライマー (primer 13~15) をそれぞれ用いた。また、両遺伝子の塩基配列決定にはインバースPCR法も併用し、Expro-I 遺伝子用プライマー (primer 5, 6) および Expro-II 遺伝子用プライマー (primer 7, 8) を用いた。シーケンス反応は、Fluorescein isothiocyanate ラベルした Forward および Reverse プライマーを用い、精製したプラスミド DNA を鋳

型として Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit 7-deaza dGTP (GE Healthcare) により行った。シーケンシングのための電気泳動は、島津 DSQ-2000L DNA sequencer (島津製作所) を用いた。解析には、DSQ システム DSQ-2000L シーケンシングソフトウェア Ver. 1.7.2 (島津製作所) および GENETYX-WIN Ver. 3.1 (ゼネティックス, 東京) を用いた。さらに、Expro-II 遺伝子は前述のシーケンシング反応サンプルではその塩基配列を決定できなかったため、塩基配列が不明瞭な領域は、Expro-II 遺伝子用プライマー (primer 14, 16) を用いてダイレクトシーケンス法により決定した。

2. 7 プロテアーゼ遺伝子発現株の取得

2. 7. 1 プロテアーゼ遺伝子発現のためのクローニング

本菌のゲノム DNA を鋳型としてシグナル配列を含まない Expro-I 遺伝子断片の増幅 (primer 17, 18) を行い、pGEM-T easy vector system とライゲーションした。

2. 7. 2 プロテアーゼ遺伝子発現株のスクリーニング

シグナル配列を含まない Expro-I 遺伝子断片を *E. coli*

XL1-Blue に導入後、得られた形質転換株のプラスミドのサイズ確認および Expro-I 遺伝子用プライマー (primer 17, 18) を用いた PCR による挿入断片の確認を行なった。

2. 8 形質転換株によるプロテアーゼ遺伝子発現

2. 8. 1 形質転換株の培養

形質転換株についてアンピシリン (100 mg/ml) を含む LB 平板培地にて純粋分離し、得られた単一コロニーをアンピシリン (200 mg/ml) を含む LB 液体培地 (7 ml/tube) に移植した。37°C で 14 時間振とう培養して得た前培養液 1 ml をアンピシリン (100 mg/ml) を含む LB 液体培地 (70 ml/500 ml 坂口フラスコ) にさらに移植した。本培養開始 3.5 時間後、1 mM となるように IPTG を添加し、さらに 3 時間振とう培養後、菌体を遠心分離 (20,000 g, 10 min, 4°C) にて回収した。

2. 8. 2 プロテアーゼ活性測定

2. 2 で述べた方法に従った。

2. 8. 3 SDS-PAGE 電気泳動

既報の方法⁷⁾に従い、12.5% アクリルアミドを含むゲルを用いて電気泳動した。

3. 研究結果

3. 1 Expro-I 遺伝子のクローニングと解析

3. 1. 1 Expro-I 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

Expro-I を単一に精製し、同酵素の N 末端アミノ酸配列 (AESVPYGVSEIKAPAL) を解析したところ、既報のアルカリ性セリンプロテアーゼのアミノ酸配列と高い類似性を示した。そこで、酵素およびその遺伝子が明らかとなっている類縁酵素 (*Bacillus* sp. B16 (accession No. AY708655), *Brevibacillus laterosporus* G4 (AY720895), *Bacillus subtilis* (DG241738), *Bacillus intermedius* strain 3-19 (AY754946)) について保存領域を調べ、保存領域に基づいて設計した PCR プライマーを用いて Expro-I 遺伝子の部分断片の増幅と解析を試みた。その結果、401 bp の増幅断片が得られた。同断片の塩基配列を解析したところ、前述の *Bacillus* 属由来のセリンプロテアーゼと高い類似性を示した。決定できた塩基配列を基に inverse PCR 等で FP-133 株由来 Expro-I 遺伝子をコードする ORF の塩基配列を決定することができた。ORF は、1,149 bp の塩基配列からなり、107 残基からなるシグナルペプチドを含ん

でいた (Fig. 1)。塩基配列から推定されるアミノ酸配列中には、精製酵素にて決定した N 末端アミノ酸配列が含まれていた。

3. 1. 2 Expro-I 遺伝子の解析

塩基配列から推定される成熟タンパク質のアミノ酸配列を DDBJ にて相同性検索した結果、*Bacillus* sp. DJ-4 (AY627764)⁸⁾、*Bacillus* sp. B16 (AY708655)⁹⁾、*Brevibacillus laterosporus* G4 (AY720895)¹⁰⁾、*Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 (DQ132806)¹¹⁾、*Bacillus* sp. strain RH219 (DQ983789)¹²⁾ 由来のセリンプロテアーゼとアミノ酸レベルで非常に高い類似性を示した。

3. 2 Expro-II 遺伝子のクローニングと解析

3. 2. 1 Expro-II 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

Expro-II を単一に精製し、同酵素の N 末端アミノ酸配列 (AAATGTTLK GKTV) を解析したところ、既報の金属プロテアーゼのアミノ酸配列と高い類似性を示した。そこで、酵素およびその遺伝子が明らかとなっている類縁酵素 (*Bacillus amyloliquefaciens* (M36723), *B. amyloliquefaciens* (K02497), *Bacillus* sp. B16 (AY708654)) について保存領域を調べ、保存領域に基づいて設計した PCR プライマーを用いて Expro-II 遺伝子の部分断片の増幅と解析を試みた。その結果、521 bp の増幅断片が得られた。さらに、同断片の塩基配列を解析したところ、前述の *Bacillus* 属由来の中性・金属プロテアーゼと高い類似性を示した。決定できた塩基配列を基に inverse PCR 等で FP-133 株由来 Expro-II 遺伝子をコードする ORF の塩基配列を決定することができた。ORF は、1,566 bp の塩基配列からなり、221 残基からなるシグナルペプチドを含んでいた (Fig. 2)。塩基配列から推定されるアミノ酸配列中には、精製酵素にて決定した N 末端アミノ酸配列が含まれていた。

3. 2. 2 Expro-II 遺伝子の解析

塩基配列から推定される成熟タンパク質のアミノ酸配列を DDBJ にて相同性検索した結果、酵素の特性も報告されている *Bacillus vietnamensis* (AB174895)¹³⁾、*Bacillus nematocida* (AY708654)¹⁴⁾、*Brevibacillus laterosporus* G4 (DQ9837875)¹⁵⁾、*Bacillus* sp. strain RH219 (DQ983789)¹²⁾ 由来プロテアーゼとアミノ酸レベルで非常に高い類似性を示した。

```

10          20          30          40          50          60
GGTTATTCTGCAAATGAAAAAGGAGTGGATAAAGAGTGAGAGGCCAAAAAGGTATGGATCA
          70          80          90          100         110         120
          V R G K K V W I
GTTTGCTGTTTGCTTTAGCGTTAATCTTTACGATGGCGTTTCGGCAGCAGCACTTCTGCCC
S L L F A L A L I F T M A F G S T T S A
130        140        150        160        170        180
AGGCTGCAGGAAAATCAAACGGGGAAAAGAAATATATTGTTCGGATTTAAGCAGACAATGA
Q A A G K S N G E K K Y I V G F K Q T M
190        200        210        220        230        240
GCACGATGAGCGCCGCAAGAAAAAGATGTCATTTCTGAAAAAGGCGGGAAAGTGGAAA
S T M S A A K K D V I S E K G G K V E
250        260        270        280        290        300
AGCAATTCAAATATGTAGACGCAGCTTCAGCTACATTTAAATGAAAAAGCTGTAAAAGAGC
K Q F K Y V D A A S A T L N E K A V K E
310        320        330        340        350        360
TGAAAAAGACCCCTAGCGTCgCtTACGTTGAAGAAGAtcAcGTTGCACAGGCGTACGCGC
L K K D P S V A Y V E E D H V A Q A Y A
370        380        390        400        410        420
AGTCCGTGCCCTTACGGCGTATCACAGATTAAAGCCCTGCACTGCACTCTCAAGGCTTCA
Q S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q G F
430        440        450        460        470        480
CCGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGATTCTTCTCATCCTGATT
T G S N V K V A V I D S G I D S S H P D
490        500        510        520        530        540
TAAAGGTAGCAGGCGGAGCCAGCATGGTTCTTCTGAAACAAATCCTTTCCAAGATAACA
L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D N
550        560        570        580        590        600
ACTCTCACGGAACCTCACGTTGCCGGTACAGTTGCAGCTCTTAATAACTCAGTCGGTGTAT
N S H G T H V A G T V A A L N N S V G V
610        620        630        640        650        660
TAGGCGTTGCGCCAAGCGCATCTCTTTACGCTGTAAGTTCTCGGCGCTGACGGTTCCG
LAGGAGVAGAAGPAGSAGAAGSAGLAGYAGAAGVAGKAGVAGLAGGAGAAGDAGGAGSAG
670        680        690        700        710        720
GCCAGTACAGCTGGATCATTAACGGAATTGAGTGGGCGATCGCAAACAATATGGACGTTA
G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D V
730        740        750        760        770        780
TTAACATGAGCCTCGGCGGACCTTCTGGTTCTGCAGCGTTAAAAGCGGCAGTTGACAAAG
I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K
790        800        810        820        830        840
CCGTTGCTTCCGGCGTCGTAGTGGTTGCGGCAGCCGGTAACGAagGCACTTCCGGCGGCT
A V A S G V V V A A A G N E G T S G G
850        860        870        880        890        900
CAAGCACAGTGGGCTACCCTGGTAAATACCCTTCTGTCAATTGCGGTAGGCGCTGTTAACA
S S T V G Y P G K Y P S V I A V G A V N
910        920        930        940        950        960
gcAGCAACCAAAGAGCATCTTTCTCAAGCGTAGGTTCTGAGCTTGTATGTCATGGCACCCAG
S S N Q R A S F S S V G S E L D V M A P
970        980        990        1000       1010       1020
GCGTCTCTATCCAAAGCACGCTTCTTGAAAACAAATACGGAGCGTACAATGGTACGTCAA
G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S
1030       1040       1050       1060       1070       1080
TGGCATCTCCGCACGTTGCCGAGCGGCTTGTATTCTTTCTAAGCACCCGAACTGGA
M A S P H V A G A A A L I L S K H P N W
1090       1100       1110       1120       1130       1140
CAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAAACCCACTACAAAACCTTGGTGATGCTTTCT
T N T Q V R S S L E N T T T K L G D A F
1150       1160       1170       1180       1190       1200
ACTATGAAAAAGGGCTGATCAACGTACAGGCGGAGCTCAGTAAAACATAAAAAACCGGC
Y Y G K G L I N V Q A A A Q *
1210       1220       1230       1240       1250       1260
GTCGGCCATGGCCCGCGGTTTTTTTATTATTTTTCTTCCCTCCGCATGTTCAATCCGCT
CCATGATCGACGGGTGG

```

Fig. 1. Nucleotide (upper line) and deduced amino acid (lower line) sequences of Expro-I gene. The white box indicates that the NH₂-terminal amino acid sequence of purified Expro-I.

10 20 30 40 50 60
 GTGGGTTTAGGTAAGAAATTTGTCTGTGTGCTGTGCGCCGCTTCCTTTATGAGTTTAACCATC
 V G L G K K L S V A V A A S F M S L T I
 70 80 90 100 110 120
 AGTCTTCCGGTGTTCAGGCCGCTGAGAATCCTCAGCTTAAAGAAAACCTGACGAACTTT
 S L P G V Q A A E N P Q L K E N L T N F
 130 140 150 160 170 180
 GTGCCGAAGCATTTCTTTGGTGCAATCTGAATTGCCTTCAGTCAGTGACAAAGCAATCAAG
 V P K H S L V Q S E L P S V S D K A I K
 190 200 210 220 230 240
 CAATACTTGAAACAAAACGGCAAAGTCTTCAAAGGCAACCCCTTCTGAGAGACTGAAGCTG
 Q Y L K Q N G K V F K G N P S E R L K L
 250 260 270 280 290 300
 ATTGACCACACGACCGATGATCTCGGCTATAAGCACTTCCGTTATGTGCCTGTGCTTAAC
 I D H T T D D L G Y K H F R Y V P V V N
 310 320 330 340 350 360
 GGTGTGCCGTGAAAGACTCGCAAGTCATTATTCACGTCGATAAAATCCAACAATGTCTAT
 G V P V K D S Q V I I H V D K S N N V Y
 370 380 390 400 410 420
 GCGATTAACGGTGAATTAACAACGATGCTTCTGCCAAAACGGCAAACAGCAAAAAATTA
 A I N G E L N N D A S A K T A N S K K L
 430 440 450 460 470 480
 TCTGCAAAATCAGGCGCTGGATCATGCTTTTAAAGCAATCGGCAAATCACCTGAAGCCGTC
 S A N Q A L D H A F K A I G K S P E A V
 490 500 510 520 530 540
 TCCAACGGCAACGTTGCAAAACAAAACAAAGCCGAGCTGAAAAGCAGCGCCACAAAAGAC
 S N G N V A N K N K A E L K A A A T K D
 550 560 570 580 590 600
 GGTAATAACCGACTCGCCTATGATGTAACCATCCGCTACATCGAACCGGAACCAGCTAAC
 G K Y R L A Y D V T I R Y I E P E P A N
 610 620 630 640 650 660
 TGGGAAGTAACCGTTGATGCGGAAAACAGGGAAAAGTCCTGAAAAAGCAAAACAAAGTGGAG
 W E V T V D A E T G K V L K K Q N K V E
 670 680 690 700 710 720
 CATGCCGCTGCAACCGGAACAGGTACGACTCTTAAAGGAAAAACGGTCTCATTAAATATT
 H A A A T G T G T T L K G K T V S L N I
 730 740 750 760 770 780
 TCTTCTGAAAACGGCAAATATGTAATGCGTGATCTTTTCGAAGCCTACCGGAACACAAATT
 S S E N G K Y V M R D L S K P T G T Q I
 790 800 810 820 830 840
 ATTACGTACGATCTGCAAAACCGACAATATAACCTGCCGGGCACGCTCGTATCAAGCACT
 I T Y D L Q N R Q Y N L P G T L V S S T
 850 860 870 880 890 900
 ACAAACCAGTTTCAAACTTCTTCTCAGCGCGCTGCGGTTGATGCGCATTACAATCTCGGC
 T N Q F T T S S Q R A A V D A H Y N L G
 910 920 930 940 950 960
 AAAGTGTATGATTATTTCTATCAGACGTTTAAACGCAACAGCTACGACAATAGAGGCGGC
 K V Y D Y F Y Q T F K R N S Y D N R G G
 970 980 990 1000 1010 1020
 AAAATCGTATCTTCCGTTTCATTACGGCAGCAGATAACAATAACCGGGCCTGGRTCGGCGAC
 K I V S S V H Y G S R Y N N A A W X G D
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CAAATGATTTACGGTGACGGTGACGGCTCATTCTTCTCGCCTCTTTCCGGTTCAATGGAC
 Q M I Y G D G D G S F F S P L S G S M D
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GTAACGGCCCATGAAATGACACACGGCGTTACACAGGAAACAGCCAACCTGAACTATGAA
 V T A H E M T H G V T Q E T A N L N Y E
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AATCAGCCGGGCGCTTTAAACGAATCCTTCTCCGATGTATTTCGGGTACTTCACCGATACT
 N Q P G A L N E S F S D V F G Y F T D T
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GAGGACTGGGATATCGGTTGAGGATATTACGGTCAGCCAGCCGGCTCTCCGAGCTTATCC
 E D W D I G E D I T V S Q P A L R S L S
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 AATCCGACAAAATACGGACAGCCCGACCATTACAAAAATATCAAAAACCTTCCGAACACT
 N P T K Y G Q P D H Y K N Y Q N L P N T

```

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
GATGCCGGCGACTACGGCGGCGTGCATACAAAACAGCGGAATTCCGAACAAAGCCGCTTAC
D A G D Y G G V H T N S G I P N K A A Y
      390      1400      1410      1420      1430      1440
AACACGATTACAAAAATCGGAGTGAAAAAAGCGGAGCAGATTTACTATCGCGCACTGACG
N T I T K I G V K K A E Q I Y Y R A L T
      1450      1460      1470      1480      1490      1500
GTATATCTCACTCCGTCATCAAGCTTTAAAAGATGCAAAAAGCAGCTTTTGATTCAATCAGCG
V Y L T P S S S F K D A K A A L I Q S A
      1510      1520      1530      1540      1550      1560
CGGGACCTTTACGGCTCTCAAGACGCTGCAAGCGTAGAAGCGGCCTGGAATGCGGTGCGC
R D L Y G S Q D A A S V E A A W N A V G

TTGTAA
L *

```

Fig. 2. Nucleotide (upper line) and deduced amino acid (lower line) sequences of Expro-II gene. The white box indicates that the NH₂-terminal amino acid sequence of purified Expro-II.

3. 3 Expro-I 遺伝子の発現

形質転換株を培養し、得られた菌体から調製した細胞抽出液のプロテアーゼ活性を調べたところ、インサート DNA を含まないプラスミドのみを有するコントロールと比較して高活性であった (Table 2)。

Table 2. Expression of Expro-I gene in *E. coli*.

Strain	Control (Blue colony)	Strain els-No. 10
Total activity (U/3.5 ml)	5.74	14.0
Specific activity (U/mg)	0.54	1.11

4. 考 察

4. 1 Expro-I および既報の類縁プロテアーゼとの特性比較

FP-133 由来 Expro-I のアミノ酸配列と高い類似性を示した既報の類縁酵素は、(AY720895)¹⁰⁾、*B. Amylolyquefaciens* DC-4 (DQ132806)¹¹⁾ 由来プロテアーゼであり、これらの類縁酵素は植物寄生性の線虫の表皮コラーゲンの分解または線維素の溶解に関与する subtilisin タイプのセリンプロテアーゼであると報告されている。既報の類縁酵素については、酵素活性に及ぼす塩 (NaCl) の影響は検討されていなかった。そこで、他の特性について FP-133 株由来 Expro-I と比較する (Table 3) と、わずかではあるが温度や pH 安定性に相違が見られた。

また、FP-133 株由来 Expro-I とアミノ酸レベルでの類似

性が高い既報の酵素は、*B. amyloliquefaciens* 由来 subtilisin BPN' や *Bacillus licheniformis* 由来 Carlsberg と同じく subtilase family A の中で Ture subtilisine 族に分類されている¹⁶⁾。そこで、同族に属する代表的な subtilisin とともに CLUSTALW ver. 1.83 にて Expro-I を系統解析した (Fig. 3)。その結果、活性発現に関与するアミノ酸残基として Asp³²、His⁶⁴、Ser²²¹ について保存性が見られた。好塩性酵素の構造安定化には、① グルタミン酸やアスパラギン酸などの負電荷を有するアミノ酸残基が関与する説と② タンパク質内部の疎水性相互作用が増大する説が考えられている¹⁷⁾。そこで、Fig. 3 に示した五つの酵素についてさらに比較したところ、Expro-I、subtilisin BPN' において、その他の三つのプロテアーゼに見られるアラニンやセリン等のアミノ酸残基がより親水性の高いアミノ酸残基 (Asp³⁶、Asp⁹⁹、Glu¹⁵⁶、Asp¹⁹⁷、Glu²⁵¹、Asp²⁵⁹) に置き換わっていた。よって、Expro-I が 0~20% NaCl 中で酵素活性を示すのはこれらの親水性アミノ酸によるのではないかと考えられる。

4. 2 Expro-II および既報の類縁プロテアーゼとの特性比較

FP-133 由来 Expro-II のアミノ酸配列と高い類似性を示した既報の類縁酵素 (金属プロテアーゼ) 酵素は、*Bacillus vietnamensis* (AB174895)¹³⁾、*Bacillus nematocida* (AY708654)¹⁴⁾、*Brevibacillus latrosporus* G4 (DQ9837875)¹⁵⁾、*Bacillus* sp. strain RH219 (DQ983789)¹²⁾ 由来プロテアーゼであった。ベトナム産の魚醬から分離された *B. vietnamensis* 由来の金属プロテアーゼ以外

Table 3. Comparison of characteristics with serine proteases

Strain	<i>B. subtilis</i> FP-133	<i>B. amyloliquefacience</i> DC-4	<i>Brevibacillus laterosporus</i> G4
Enzyme name	Expro-I	Subtilisin DFE	—
Identity (%)	—	98%	98%
Molecular mass (SDS-PAGE)	29 kDa	28 kDa	30 kDa
Optimum pH	7.5	9.0	—
Effect of temperature	60°C	48°C	50°C
pH stability	5.5 - 10 (> 70%)	—	4 - 10
Thermo stability	70°C	—	25 - 50°C

```

Expro_I      AQSVPYGVSQIKAPALHSQGF TGSNVKVAVIDDSGISDSSHPDLKVAGGASMPSETNPFQD
BPN          AQSVPYGVSQIKAPALHSQGY TGSNVKVAVIDDSGISDSSHPDLKVAGGASMPSETNPFQD
subtilisinE  AQSVPYGISQIKAPALHSQGY TGSNVKVAVIDDSGISDSSHPDLNVRGGASFVPSETNPFQD
Carlsberg    AQTVPYGIPLIKADKVQAQGF KGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGASFVAGEA-YNTD
DY           AQTVPYGIPLIKADKVQAQGY KGANVKVGIIDTGIAASHTDLKVVGGASFVSGES-YNTD
            **:****: . ***  :****: .*:*****: .*:*** :** .**:*  ****: . . . *

Expro_I      NNSHGHVAGTVAALNNSVGLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMD
BPN          NNSHGHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMD
subtilisinE  GSSHGHVAGTIAALNNSIGVLGVSPSASLYAVKVLDTGSGQYSWIINGIEWAISNNMD
Carlsberg    GNGHGHVAGTVAALDNTTGV LGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGTYSIVSGIEWATTNGMD
DY           GNGHGHVAGTVAALDNTTGV LGVAPNVSLYAIKVLNSSGSGTYSIVSGIEWATQNGLD
            ...*****:****: : *****: . . *****:****: : *** ** *: .*****  *.:*

Expro_I      VINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAV
BPN          VINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAV
subtilisinE  VINMSLGGPTGSTALLKTVVDKAVSSGIVVAAAAGNEGSSGSTSTVGYPAKYPSVIAVGAV
Carlsberg    VINMSLGGPSGSTAMKQAVDNAYARGVVVAAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAV
DY           VINMSLGGPSGSTALKQAVDKAYASGIVVAAAAGNSGSSGQNTIGYPAKYDSVIAVGAV
            *****:****: * .***: : *:* .***** .*:** . .:*** .** * .*****

Expro_I      NSSNQRAFSSVSGELDVMAPGVS IQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPN
BPN          DSSNQRAFSSVSGPELDVMAPGVS IQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPN
subtilisinE  NSSNQRAFSSAGSEL DVMAPGVS IQSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPT
Carlsberg    DSNNSRAFSSVGAELVMAPGAGVYSTYPTSTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPN
DY           DSNKNRAFSSVGAELVMAPGVS VYSTYPSNTYTSLNGTSMASPHVAGAAALILSKYPT
            :* . . :***** .*.**:****** . .: ** * . . . : *****:*****:*****:*.

Expro_I      WTNTQVRSSLENTTTKLGDAFY YGKGLINVQAAAQ
BPN          WTNTQVRSSLENTTTKLGDSFY YGKGLINVQAAAQ
subtilisinE  WTNAQVRDRLESTATYLGNSFY YGKGLINVQAAAQ
Carlsberg    LSASQVRNRLSSTATYLGSSFY YGKGLINVEAAAQ
DY           LSASQVRNRLSSTATNLGDSFY YGKGLINVEAAAQ
            : :***. * . . :* ** .:*****:*****
    
```

Fig. 3. Comparison of the amino acid sequence of Expro-I with those of other subtilisin proteases. Identical amino acids between Expro-I and others are asterisked. A common catalytic triad of the three amino acids, Asp, His, and Ser, is indicated in Bold. Hydrophilic amino acids such as Asp and Glu are indicated in an outline character. Abbreviations: BPN, subtilisin BPN' from *B. amyloliquefaciens* (Q44684); subtilisin E, subtilisin E from *B. subtilis* (P04189); Carlsberg, subtilisin Carlsberg from *B. licheniformis* (P00780); and DY, subtilisin DY from *B. subtilis* strain DY (P00781).

は、植物寄生性の線虫の表皮コラーゲンの分解に関与する金属プロテアーゼであると報告されている。これらの金属プロテアーゼの中で詳細な特性解析が報告されている *B. vietnamensis* 11-4 株由来の金属プロテアーゼ (BVMP) と比較すると、アミノ酸レベルでの類似性は 64% であり、温度や pH 安定性等も似通っていた (Table 4)。また、活性に及ぼす NaCl 濃度の影響試験結果を比較した¹⁵⁾。カゼインを基質とした際、NaCl 無添加の反応系に対して 15% NaCl を添加した反応系での相対活性は 18.6% であった。一方、FP-133 株由来 Expro-II においては、類似した反応の結果、NaCl 無添加の反応系に対して 15% NaCl を添加した反応系での相対活性は 22.1% であった。よって、FP-133 株由来 Expro-II と同様に 11-4 株由来金属プロテアーゼもまた耐塩性を示すプロテアーゼであるといえる。

つづいて、代表的な金属プロテアーゼである *Geobacillus stearothermophilus* CU21 由来 Thermolysin とともに CLUSTALW ver. 1.83 にて Expro-II を系統解析した (Fig. 4)。その結果、活性発現に関与するアミノ酸残基として Glu¹⁴³、Asp²²²、His²²⁷ について保存性が見られた。また、亜鉛結合モチーフ (HEXXH) にも保存性が見られた¹⁹⁾。 *Vibrio vulnificus* 由来金属プロテアーゼは、その活性発現に亜鉛イオンまたは二価鉄イオンを必要とし、亜鉛結合モチーフも保存されている^{20, 21)}。系統解析し、アミノ酸配列から Expro-II の耐塩性の推定を試みたが、Expro-I に

おける考察で述べたような明確な違いを既報の類縁酵素との比較で見出すことは出来なかった。

5. 今後の課題

Expro-I 遺伝子を解析した結果、Expro-I は *B. amyloliquefaciens* 由来 subtilisin BPN' や *B. licheniformis* 由来 subtilisin Carlsberg と同じ族に属するセリンプロテアーゼであった。一方、Expro-II 遺伝子を解析した結果、Expro-II は亜鉛含有の金属プロテアーゼとアミノ酸レベルでの類似性が高かった。しかし、Expro-I および Expro-II とともに植物寄生性の線虫の表皮コラーゲンの分解に関与するプロテアーゼと類縁性が高く、これら類縁酵素と市販のプロテアーゼを用いた Bioassay (線虫の致死率) は盛んに行なわれているが、酵素活性に与える塩類の影響および塩に対する安定性や食品加工への応用を目指した研究は筆者が検索した限りではなかった。よって、FP-133 株由来耐塩性プロテアーゼの大量発現系を構築することは、Expro-I および Expro-II の耐塩性機構の解明だけでなく、産業利用への利用につながると期待できる。申請研究期間内では大腸菌形質転換株による Expro-I 生産のみ報告できたが、今後は Expro-II 遺伝子の発現を含め、両酵素の大量生産を目指して宿主-ベクターの検討や形質転換株によるプロテアーゼの生産特性の検討なども行ないたい。

Table 4. Comparison of characteristics with metallo proteases

Strain	<i>B. subtilis</i> FP-133	<i>Bacillus</i> sp. strain RH219	<i>B. vietnamensis</i> 11-4
Enzyme name	Expro-II	Npr219	BVMP
Identity (%)	—	99%	54%
Molecular mass (SDS-PAGE)	34 kDa	41 kDa	—
Optimum pH	8.0	6.0	7.5
Effect of temperature	45°C	50°C	45°C
pH stability	5.5 - 9 (> 70%)	6	4 - 10
Thermostability	50°C	55°C	25 - 50°C
Effect of NaCl on protease activity (Casin)	70% (13% NaCl)	—	19% (15% NaCl)

```

Expro-II    ---AAATGTGTTLKGKTVSLN--ISSENGKYVMRDLKPTGTQIITYDLQNRQYNLPGTL
BVMP       ---AATTGSGYGLDDYKTLN-TYSSN-GTYLYDVTKPMNGVIETFTARNGSS-LPGYY
NprT      VAGASTVGVGRGVLGDQKYINTTYSSYYGYLQDNTRGSG--IFTYDGRNRV-LPGSL
           *::.* * : .. :* ** * * : * :: . * * : :* ***

Expro-II    VSSTTNQFTTSSQRAAVDAHYNLKGKVDYFYQTFKRNSYDNRGGKIVSSVHYGSRYNNA
BVMP       STDSNNSWTAYSQAADVDAHAYAGKVDYDYKNTNHRNSFDNNGATIRSTVHYGSYNNNAF
NprT      WTDGDNQFTASYDAAAVDAHYYAGVVDYDYKNVHGRLSYDGSNAAIRSTVHYGRGYNNAF
           :. *.:*: : * **** * ****: :.. * *: . . * *:**** ****

Expro-II    W-GDQMIYGDGDGSFFSPLSGSMDVTAHEMTHGSVTQETANLNYENQPGALNESFSDVFG-
BVMP       WNGSQMVYGDGDGSTFTSLSGALDVVAHELTHAVTERTAGLQYQYQSGALNESFSDVFG-
NprT      WNGSQMVYGDGDGQTFLPFSGGIDVVGHELTHAVTDYTAGLVYQNESGAINAMSDIFGT
           * * .***:***** . * .:***:***.***:***.***: * * * * : .***:***:***:***

Expro-II    ----YFTDTEWDIGEDIT--VSQPALRSLSNPTKYGQPDHYKNYQNLPNTDAGDYGGV
BVMP       ---YFLDPG-DYLMGEDVYTPGISGDALRSLSNPSKYGQPEHMNNYV----NTSSDNGGV
NprT      LVEFYANRNPDWEIGEDIYTPGVAGDALRSMSPAKYGDPDHYSKRY----TGTQDNGGV
           :      * :****: : : *****:***:***:***:*** . : . : * ***

Expro-II    HTNSGIPNKAAYN-----TITKIGVKKAEQIYYRALTVYLTPSSSFKDAKAALIQ
BVMP       HTNSGIPNKAAYN-----TISSIGKAKAEKIYYRALTVYLTPTSNFSYARAALLQ
NprT      HTNSGIINKAAYLLSQGGVHYGVSVNGIGRDKMGKIFYRALVYYLTPTSNFSQLRAACVQ
           ***** ***** :. . ** * :*:****. *****:*. . : * :*

Expro-II    SARDLYGS--QDAASVEAAWNAVGL-
BVMP       SAADLYGSGSSTYNSVKAAWDAVG VY
NprT      AAADLYGSTSQEVNSVKQAFNAVGVY
           :* ***** . ***:***:****:
    
```

Fig. 4. Comparison of the amino acid sequence of Expro-II with those of other metalloproteases. Identical amino acids between Expro-II and others are asterisked. A common catalytic triad of the three amino acids, Glu, Asp, and His, is indicated in Bold. The white box indicates Zinc-binding site. Abbreviations: Expro-II, metalloprotease from *B. subtilis* FP-133; BVMP, metalloprotease from *B. vietnamensis* (AB174895); and NprT, thermolysin from *G. stearothermophilus* CU21 (P06874).

文献等

1. Setyorini, E., Kim, Y.J., Takenaka, S., Murakami, S., and Aoki, K.: Purification and characterization of a halotolerant intracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Journal of Basic Microbiology*, 46, 294-304, 2006.
2. Setyorini, E., Takenaka, S., Murakami, S., and Aoki, K.: Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular proteases from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 433-440, 2006.
3. Setyorini, E., Kim, Y-J., Takenaka, S., Murakami, S., and Aoki, K.: Purification and characterization of a halotolerant intracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Journal Basic Microbiology*, 46, 294-304, 2006.
4. Kunitz, M.: Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *Journal General Physiology*, 30, 291-310, 1947.
5. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
6. Hanahan, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *Journal Molecular Biology*, 166,

- 557-590, 1983.
7. Werber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412, 1969.
 8. Choi, N-S., Chang, K-T., Maeng, P. J., and Kim, S-H.: Cloning expression, and fibrin (ogen)olytic properties of a subtilisin DJ-4 from *Bacillus* sp. DJ-4. *FEMS Microbiology Letters*, 236, 325-331, 2004.
 9. Qihong, N., Xiaowei, H., Baoyu, T., Jinkui, Y., Jiang, L., Lin, Z., and Keqin, Z.: *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 69, 722-730, 2006.
 10. Huang, X., Tian, B., Niu, Q., Yang, J., Zhang, L., and Zhang, K.: An extracellular protease from *Brevibacillus latrosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Research in Microbiology*, 156, 719-727, 2005.
 11. Peng, Y., Huang, Q., Zhang, R-H., and Zhang, Y-Z.: Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douche, a traditional Chinese soybean food. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 134, 45-52, 2003.
 12. Lian, L. H., Tian, B. Y., Xiong, R., Zhu, M. Z., Xu, J., and Zhang, K. Q.: Protease from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 262-269, 2007.
 13. Kim, M., Nishiyama, Y., Mura, K., Tokue, C., and Arai, S.: Gene cloning and characterization of a *Bacillus vietnamensis* metalloprotease. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68, 1533-1540, 2004.
 14. Niu, Q., Huang, X., Zhang, L., Li, Y., Li J., and Zhang K.: A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes. *Archives of Microbiology*, 185, 439-448, 2006.
 15. Tian, B., Yang, J., Lian, L., Wang, C., Li, N., and Zhang, K-Q.: Role of an extracellular neutral protease in infection against nematodes by *Brevibacillus latrosporus* strain G4. *Archives of Microbiology and Biotechnology*, 74, 372-380, 2007.
 16. Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T., and Ito, S.: Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103, 501-508, 2007.
 17. Inouye, K.: Mini review: Halophilic enzymes. *Seikagaku*, 66, 446-450, 1994.
 18. Takagi, M., Imanaka, T., and Aiba, S.: Nucleotide sequence promoter region for the neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 163, 824-831, 1985.
 19. Jongeneel C. V., Bouvier, J., and Bairoch, A.: A unique signature identifies a family of zinc-dependent metalloproteases. *FEBS Letters*. 242, 211-214, 1989.
 20. Miyoshi, N., Shimizu, C., Miyoshi, S., and Shinoda, S.: Purification and characterization of *Vibrio vulnificus* protease. *Microbiology and Immunology*, 31, 13-25, 1987.
 21. Chuang, Y. C., Chang, T. M., and Chang, M. C.: Cloning and characterization of the gene (*empV*) encoding extracellular metalloprotease from *Vibrio vulnificus*. *Gene*, 189, 163-168, 1997.

No. 0820

Cloning and Expression of Halotolerant Proteases from *Bacillus subtilis* Strain FP-133

Shinji Takenaka

Kobe University, Graduate School of Agriculture

Summary

Bacillus subtilis strain FP-133, isolated from a fermented fish paste, synthesizes two halotolerant extracellular proteases (Expro-I and Expro-II), showing protease activity and stability at concentrations of 0 - 20% (w/v) NaCl. In this study reported here, we cloned and analyzed the genes encoding Expro-I and Expro-II. We also examined the expression of protease gene in *Escherichia coli*.

The gene encoding Expro-I was cloned and sequenced. The amino acid sequence predicted from the open reading frame (1,149 base pairs) contained the NH₂-terminal amino acid sequence of purified Expro-I. The Expro-I amino acid sequence exhibited 98% identity to that of subtilisin like serine proteases from *Bacillus* spp. and *Brevibacillus latrosporus* G4. Most of previously reported proteases showed killing nematodes and the nematocidal activity and these proteases reported as a pathogenic factor. The deduced amino acid sequence of Expro-I contains all the characteristics conserved subtilisin functional motifs found in subtilisin like serine proteases characterized to date, including the conserved protease catalytic triad residues (Asp, His, Ser). Expro-I have a high hydrophilic amino acid, such as Asp and Glu, compared with a typical subtilisin, Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. These hydrophilic amino acids probably would contribute to NaCl resistance. The cloned Expro-I gene without signal peptide region was expressed in *Escherichia coli*.

The gene encoding Expro-II was cloned and sequenced. The amino acid sequence predicted from the open reading frame (1,566 base pairs) contained the NH₂-terminal amino acid sequence of purified Expro-II. The Expro-II amino acid sequence exhibited 98% identity to that of Zinc-metalloproteases from *Bacillus* spp. and *Brevibacillus latrosporus* G4. The deduced amino acid sequence of Expro-II contains all the characteristics conserved metalloprotease functional motifs found in Zinc metalloproteases characterized to date, including the conserved protease catalytic triad residues (Glu, Asp, His) and the Zinc-binding motif (HEXXH).