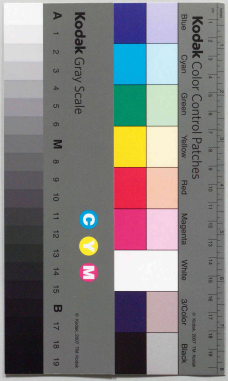

海棲発光細菌のプロテイナーゼ
に関する研究

深沢 茂樹

海棲発光細菌のプロテイナーゼに関する研究

深沢　茂樹

目　次

総論の部

緒論 1

1. 第 1 章　発光細菌 Vibrio splendidus FLE-2 の菌体外
プロテイナーゼについて 5

2. 第 2 章　発光細菌 Vibrio harveyi FLM-108 の菌体外
プロテイナーゼについて 24

3. 第 3 章　発光細菌 Vibrio logei CPM-D3 strain の菌体内
耐熱性プロテイナーゼについて 40

..... 56

4. 考察 72

5. 総括

6. 実験の部 78

謝辞 95

引用文献 96

緒論

近年、海洋資源が注目を集め始め、海洋開発への関心の高まりの中で海洋微生物に関する研究が進められている[1]。　海洋微生物の生理、生態の研究に伴って、これらの微生物が生産する酵素や生理活性物質についての研究も始められている。　海洋の生態系における微生物の役割は多様であり、有機物の生産、分解、食物連鎖と深く関わっている[1]。　海洋発光細菌は青緑色の光(490～500 nm)を放つという特徴を持つバクテリアで[2,3,4,5,6]、　主に　Photobacterium 属、Vibrio 属および Alteromonas 属に分類され[4,7,8,9,10]、その生態はイカや魚の体表もしくは有機腐敗物に付着する細菌、海水中に浮遊(海水 1 ml 当り数個～10 数個)する細菌、魚や海洋動物の腸内フローラ(腸管 1 cm 当り 10^3～10^4 個)として生息する細菌あるいはイカや魚の発光器官に共生(発光器官 1 ml 当り約 10^3 個)する細菌などが知られている。　このような生息分布と主な属種の関係を、私の研究と合わせてまとめると Table 1 のように示すことができる。　なお現在、P. phosphoreum、P. leignathi(Fukasawa G.[11,12])および J. Fischeri の共生発光細菌に関する報告はあるが[5,13,14,15]、これ以外の属種には見いだされていない。　広い海洋におけるこの多様な生息分布とその菌株数を考えると、発光細菌は海洋微生物[1]の主要な細菌群である Pseudomonas、Serratia、Beneckea などと共に海洋の生態系における微生物の果たす役割の一端を担うものであろうと考えられる。　しかし、発光細菌に関するこれまでの研究は Fig. 1. に示すごとく[6]、その発光系に関わる酵素 Luciferase とその反

必に関するものて、他には、細菌分解の１項目として菌体外酵素 amylase lipase、gelatinase、alginase および chitinase の５種についての産生能について定性的データが示されているにすぎない[4,5,7,18]。

これまで、一般的に酵素の供給源として陸産生物由来のものが中心で種々の研究に用いられ、海産生物からの酵素を対象とした報告はほとんど見られない。高塩濃度や高水圧下など特殊環境下で生育する海産生物では、陸産生物とは異なる性質を持つ酵素が存在することが考えられることから、私は海産発生物としての発光細菌の菌体外酵素に関する検索を行ってきた。その結果、深天分解酵素

Table 1. Habitats and Distribution of Marine Luminous Bacteria

Genera and Species	Free Living	Saprophytic Forms	Commensal Forms	Symbiotic Forms
Photobacterium				
phosphoreum	+	+	+	+
kaagnathi	+	+	+	+
Vibrio				
fischeri	+	+	+	+
logei	+	+	+	−
harveyi	+	+	+	−
splendidus biotype I	+	+	+	−
orientalis	+	+	+	−
Alteromonas				
hanedai	+	+	+	−

agarase 産生菌を見いだし、この菌体外酵素である agarase を精製してその性質を検討し(Fukasawa ら[16,17])、また、菌体外 acid phosphatase および alkaline phosphatase 産生菌(Fukasawa ら、unpublished data)のほか、さらに菌体外 chitinase 産生量の多い菌株を見いだし、この chitinase を精製してその性質を明かにした(Fukasawa ら、in preparation)。

さて、陸産生物のプロティナーゼに関する報告は多いが、海産生物のプロティナーゼに関する報告は非常に少なく[19]、しかも、発光細菌のプロティナーゼに関してはこれまてまったく報告がなされていない。 そこで、私は発光細菌の菌

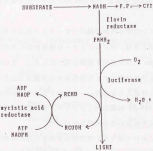

Fig. 1.
Scheme of Bacterial Bioluminescent System.

株数の多さから特異的なプロテイナーゼを見いだし得るのではないかと考え、カゼインを用いたいわゆる菌体外プロテイナーゼ検出寒天培地によるスクリーニングを行った。この結果、Vibrio splendidus と Vibrio harveyi ではほとんどすべての菌株に菌体外プロテイナーゼを検出したが、Vibrio logei、Vibrio fischeri および Photobacterium 属では検出されなかった。なお、Vibrio orientalis および Alteramonus 属の発光細菌は現在世界で約 10 株しか分離同定されておらず、入手が困難なことから今回の研究の対象とはしなかった。

V.splendidus では FLE-2 および ATCC 33125、V.harveyi では FLM-108 および FLA-11 に菌体外プロテイナーゼ産性能が高いことを見いだし、これらのプロテイナーゼを精製してその特徴、性質を検討したが、ここでは各属種中で最も高いプロテイナーゼ活性を示した FLE-2 および FLM-108 のプロテイナーゼを中心に述べる。

さらに、これまで分離されていなかった魚の腸内フローラより初めて発光細菌を分離したが、その中で、培養上清液にはプロテイナーゼ活性は認められず、遠心洗浄させ菌体の suspension に活性を示す菌株を見いだした。この菌体を表面活性剤で処理することによりプロテイナーゼは菌体から溶離することから、これを菌体内プロテイナーゼと呼ぶこととした。その中でもマダイの腸内フローラ由来の発光細菌 Y.logei GPM-33 の菌体内プロテイナーゼはこれまで報告されているプロテイナーゼには見られない高い耐熱性を示した。

以上述べたように、本研究においては今まで研究がなされていなかった発光細菌の菌体外プロテイナーゼおよび菌体内プロテイナーゼの特徴、性質について、すでに報告されている陸棲および海棲微生物のプロテイナーゼの性質とも合わせて比較研究を行い、以下の結果を得た。

1. 第 1 章　発光細菌 Vibrio splendidus FLE-2 の菌体外プロテイナーゼについて

1-1. プロテイナーゼの精製

浮遊性、付着性の Y.splendidus に属する約 300 株の発光細菌について、菌体外プロテイナーゼ検出寒天培地を用いてのプロテイナーゼ産生菌のスクリーニングと、人工海水組成の液体培地を用いて好気的に振とう培養した結果から、ほとんどすべての菌株の培養上清液中にカゼイン分解活性を検出し、その約 90 % は高い菌体外プロテイナーゼ産生能を示した。その中で特に他の菌株より 3 倍

Fig. 2.
Scheme of Purification of Proteinases from Marine Luminous Bacteria

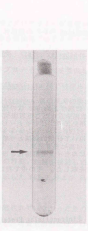

Fig. 3.
Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis of the Purified Proteinase from Vibrio splendidus FLE-2.

Electrophoresis was performed using 7.5 % gel. Protein was stained with Coomassie Brilliant blue R-250.

以上高い細体外プロテイナーゼ産生を示す FLE-2 株から、その酵素を Fig. 2. に示す方法で精製し、性質を検討した(Fukasawa 5[13])。その精製プロテイナーゼは電気泳動的に均一な酵素であることを確認した(Fig. 3.)。

Table 2. Summary of Purification of the Proteinase from Vibrio splendidus FLE-2

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (activity/mg)	Yield (%)
Culture supernatant	405	36,780	91	100
Ammonium sulfate fractionation	25.5	18,530	726	50
DEAE-Sephadex A-100	12.5	16,158	1,278	44
Sephadex G-100	5.7	10,760	1,888	29

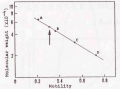

Fig. 4.
Estimation of the Molecular Weight of the Purified Proteinase from Vibrio splendidus FLE-2 by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

The standard proteins used and their molecular weights were: a, bovine serum albumin(67,000); b, ovalbumin(43,000); c, carbonic anhydrase(30,000); and d, soybean trypsin inhibitor (20,100).

F. splendidus FLE-2 の菌体外プロテイナーゼの精製の結果は Table 2 に示した。 FLE-2 プロテイナーゼは 600 ml の培養上清液から約 21 倍に精製し、29 % の回収率であった。 カゼインを基質とした比活性は 1800 units per mg of protein と高い値を示した。 なお各酵素との比較検討は考察で述べる。

1-2. 分子量の測定

FLE-2 プロテイナーゼの分子量は Fig. 4. に示したごとく、SDS-PAGE の結果から 50,000 と推定した。 また、Sephadex G-100 superfine gel filtration を行い、その分子量は同じく 50,000 と推定されたことから、FLE-2 プロテイナーゼは monomer であると考えられる。

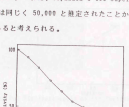

Fig. 5.
Effect of NaCl Concentration on the Activity of Proteinase from Vibrio splendidus FLE-2.

1-3. 酵素活性に対する NaCl 濃度の影響

海棲細菌もしくは好塩細菌の生産する酵素の活性は NaCl 濃度により影響を受けることが成本ら[18]により報告されていることから、 NaCl 濃度を段階的に変化させて本酵素の活性に与える影響について測定を行った。 その結果は Fig. 5. に示すように、FLE-2 プロテイナーゼは NaCl 濃度がゼロの時に最も高

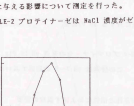

Fig. 6.
Effect of pH on the Activity of Proteinase from Vibrio splendidus FLE-2.

The buffer used were: 0.1 M Citrate-Na_2HPO_4(pH 3~6); 0.1 M NH_2PO_4-Na_2HPO_4(pH 6~8); 0.2 M Tris-HCl(pH 8~9); and 0.1 M Gly-NaOH(pH 9~12).

い活性を示し、NaCl 濃度の増加とともにその活性が阻害された。 NaCl 濃度がゼロの時の活性を 100 % とすると、 海水の食塩濃度である 3 % NaCl 濃度での活性は 75 % であり、さらに、高 NaCl 濃度 9 % でほその活性は 40 % に低下した。 NaCl 濃度と酵素活性に関しては考察にて比較検討する。

1-4. 酵素活性に対する pH の影響

精製した FLE-2 プロテイナーゼの至適 pH は Fig. 6. に示したように、pH 8.0 であった。 この酵素は pH 7~9 の範囲で高い活性を示した。

1-5. 酵素の安定性と活性におよぼす温度の影響

酵素の温度安定性に関する実験は、酵素溶液をそれぞれの温度で 30 分間インキュベートした後の残存活性を測定した(Fig. 7.)。 FLE-2 プロテイナーゼは 40 °C 以下では安定であるが、それ以上に温度が上昇すると急速に活性を失い 60 °C 以上ではほとんど失活した。 最適活性を示す温度は 55 °C であり、standard assay を行う温度 30 °C における活性の 1.8 倍の値を示した。

1-6. 酵素活性に対する阻害剤およびその他の化合物の影響

プロテイナーゼの活性に影響をおよぼすと考えられる活性阻害剤およびその他の化合物について実験を行った。 この実験においては、阻害剤およびその他の化合物は 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.8)に溶解し、酵素溶液と混合した後、

20 °C で 2 時間インキュベート後、基質であるカゼイン溶液を加え、30 °C、10 分間、酵素反応させてその活性を測定した。 阻害剤やその他の化合物を加えないものをコントロールとし、その値を 100 % とし、阻害剤などを添加したとき

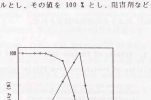

Fig. 7.
Effect of Temperature on the Stability and Activity of Proteinase from Vibrio splendidus FLE-2.

In the experiment on the effect of temperature on the stability (○—○), the enzyme solution was kept for 30 min at various temperatures and then the remaining activity was assayed. While, the enzyme reaction was carried out at various temperatures to determine the effect of temperature on the proteinase activity (●—●).

の残存活性をパーセントで示し、その影響を検討した。 Table 3 に示したように、FLE-2 プロテイナーゼは EDTA により強く阻害された。さらに、orthophenanthroline、phosphoramidon および金属イオン Cu^{2+}、Hg^{2+}、Ni^{2+}、Cd^{2+} あるいは Co^{2+} によりその活性が阻害された。

Table 3. Effects of Various Inhibitors and Chemicals on the Activity of Proteinase from Vibrio splendidus FLE-2

The enzyme was preincubated at 20°C for 2 hr with inhibitors and chemicals in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8), and then the remaining activity was assayed.

Inhibitors and chemicals	Concentration (mM)	Remaining activity (%)
Control	—	100.0
EDTA	1.0	24.0
	10.0	1.0
Orthophenanthrolin	0.1	27.0
	1.0	8.0
Phosphoramidon	0.1	8.4
Pepstatin A	0.1	107.0
Leupeptin	0.1	110.0
Antipain	0.1	109.0
Chymostatin	0.1	108.0
TLCK	1.0	95.0
PCMB	1.0	118.0
IAA	1.0	102.0
DTNB	1.0	88.0
TPCK	1.0	91.0
2-Mercaptoethanol	1.0	88.0
Thioglycol acid	1.0	12.0
Dithiothreitol	1.0	55.2
$CaCl_2$	1.0	3.0
$HgCl_2$	1.0	39.0
$CoCl_2$	1.0	3.0
$CdCl_2$	1.0	19.0
$NiCl_2$	1.0	57.0
$MgCl_2$	1.0	104.0
$CuCl_2$	1.0	101.6

* Preincubated and assayed in 100 mM HEPES buffer (pH 7.8).

一方、aspartic proteinase inhibitor である pepstatin A、serine proteinase inhibitor である leupeptin、antipain、chymostatin あるいは phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)、cysteine proteinase inhibitor である leupeptin、antipain、chymostatin、p-chloromercuribenzoic acid(PCMB)あるいは 2-mercaptoethanol 等はこの酵素の活性を阻害しなかった。

Microbial proteinase に関しては Morihara[20] が分類について報告しており、それによるとこの FLE-2 プロテイナーゼはその至適 pH がアルカリ側にあり、EDTA により その活性が阻害されることから metal-chelator-sensitive alkaline proteinase に分類されると考えられる。また、発光細菌 V. splendidus の Type strain である ATCC 33125 の固体外プロテイナーゼも精製し、その性質を検討した結果、同じく metal-chelator-sensitive alkaline proteinase であった(Fukasawa ら[21])。

1-7. 基質特異性に関する検討

両種微生物由来のプロテイナーゼについては基質特異性に関する報告がほとんど見られないことから、pNA(p-nitroanilide)合成基質、dipeptide および insulin chain B に対する基質特異性および加水分解活性に関する検討を行った(Fukasawa ら、in preparation)。

1-7-1. 合成基質 pNA 誘導体について

pNA 誘導体の合成基質 18 種を用いて基質特異性および加水分解活性に関する検討を行い、その結果を Table 4 に示した。

Table 4. Hydrolysis of p-Nitroanilide Substrates by the Proteinase from Vibrio splendidus FLE-2

	Units[a]	%
Leu-pNA	2.70	100
Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	1.55	41.8
Pyr-Phe-Leu-pNA	1.12	30.3
Z-Gly-Gly-Leu-pNA	0.22	5.9
Suc-Ala-pNA	ND[b]	—
Ala-pNA	ND	—
Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	ND	—
Suc-Ala-Pro-Ala-pNA	ND	—
Suc-Ala-Ala-pNA	ND	—
Glt-L-Phe-pNA	ND	—
Bz-DL-Arg-pNA	ND	—
Bz-L-Arg-pNA	ND	—
S-Benzyl-L-Cys-pNA	ND	—
N-α-Bz-DL-Lys-pNA	ND	—
Glu-pNA	ND	—
Z-Ala-Ala-Leu-pNA	ND	—
N-Acetyl-DL-Phe-pNA	ND	—
Bz-Tyr-pNA	ND	—

[a] μ moles of p-nitroaniline per min per mg of protein.
[b] Not detected.

FLE-2 プロテイナーゼはアミダーゼ活性を示し，特に Leu-pNA に対する加水分解活性が最も高く，ついで Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA，Pyr-Phe-Leu-pNA を加水分解した。いずれも Leu-pNA 同を加水分解したが，Leu-pNA 結合を持つ Z-Ala-Ala-Leu-pNA に作用しないことから，興味ある結果である。Leu-pNA は Leucine aminopeptidase の基質として用いられており，このプロテイナーゼは短いペプチドに対する加水分解活性も示すと考えられる。また，Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA は pancreatic elastase の基質として用いられており，この基質

に対しても加水分解活性を示したが，elastase の基質である Suc-Ala-Ala-Ala-pNA に対しては加水分解活性を示さなかった。

1-7-2. Dipeptide について

Table 20 に示したように dipeptide 7 種を用いて加水分解活性の検討を行った。FLE-2 プロテイナーゼは Leu-Gly と His-Leu を加水分解し，Gly-Leu，Gly-Phe，Gly-Gly，Gly-Pro および Glu-Glu は加水分解しなかった。Leu-Gly に対する加水分解活性を 100 % とすると，His-Leu に対しては 42 % の加水分解活性を示した。

1-7-3. Insulin chain B について

FLE-2 プロテイナーゼは insulin chain B の Ala-Leu(14-15 残基間，加水分解の相対比 1.00)，His-Leu(11-12 残基間，相対比 0.93)および Tyr-Leu(16-17 残基間，相対比 0.38)部位に対して高い加水分解活性を示し，ついで，His-Leu(5-6 残基間)，Cys-Gly(7-8 残基間)，Ser-His(9-10 残基間)，Gly-Glu(20-21 残基間)，Glu-Arg(21-22 残基間)および Gly-Phe(23-24 残基間)部位に対して加水分解活性を示した。さらに，濃度の高いこの酵素を用いた場合，insulin chain B は FLE-2 プロテイナーゼにより特々の部位で加水分解が進行することから広い基質特異性を示すプロテイナーゼであると考えられる。

Insulin chain B に対する発光細菌由来のプロテイナーゼの加水分解部位の検討の結果は，すでに報告されている陸棲動生物由来のプロテイナーゼによる結果とあわせて，Fig. 23. にまとめて示した。加水分解されやすい部位から順に ◎、○、・、印で示した。

なお、pNA、dipeptide および insulin chain B に対する基質特異性並びに加水分解活性については当寮の部で絵語する。

1-8. アミノ酸組成の分析および部分的アミノ酸配列の検討

精製した FLE-2 プロテイナーゼのアミノ酸組成の分析結果は Table 5 に示した(Fukasawa ら、in preparation)。 この結果は Gly と Ala の含有率が高く Met、 Ile、 His および Arg の含有率は低い結果を示し、Cys は検出されず特徴的な結果ではなかった。 同じく Y. splendidus の菌体外プロテイナーゼである ATCC 33125 プロテイナーゼを精製し[22]、アミノ酸組成の分析を行い Table 5 にその結果を示したが、 Gly と Ala の含有率はやや高いが各アミノ酸の含有率は FLE-2 プロテイナーゼの含有率と類似している結果を得た。 そこで、これら両酵素のアミノ酸配列について、Edman 法[23]により分析した。

N 末端から 29 残基目までの配列について、FLE-2 プロテイナーゼおよび ATCC 33125 プロテイナーゼの結果を以下に示す。

FLE-2 : I-Lys- Pro -Leu-(Phe)^{5}-Thr- Gly -Pro-Gly-

ATCC 33125; X-Lys-(Pro, Glu or Gln)-Leu- Phe^{5} -Thr-(Gly or Ser)-Pro-Gly-

Gly^{10} -Asn-Leu-Lys-Thr-Thr^{15}-Arg-Tyr-Glu-Tyr-Gly^{20}-Ser-Asp-Phe-

(Gly or Ile)^{10}-Asn-Ile-Lys-Thr-Thr^{15}-Arg-Tyr-Glu-Tyr-Gly^{20}-Ser-Asp-Phe-

(Asp or Pro)-(Ser)^{25}-Phe-Pro-Ile-Asp

Pro - Ser^{25} -Phe-Pro-Ile-Asp

これら両酵素の N 末端のアミノ酸残基はバックグラウンドが高く特定できなかったので X で示した。 また、( )で示したアミノ酸残基に関してはそれぞれに示されたアミノ酸である可能性が高いものの、同定にはなおすさらに検討が必要であると考える。 これら両酵素のアミノ酸配列においては、12 残基目の

Table 5. The Amino Acid Composition of the Proteinases from Vibrio splendidus. FLE-2 and ATCC 33125 (mol %)

	FLE-2	ATCC 33125
Asp	7.4	7.1
Thr	7.4	8.2
Ser	6.7	7.5
Glu	7.5	7.6
Pro	4.7	4.0
Gly	9.1	10.9
Ala	9.2	9.4
Cys	ND[a]	ND
Val	8.7	7.7
Met	3.6	3.4
Ile	3.3	3.3
Leu	6.0	6.2
Tyr	7.4	7.4
Phe	7.1	7.0
Lys	5.0	4.5
His	3.7	2.8
Arg	3.2	2.9

[a] Not detected.

アミノ酸が FLE-2 プロテイナーゼでは Leu であり、ATCC 33125 プロテイナーゼでは Ile、と違いがあるものその配列が非常に類似している結果を示した。

1-9. 発光細菌由来のプロテイナーゼの免疫学的検討

Y. splendidus 由来の FLE-2 プロテイナーゼおよび ATCC 33125 プロテイナーゼについてこれら両酵素のアミノ酸組成および部分的アミノ酸配列に類似性が認められたことから、Ouchterlony[23] の方法に従って免疫学的交叉反応性の検討を行い、この結果を Fig. 8. に示した(Fukasawa ら、in preparation)。 発光細菌 Y. harveyi FLM-108 の菌体外プロテイナーゼ I および II[24]、Y. harveyi FLA-11 の菌体外プロテイナーゼ[25]も精製し、この実験に用いた。 なお、これら Y. harveyi 由来のプロテイナーゼに関しては第 2 章に記した。

抗 FLE-2 プロテイナーゼ抗体(a)および抗 ATCC 33125 プロテイナーゼ抗体(b)はそれぞれに対応する抗原のプロテイナーゼとの間に、例えば前者では a と抗原 I (FLE-2 プロテイナーゼ)の間に明瞭な沈降線とかすかな沈降線を、また後者 b と 抗原 2 (ATCC 33125 プロテイナーゼ)の間に 2 本の明瞭な沈降線を形成した。 さらにこの相互のプロテイナーゼ間にも沈降線が観察(a と 2、b と 1)され、しかも両者の主要な沈降線は完全に融合した。 一方、これらの抗プロテイナーゼ抗体と、Y. harveyi 由来の FLA-11 プロテイナーゼ(3) および FLM-108 プロテイナーゼ II(4) との間には沈降線の形成は観察されなかった。

さらに、FLE-2 および ATCC 33125 プロテイナーゼの免疫電気泳動を行い免疫学的交叉反応性について確認を行った。 Fig. 9. にその結果を示した。

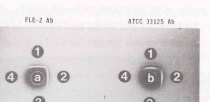

Fig. 8.
Double Immunodiffusion Tests among the Proteinases from Various Luminous Bacteria.

All proteinases were dissolved with physiological saline at 1 mg/ml. Central wells a and b were filled with anti-FLE-2 proteinase serum and anti- ATCC 33125 proteinase serum, respectively. Peripheral wells 1, 2, 3 and 4 were filled with FLE-2 proteinase, ATCC 33125 proteinase, FLA-11 proteinase and FLM-108 proteinase II, respectively. The gel plate was kept in a humid chamber at room temperature. The results 9 hr later are shown.

Fig. 8. の結果と同様に、FLE-2 および ATCC 33125 プロテイナーゼはそれぞれに対する抗体に、明瞭な沈降線を形成したが、この沈降線の移動度に僅かな差が観察された。 また、ATCC 33125 プロテイナーゼに関してはさらに複数個に移動度の大きなやや不鮮明な沈降線が観察された(b と 2)。 これらのプロテイナーゼは精製した際の PAGE の結果では均一であることが確認されている。

しかし、分子量は 50,000 および60,000 と異なった値を示した。 これらのプロテイナーゼはタンパク質分解酵素の特徴である自己消化という性質をもつこと

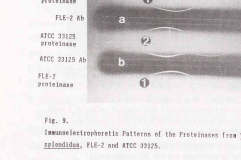

Fig. 9.
Immunoelectrophoretic Patterns of the Proteinases from Vibrio splendidus, FLE-2 and ATCC 33125.

Each proteinase solution (1 mg/ml in saline) poured into the appointed well in the gel plate, and the plate was run at 2 mA per cm of gel width. After run, each trench in the gel plate was filled with the corresponding anti-proteinase serum. The gel plate was kept in a humid chamber at room temperature. The results 9 hr later are shown. Wells 1 and 2 were original points of FLE-2 proteinase and ATCC 33125 proteinase, respectively. Trenchs a and b were filled with anti-FLE-2 proteinase serum and anti-ATCC 33125 proteinase serum, respectively.

から、これらの酵素を保有している間の自己消化を考えねばならない。 この 2 種の精製プロテイナーゼの PAGE の結果は single band であるが、この酵素溶液を 20 °C でインキュベートした後に再び PAGE にかけると、 インキュベート時間の経過に伴って、main band が減少し、初めは認められなかった protein band が 2 本、3 本と増加が認められた。 しかし、これらの protein band は活性染色[21]でも陽性であることから、 自己消化した酵素もまた活性を示していると言える。

以上の結果、V. splendidus 由来の 2 種のプロテイナーゼは同一の抗原決定基を持っているが、同属異種(V. harveyi)由来のプロテイナーゼとは共通の抗原性は認められなかった。 属種を同じくする菌により生産される FLE-2 および ATCC 33125 プロテイナーゼの間には分子量の違いがあるものの、 この両者が共通の抗原性を有することは、これらの細菌の同属性が起源を同じにするのではないかという指摘を示す興味ある結果を得た。

1-10. まとめ

V. splendidus FLE-2 菌体外プロテイナーゼの性質をまとめて Table 6 に示した。 この酵素の分子量は 50,000 と推定され、monomer であると考えられる。 カゼインを基質とした比活性は 1888 と高く、タンパク分解活性の高いプロテイナーゼであると考えられる。 この酵素の活性は NaCl 濃度により影響を受け、NaCl 濃度がゼロの時に最も高い活性を示し、 この時の値を 100 % とすると、3 % NaCl 濃度では 75 % となり、NaCl 濃度の増加とともに活性が阻害された。 至適 pH は 8.0 とアルカリ側にあり、最適活性を示す温度は 55 °C で、40 °C

以下で酵素は安定であるが，60 °C では失活した。 FLE-2 プロテイナーゼは EDTA により阻害され，orthophenanthroline，phosphoramidon および金属イオン Co^{2+}，Hg^{2+}，Ni^{2+}，Cd^{2+} あるいは Co^{2+} によっても阻害された。 これらの結果から，FLE-2 プロテイナーゼは metal-chelator-sensitive alkaline proteinase に分類されると考えられる。 また，同じく V. splendidus ATCC 33125 プロテイナーゼも metal-chelator-sensitive alkaline proteinase であることを示す結果を得た。 FLE-2 プロテイナーゼは合成基質 Leu-pNA を加水分解し，アミダーゼ活性を示すものと考えられる。 また，Leu-Gly および His-Leu を加水分解することから，dipeptidase 活性を示した。 Insulin chain B に対しては加水分解部位が多く，広い基質特異性を示した。 FLE-2 および ATCC 33125 プロテイナーゼのアミノ酸組成を分析した結果，両酵素のアミノ酸

Table 6. Properties of the Proteinase from Vibrio splendidus FLE-2

Molecular weight;	50,000, monomer
Specific activity; (units/mg of protein)	1,088
Relative activity; (at 3 % NaCl/at 0 % NaCl)	75 %
Optimum pH;	8.0
Optimum temperature;	55 °C
Thermal stability; (remaining activity)	< 40 °C

組成に類似性が認められ，諸性質についても類似性が認められることから免疫学的交叉反応性に関する検討を行った。 この結果，これら両酵素は共通の抗原性を有しており，これらの細菌の両種菌が起源を同じにするのではないかという興味ある示唆を得た。

第 2 章　発光細菌 Vibrio harveyi FLM-108 の菌体外プロテイナーゼについて

2-1. プロテイナーゼの精製

沖縄沿岸の海水(25～30 °C)から発光細菌約 300 株を分離し同定した。その結果、分離した発光細菌の約 95 % が V. harveyi であった。これらすべての菌株から菌体外プロテイナーゼが検出され、その中で最も高いプロテイナーゼ産生能を示した菌株 FLM-108 を選び、この菌体外プロテイナーゼを Fig. 2. に示す方法により精製した(Fukasawa ら[24])。未精製は精製過程の DEAE-Sephacel column chromatography において 2 つのピークが得られたので、それぞれプロテイナーゼ I および II と名ずけた(Fig. 10.)。

V. harveyi FLM-108 の菌体外プロテイナーゼの精製の結果は Table 7 に示した。これらのプロテイナーゼはカゼインを基質とするよりもヘモグロビンを用いた方が約 3 倍高い加水分解活性を示すことから、精製および諸性質に関する実験にはヘモグロビンを基質として用いた。FLM-108 プロテイナーゼは 900 ml の培養上清液から精製し、プロテイナーゼ I および II をそれぞれ 5.3 および 12.2 倍に精製し、その回収率は 2.6 および 5.7 % であった。精製プ

Table 7. Summary of Purification of the Proteinases from Vibrio harveyi FLM-108

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Recovery
Culture supernatant	429	102,240	238	100
Ammonium sulfate precipitation	87	89,238	991	84
DEAE-Sephacel				
Proteinase I	19.3	3,197	727	3.1
Proteinase II	3.9	4,091	2,170	6.3
Sephadex G-75				
Proteinase I	2.1	2,612	1,253	2.6
Proteinase II	2.0	5,810	2,915	5.7

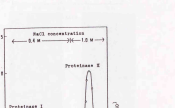

Fig. 10.
Elution Profile of the Proteinases from Vibrio harveyi FLM-108 on a DEAE-Sephacel Column.

The proteinases were eluted with 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.8) containing stepwise NaCl concentration. ——, proteinase activity; ----, protein(A_{280nm}); column size, 4 x 15 cm; flow rate 10 ml/h.

ロテイナーゼの比活性はヘモグロビンを基質として、プロテイナーゼ I および II は 1253 および 2915 units per mg of protein であり、カゼインを基質とした場合ではそれぞれ 418 および 972 units per mg of protein であった。これら精製したプロテイナーゼは Fig. 11. に示したように PAGE においてその移動に違いが認められたが、いずれも single band であり均一であった。

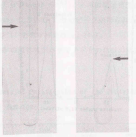

Fig. 11.
Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis of the Purified Proteinases from Vibrio harveyi FLN-108.

Electrophoresis was performed using 15 % gel. Protein was stained with Coomassie Brilliant blue R-250.

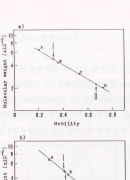

Fig. 12.
Estimation of the Molecular Weights of the Purified Proteinases from Vibrio harveyi FLN-108.

a): SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.
The standard proteins used and their molecular weights were;
A, bovine serum albumin (67,000); B, ovalbumin (43,000);
C, carbonic anhydrase (30,000) and D, soybean trypsin inhibitor (20,100).
b): Sephadex G-100 superfine gel filtration.
The standard proteins used and their molecular weights were;
A, bovine serum albumin (67,000); B, ovalbumin (43,000);
and C, chymotrypsinogen A (25,000).
Proteinase I, ○ ; proteinase II, △ .

2-2. 分子量の測定

FLM-108 プロテイナーゼ I および II の分子量は、SDS-PAGE で 49,000 および 23,000、Sephadex G-100 superfine gel filtration 法により 49,000 および 46,000 と推定した(Fig. 12.)。この結果は、プロテイナーゼ I は分子量 49,000 の monomer であり、プロテイナーゼ II は分子量 23,000 の subunit からなる dimer で分子量 46,000 であることを示している。

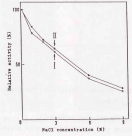

Fig. 13.
Effect of NaCl Concentration on the Activity of Proteinases from Vibrio harveyi FLM-108.

2-3. 酵素活性に対する NaCl 濃度の影響

FLM-108 プロテイナーゼ I および II は、ともにその活性が NaCl 濃度によって影響を受けた(Fig. 13.)。これらの酵素の活性は NaCl 濃度がゼロの時に最も高く、この時の値を 100 % とすると、3 % NaCl 濃度ではプロテイナーゼ I および II の活性はそれぞれ 60 および 65 % であり、NaCl 濃度の増加とともに

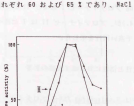

Fig. 14.
Effect of pH on the Activity of Proteinases from Vibrio harveyi FLM-108.

The buffer used were: 0.1 M Citrate-Na_2HPO_4(pH 3~6); 0.1 M KH_2PO_4-Na_2HPO_4(pH 6~8); 0.2 M Tris-HCl(pH 8~9); and 0.1 M Gly-NaOH(pH 9~12).

に活性は阻害された。 これらの結果は V. splendidus の FLE-2 および ATCC 33125 プロテイナーゼと同様の傾向である。

2-4. 酵素活性に対する pH の影響

精製した FLM-10B プロテイナーゼ I および II はともに至適 pH 8.0～9.0 を示した(Fig. 14.)が、プロテイナーゼ II は I に比べて、pH 11～12 のアルカリ側において若干高い活性を示した。

2-5. 酵素の安定性と活性におよぼす温度の影響

この実験の条件は V. splendidus FLE-2 プロテイナーゼにおける方法と同様に行い、その結果は Fig. 15. に示した。 FLM-10B プロテイナーゼ I および II はともに 45 °C 以下で安定であった。 なお、最適活性を示す温度は 50 °C でこの時の値は 30 °C における活性の約 2.5 倍であった。

先の免疫学的交叉反応性の検討の項で述べたように、V. splendidus のプロテイナーゼは自己消化作用が強く、これらの酵素溶液は 4 °C に 1 週間あるいは 30 °C にて 2 時間のインキュベートをした時の自己消化は 50 % 以上となり、酵素活性は低下する。 しかし、FLM-10B プロテイナーゼ II は同じ条件では自己消化は認められず、15 °C にて 2 週間放置してもなお 95 % の活性が残存していた。 一方、プロテイナーゼ I はこの条件で残存活性は 7 % となり、この性質の違いは興味深い。

Fig. 15.
Effect of Temperature on the Stability of Proteinases from Vibrio harveyi FLM-10B.

2-6. 酵素活性に対する阻害剤およびその他の化合物の影響

この実験条件と結果の表示は V. splendidus FLE-2 プロテイナーゼと同じで、その結果は Table 6 に示した。

FLM-10B プロテイナーゼ I および II の活性はともに EDTA により強く阻害された。 Orthophenanthroline および金属イオン Cu^{2+}, Hg^{2+} あるいは Ni^{2+} はこれら両酵素の活性を阻害した。 Phosphoramidon はプロテイナーゼ II を阻害したが、プロテイナーゼ I は阻害せず、性質に違いがみられた。

Pepstatin A, antipain, phenylmethylsulfonyl fluoride および 2-mercap-

teathanol はこれら四酵素を阻害しなかった。 p-Chloromercuribenzoic acid の添加によりプロテイナーゼ I の活性は 2.5 倍と高い結果を示したが、このことは酵素の分子の構造変化が原因と考えられ、アロステリック酵素類に多く観察されており同様の現象について、adenosine triphosphatase[26] や tetrahydrofolate dehydrogenase[27] に報告がある。

以上の結果から、FLM-10B プロテイナーゼ I および II はその性質に多少の相

Table 8. Effects of Various Inhibitors and Chemicals on the Activity of Proteinases from Vibrio harveyi FLM-10B

The reaction mixture without hemoglobin as substrate was preincubated with individual effectors in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) for 2 hours at 25 C and the reaction was started by adding the hemoglobin solution to the assay mixture. And then the remaining activities were assayed and expressed as percentages of the control activity determined without an effector.

Inhibitors and chemicals	Concentration (mM)	Remaining activity (%)	
		Proteinase I	Proteinase II
Control	—	100	100
EDTA	1.0	0.0	4.0
	10.0	0.0	0.0
Orthophenanthrolin	0.1	0.0	58.8
	1.0	0.0	0.0
Phosphoramidon	0.1	108.0	11.0
Pepstatin A	0.1	104.0	101.0
Acetyl-N-Tosylthiol-Ester Phenylalanine	0.1	107.0	99.0
	1.0	105.0	103.0
p-Chloromercuribenzoic acid	1.0	251.0	136.0
2-Mercaptoethanol	1.0	88.0	92.0
$CuCl_2$	1.0	0.0	0.0
$HgCl_2$	1.0	0.0	11.0
$NiCl_2$	1.0	0.0	5.0
$MgCl_2$	1.0	102.0	100.0
$CaCl_2$	1.0	107.0	102.0

違がみられるものの、ともに metal-chelator-sensitive alkaline proteinase であると考えられる。 同じく V. harveyi 由来の菌体外酵素である FLA-11 プロテイナーゼを精製し、その性質を検討した結果、metal-chelator-sensitive alkaline proteinase であることを示す結果を得た (Fukasawa ら[28])。

2-7. 酵素の基質特異性とその加水分解活性に関する検討

2-7-1. 合成基質 pNA 誘導体について

Table 9 に示したように (Fukasawa ら in preparation)、FLM-10B プロテイナーゼ I は pancreatic elastase の基質である Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA に対する加水分解活性が特異的に高く、プロテイナーゼ II と比べて約 120 倍高かった。 また、一般的な elastase の基質である Suc-Ala-Ala-Ala-pNA に対してもプロテイナーゼ I は活性を示し、一方、プロテイナーゼ II はほとんど活性を示さなかった。 プロテイナーゼ II は Leu-pNA に対する加水分解活性が最も高い結果を示し、これら両酵素の pNA 合成基質に対する加水分解活性に違いがみられた。 この他、プロテイナーゼ I は種々の pNA 誘導体基質に対しても広く加水分解活性を示し、プロテイナーゼ II に比べてその加水分解活性が高く、明かな違いがみられた。 プロテイナーゼ I および II は Leu-pNA を加水分解することからともにアミラーゼ活性を示すと考えられる。

2-7-2. Dipeptide について

Dipeptide 7 種に対する加水分解の結果を Table 20 に示した (Fukasawa ら、in preparation)。 FLM-10B プロテイナーゼ I は His-Leu に対して加水分解

Table 9. Hydrolysis of p-Nitroanilide Substrates by the Proteinases from Vibrio harveyi FLN-108

	Proteinase I		Proteinase II	
	Units[a]	%	Units	%
Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	6.26	100	4.35	87.5
Leu-pNA	12.2	1.92	5.66	100
Suc-Ala-Pro-Ala-pNA	3.90	0.628	T[b]	—
Pyr-Phe-Leu-pNA	2.22	0.581	1.27	22.4
Suc-Ala-Ala-pNA	3.09	0.485	T	—
Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	1.77	0.279	ND[c]	—
Bz-L-Arg-pNA	1.07	0.169	T	—
Bz-Tyr-pNA	0.458	0.072	ND	—
Z-Gly-Gly-Leu-pNA	0.458	0.072	T	—
Z-Ala-Ala-Leu-pNA	0.424	0.067	ND	—
Nα-Bz-DL-Lys-pNA	0.394	0.062	ND	—
Suc-Ala-pNA	0.394	0.062	0.224	3.95
Bz-DL-Arg-pNA	0.283	0.044	ND	—
Ala-pNA	T	—	ND	—
S-Benzyl-L-Cys-pNA	ND	—	ND	—
Gly-pNA	ND	—	ND	—
N-Acetyl-DL-Phe-pNA	ND	—	ND	—
Glt-L-Phe-pNA	ND	—	ND	—

[a] μ moles of p-nitroaniline per min per mg of protein.
[b] Trace.
[c] Not detected.

活性を示し、この活性を 100 % とすると、Leu-Gly に対しては 10 % と僅かな活性を示した。 一方、プロテイナーゼ II は Leu-Gly に対して加水分解活性を示し、この値を 100 % とすると、His-Leu に対しては 63 % の活性を示した。

2-7-3. Insulin chain B について

Insulin chain B の加水分解部位に関する実験結果では Fig. 23. に示したように(Fukasawa ら、in preparation)、FLN-108 プロテイナーゼ I は insulin chain B の Leu-Tyr(15-16 残基間、加水分解の相対比 1.00) および Glu-His (4-5 残基間、 相対比 0.30)部位は加水分解し易く、ついで、Leu-Val(17-18 残基間)、Glu-Arg(21-22 残基間)および Phe-Tyr(25-26 残基間)部位を加水分解した。 一方、プロテイナーゼ II は insulin chain B の Phe-Phe(24-25 残基間、相対比 1.00)、Gly-Phe(23-24 残基間、相対比 0.87)および Phe-Tyr(25-26 残基間、 相対比 0.55)部位を加水分解し易く、ついで、Phe-Val(1-2 残基間)、His-Leu(5-6 残基間)、 Ser-His(9-10 残基間)、Glu-Ala(13-14 残基間)および Ala-Leu(14-15 残基間)部位を加水分解した。

これらの結果から、FLN-108 プロテイナーゼ I と II は基質 insulin chain B に対してその加水分解部位に明らか違いがみられた。 また、T. splendidus FLE-2 プロテイナーゼが示した加水分解部位と比べても、加水分解活性がより高い部位に関してはそれぞれのプロテイナーゼに相違がみられた が、いずれのプロテイナーゼも加水分解の作用部位が多く、insulin chain B に対する基質特異性は広いと考えられる。 なお、pNA、dipeptide および insulin chain B に対する実験結果は考察の部で比較検討する。

2-8. アミノ酸組成の分析結果の検討

精製した FLN-108 プロテイナーゼのアミノ酸組成の分析結果(Fukasawa ら、in preparation)は Table 10 に示した。 同じく、T. harveyi 由来の精製した

FLA-11 プロティナーゼ[25]) のアミノ酸組成の分析結果も参考のため示した。

FLA-108 プロティナーゼ I はグルコサミンとガラクトサミンを含有しており、しかもこれらの含有率は 29.7 % および 35.2 % と高く、一方、プロティナーゼ II からはアミノ糖が検出されず、明かな違いがみられた。プロテイナーゼ II では Asp, Glu および Gly の含有率が 10 mol % をこえて多く検出され、FLA-11 プロティナーゼでも同じ結果を示し、この他のアミノ酸の含有率においてもこれら両酵素に明かな類似性がみられた。プロティナーゼ I の構成アミノ酸の組成はこれらのプロティナーゼと明かに異なっていた。

Table 10. The Amino Acid Composition of the Proteinases from Vibrio harveyi FLN-108 and FLA-11 (mol %)

	FLN-108		FLA-11
	Proteinase I	Proteinase II	Proteinase
Asp	3.3	10.8	10.6
Thr	2.7	4.7	5.2
Ser	2.4	5.9	5.9
Glu	3.5	10.7	10.6
Pro	3.2	4.9	4.1
Gly	4.2	10.7	10.9
Ala	3.0	9.2	8.6
Cys	0.4	2.4	2.8
Val	3.3	7.2	7.2
Met	0.7	5.0	4.7
Ile	1.1	2.6	2.7
Leu	2.2	5.1	5.3
Tyr	1.0	6.5	6.2
Phe	1.3	5.3	5.9
Lys	1.4	3.9	3.5
His	0.5	4.4	4.2
Arg	0.9	1.4	1.6
Gluconamine	29.7	ND[a]	ND
Galactosamine	35.2	ND	ND

[a] Not detected.

2-9. まとめ

V. harveyi FLN-108 菌体外プロテイナーゼ I および II の性質をまとめて Table 11 に示した。プロテイナーゼ I は分子量 49,000, monomer であり、一方、プロテイナーゼ II は分子量 23,000 の subunit からなる dimer で分子量は 46,000 と推定された。これら両酵素はともにカゼインよりもヘモグロビンに対して 3 倍高い加水分解活性を示した。プロテイナーゼ I および II はともに NaCl 濃度によりその活性が影響を受け、NaCl 濃度が0モルの時に最も高い活性を示し、この時の値を 100 % とすると、3 M NaCl 濃度ではそれぞれ 60 および 65 % の活性となり、NaCl 濃度の増加とともに活性が阻害された。これら両酵素の至適 pH は 8.0~9.0 とアルカリ側にあり、最適活性を示す温度は 50 °C であり、いずれも 65 °C 以下で安定な酵素であった。また両酵素ともに EDTA により阻害され、orthophenanthroline および金属イオン Cu^{2+}, Hg^{2+} あるいは Ni^{2+} によっても阻害された。プロテイナーゼ II は phosphoramidon により阻害されたが、プロテイナーゼ I は阻害されず、違いが認められた。以上の結果から、両酵素にはその性質に違いが認められるものの、ともに metal-chelator-sensitive alkaline proteinase に分類されると考えられる。同じく V. harveyi FLA-11 の菌体外プロテイナーゼを精製し、その性質を検討したが metal-chelator-sensitive alkaline proteinase に分類されると考えられる(Fukuzawa ら[25])。

Table 11. Properties of the Proteinases from Vibrio harveyi FLH-108

Molecular weight;	I 49,000, monomer II 46,000, dimer of 23,000	
Specific activity; (units/mg of protein)	Hemoglobin I 1,253 II 2,915	Casein I 418 II 372
Relative activity; (at 3 % NaCl/at 0 % NaCl)	I 60 % II 65 %	
Optimum pH;	8.0~9.0	
Optimum temperature;	50 °C	
Thermal stability; (remaining activity)	< 45 °C	

プロテイナーゼ I は合成基質 Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA に対して特異的に高い加水分解活性を示した。 プロテイナーゼ I および II はともに Leu-pNA を加水分解することから、アミダーゼ活性も示した。 Dipeptide に対する加水分解においては、プロテイナーゼ I は His-Leu、プロテイナーゼ II は Leu-Glt をそれぞれ加水分解活性が高く相違がみられた。 Insulin chain B に対しては これら両酵素が加水分解する部位に違いが見られ、ともに加水分解部位が多く広い基質特異性を示した。

アミノ酸組成の分析の結果、プロテイナーゼ I はアミノ糖(グルコサミンとガラクトサミン)を含有しており、一方、プロテイナーゼ II はアミノ糖を含有しておらず明かな違いが認められた。 プロテイナーゼ II のアミノ酸組成と

V. harveyi FLH-11 プロテイナーゼのアミノ酸組成には類似が認められたが、プロテイナーゼ I のアミノ酸組成とは大きく異なる結果であった。

第 3 章　発光細菌 Vibrio logei CPM-03 の菌体内相外性プロテイナーゼについて

3-1. プロテイナーゼの精製

魚の腸内フローラにおける発光細菌に関する報告は見あたらないので、これについても前述の発光細菌と同じように分離培養してそのプロテイナーゼの検索を行った。その結果マダイの腸内フローラより分離した月利共生発光細菌 Vibrio logei CPM-03 はプロテイナーゼを菌体外へは分泌せず、表面活性剤により菌体から溶離される菌体内プロテイナーゼを生産していることを見いだし、このプロテイナーゼを精製して性質を検討した (Fukasawa ら[20])。Fig. 2. に示したように、この菌を培養後集菌し、この菌体からデオキシコール酸ナトリウム溶液を用いてプロテイナーゼを溶離し、その粗酵素沈澱から精製した。 FUK-

Table 12. Summary of Purification of the Proteinases from Vibrio logei CPM-03

Procedures	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude supernatant	2900	3760	1.3	100
Ammonium sulfate precipitation	2500	9024	3.6	240
DEAE-Sephacel				
Proteinase I	250	602	2.4	16
Proteinase II	240	902	3.8	24
Sephadex G-100				
Proteinase I	100	361	3.6	10
Proteinase II	110	496	4.5	13

Fig. 16.
Elution Profile of the Proteinases from Vibrio logei CPM-03 on a DEAE-Sephacel Column.

The proteinases were eluted with 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.8) containing stepwise NaCl concentration. ———, proteinase activity; ———, protein(A_{280nm}); column size, 4 x 15 cm; flow rate 10 ml/h.

100 と同じように DEAE-Sephacel column chromatography により 2 種のプロテイナーゼを得、それぞれプロテイナーゼ I および II と名ずけた(Fig. 16.)。

V. logei CFM-D3 の菌体内プロテイナーゼの精製の結果は Table 12 に示した。 13.5 liter の培養液から集菌し、wet weight 120 g の菌体を得、これに

Proteinase I　　Proteinase II

Fig. 17.
Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis of the Purified Proteinases from Vibrio logei CFM-D3.

Electrophoresis was performed using 10 % gel. Protein was stained with Coomassie Brilliant blue R-250.

120 ml の sodium deoxycholate 溶液(5 % sodium deoxycholate and 3 % NaCl in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.8)を加えて菌体からプロテイナーゼを溶離しこれを crude supernatant として精製を行った。 CFM-D3 プロテイナーゼ I および II はそれぞれ 2.7 および 3.4 倍に精製され、その回収率は 10 および 13 % であった。 その比活性は 3.8 および 4.5 units per mg of protein であった。 なお、この精製において、crude supernatant に比べて ammonium sulfate precipitation における total activity と yield の値が逆に高くな

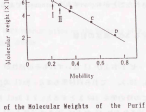

Fig. 18.
Estimation of the Molecular Weights of the Purified Proteinases from Vibrio logei CFM-D3 by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

The standard proteins used and their molecular weights were: A, bovine serum albumin (67,000); B, ovalbumin (43,000); C, carbonic anhydrase (30,000); and D, soybean trypsin inhibitor (20,100).

っているが，この crude supernatant には sodium deoxycholate が含まれており，プロテイナーゼ活性は sodium deoxycholate により阻害されることが原因である。　これら両酵素の PAGE における移動に違いがみられたが，いずれも single band であり均一であると考えられる(Fig. 17.)。

3-2. 分子量の測定

CPM-D3 プロテイナーゼ I および II の分子量は，SDS-PAGE の結果ではそれぞれ 62,000 および 54,000 であると推定された(Fig. 18.)。Sephadex G-100 superfine gel filtration による分子量の測定結果でも，それぞれ 62,000 および 54,000 と推定されたことから，いずれも monomer であると考えられる。

3-3. 酵素活性に対する NaCl 濃度の影響

CPM-D3 プロテイナーゼ I および II はいずれもその活性が NaCl 濃度によって影響を受けた(Fig. 19.)。　これら両酵素もまた，NaCl 濃度がゼロの時に最も高い活性を示し，この時の値を 100 % とすると，3 % NaCl 濃度ではプロテイナーゼ I および II はそれぞれ 12 および 18 % の活性を示し，NaCl 濃度の増加とともにその活性が阻害された。　前述の V. splendidus および V. harveyi 由来の菌体外プロテイナーゼでは 3 % NaCl 濃度における活性が 60～75 % であるのに対して，V. logei CPM-D3 の菌体内プロテイナーゼの活性はいずれも強く阻害された。　また，1 % NaCl 濃度における活性はプロテイナーゼ I で 60 %，II で 90 % であり，プロテイナーゼ I が II に比べて強く阻害されており

Fig. 19.
Effect of NaCl Concentration on the Activity of Proteinases from Vibrio logei CPM-D3.

違いがみられた。

3-4. 酵素活性に対する pH の影響

CPM-D3 プロテイナーゼの至適 pH に関する実験結果は Fig. 20. に示した。これら両酵素の至適 pH はともに 9.0 であった。　緩性側の pH において，プロテイナーゼ II は I に比べてやや低い活性を示した。

3-5. 酵素の活性と安定性におよぼす温度の影響

CPM-B3 プロテイナーゼ I および II の最適活性を示す温度を求める実験の結果は Fig. 21. に示した。プロテイナーゼ I の最適活性を示す温度は 60 °C であり、プロテイナーゼ II では 50 °C と言いがみられた。温度安定性についての実験では、それぞれの酵素溶液を 4, 40, 80 および 100 °C の各温度に

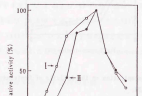

Fig. 20.
Effect of pH on the Activity of Proteinase from Vibrio logei CPM-B3.

The buffer used were: 0.1 M Citrate-Na_2HPO_4(pH 3~6); 0.1 M KH_2PO_4-Na_2HPO_4(pH 6~8); 0.2 M Tris-HCl(pH 8~9); and 0.1 M Gly-NaOH(pH 9~12).

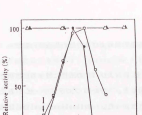

Fig. 21.
Effect of Temperature on the Stability and Activity of Proteinases from Vibrio logei CPM-B3.

The experiment on the affect of temperature both on the stability (△ ; proteinase I, ▲ ; proteinase II) and on the proteinase activity (○ ; proteinase I, ● ; proteinase II) was carried out.

て 60 分間インキュベートした後その残存活性を測定した(Fig. 21.)。これら両酵素はいずれの温度で処理しても失活せず耐熱性を示した。さらに、酵素溶液をオートクレーブ処理(121 °C, 15 min)した後、プロテイナーゼ I は 66 % の活性を示し、プロテイナーゼ II はまったく失活しなかった。さらに両酵素は 150 °C, 15 分の熱処理でともに失活した。これらの結果から、CPM-B3 菌体内プロテイナーゼ I および II はいずれも耐熱性酵素であると考えられ、特に、プロテイナーゼ II は著しい耐熱性を示した。これら両酵素の耐熱性に関しては考察の部にて他の結果とあわせて検討する。

3-6. 酵素活性に対する阻害剤およびその他の化合物の影響

CPK-D3 プロテイナーゼ I および II の活性に対する阻害剤とその他の化合物の影響は Table 13 に示した。CPK-D3 プロテイナーゼ I および II はいずれも EDTA により阻害されなかった。Orthophenanthroline は 0.1 mM の濃度ではプロテイナーゼ I を阻害し、プロテイナーゼ II に対しては阻害効果を示さなかったが、1.0 mM 濃度では完全に阻害した。Phosphoramidon はこれら両酵素に対しては ほとんど阻害効果を示さず。pepstatin I および antipain もまた阻害を示さなかった。CPK-D3 プロテイナーゼ I および II は前述のようにタンパク分解活性が弱いことから、アミノペプチダーゼおよびロイシンアミノペプチダーゼの阻害剤である actinonin、amastatin および bestatin についても検討を行ったがいずれも両酵素に阻害効果を示さなかった。金属イオン Hg^{2+} および Ni^{2+} はこれら両酵素を阻害した。p-Chloromercuribenzoic acid の添加によりプロテイナーゼ I の活性は高く なった結果を示したが、この点については前述の FLM-10B プロテイナーゼ I に見られたように、これら酵素分子の構造変化に起因[25,28]すると考えられる。以上の結果から、CPK-D3 プロテイナーゼ I および II は EDTA による阻害が認められず前述の菌体性プロテイナーゼと性質を異にするが、しかし、metallo-proteinase と分類されている黄緑膿菌 Serratia marcescence[28] および Vibrio B-33[30] のプロテイナーゼも同様の阻害剤により影響を受けることから、CPK-D3 の 2 種の菌体性プロテイナーゼも metal-chelator-sensitive ではないが、metallo-proteinase に分類されると考えられる。

Table 13. Effects of Various Inhibitors and Chemicals on the Activity of Proteinases from Vibrio logei CPK-D3

Inhibitors and chemicals	Concentration (mM)	Remaining activity (%)	
		Proteinase I	Proteinase II
Control	—	100	100
Ethylenediamine-tetraacetic acid	1.0	110	102
Orthophenanthrolin	10.0	104	117
	0.1	12.9	110
	1.0	10.8	0.0
Phosphoramidon	0.1	93.0	94.7
Pepstatin A	0.1	96.4	102
Antipain	0.1	98.4	101
Actinonin	0.1	110	109
Amastatin	0.1	107	110
Bestatin	0.1	105	104
Phenylethyl-sulfonylfluoride	1.0	103	97.3
p-Chloromercuri-benzoic acid	1.0	204	111
$CaCl_2$	1.0	71.1	94.5
$HgCl_2$	1.0	15.4	14.9
$NiCl_2$	1.0	19.9	23.9
$MgCl_2$	1.0	82.9	87.2
$CuCl_2$	1.0	87.6	95.0

The reaction mixture without casein as substrate was incubated with individual effectors in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) for 15 at 30°C and the reaction was started by adding the casein solution to the assay mixture after preincubation for 10 min at 30°C. The mixture was incubated for 30 min at 37°C and then the remaining activities were assayed and expressed in percentages of the control activity determined without an effector.

3-7. 酵素の基質特異性とその加水分解活性に関する検討

3-7-1. 合成基質 pNA 誘導体について

Table 14 に示したように、CPK-D3 プロテイナーゼ I は Ala-pNA および Leu-pNA に対する加水分解活性は極めて低いが、わずかにアミターゼ活性が存在すると考えられるが、一方、プロテイナーゼ II はこれらの pNA 合成基質に対

してほとんど加水分解活性を示さなかった(Fukasawa ら、in preparation)。

3-7-2. Dipeptide について

Dipeptide 7 種に対する CPK-D3 プロテイナーゼ I および II の加水分解の結果は Table 20 にまとめて示したが(Fukasawa ら、in preparation)、プロテイナーゼ I は His-Leu を加水分解し易く、この値を 100 % とすると、Gly-Leu および Leu-Gly に対してはそれぞれ 61 および 56 % の加水分解活性を示した。一方、プロテイナーゼ II は同じく His-Leu を加水分解し易い結果を示したが、プロテイナーゼ I が加水分解しない Gly-Phe および Gly-Gly も加水分解した。プロテイナーゼ II の His-Leu に対する加水分解活性を 100 % とすると、Gly-Leu、Gly-Phe、Leu-Gly および Gly-Gly に対してはそれぞれ 44、28、26 および 15 % の加水分解活性を示した。

Table 14. Hydrolysis of p-Nitroanilide Substrates by the Proteinases from Vibrio logei CPK-D3

	Proteinase I		Proteinase II	
	Units[a]	%	Units	%
Ala-pNA	T[b](0.10)	100	ND[c]	—
Leu-pNA	T (0.04)	40	〃	—
Bz-DL-Arg-pNA	ND	—	〃	—
Pyr-Phe-Leu-pNA	〃	—	〃	—
Glu-pNA	〃	—	〃	—
Sil-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	〃	—	〃	—
Suc-Ala-pNA	〃	—	〃	—
Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	〃	—	〃	—
Bz-L-Arg-pNA	〃	—	〃	—
Sil-L-Phe-pNA	〃	—	〃	—
N-Acetyl-DL-Phe-pNA	〃	—	〃	—
Bz-Bz-DL-Lys-pNA	〃	—	〃	—
Suc-Ala-Pro-Ala-pNA	〃	—	〃	—
Suc-Ala-Ala-pNA	〃	—	〃	—
Z-Ala-Ala-Leu-pNA	〃	—	〃	—
Bz-Tyr-pNA	〃	—	〃	—
S-Benzyl-L-Cys-pNA	〃	—	〃	—

[a] μ moles of p-nitroaniline per min per mg of protein.
[b] Trace.
[c] Not detected.

3-7-3. Insulin chain B について

Insulin chain B に対する加水分解部位に関する実験結果は他のプロテイナーゼとともに Fig. 23. にまとめて示した(Fukasawa ら、in preparation)。CPK-D3 プロテイナーゼ I および II が示す加水分解活性は、前述の菌体外プロテイナーゼに比べて低いものであったが、ともに insulin chain B の Phe-Tyr(25-26 残基間)部位を加水分解した。これは共ではプロテイナーゼ I は Val-Glu(12-13 残基間)および Tyr-Leu(15-17 残基間)部位を、II は Phe-Val(1-2 残基間)および Phe-Phe(24-25 残基間)部位を狂かに加水分解した。これら両酵素はともに Phe-Tyr(25-26 残基間)部位に対する基質特異性は高いものと考えられる。なお、pHA 誘導体、dipeptide および insulin chain B に対する実験結果は考察の部にて検討する。

3-8. アミノ酸組成の分析結果の検討

CPK-D3 プロテイナーゼ I および II のアミノ酸組成の分析結果は Table 15 に示した(Fukasawa ら、in preparation)。プロテイナーゼ I は Gly 含有率

Table 15. The Amino Acid Composition of the Proteinases from Vibrio logei CPM-D3 (mol %)

	Proteinase I	Proteinase II
Asp	4.4	4.8
Thr	3.2	2.6
Ser	11.0	2.4
Glu	10.6	3.2
Pro	12.9	1.9
Gly	36.8	54.7
Ala	10.9	11.0
Cys	ND[a]	ND
Val	4.6	2.9
Met	ND	0.8
Ile	ND	1.8
Leu	2.8	3.2
Tyr	ND	0.8
Phe	ND	1.0
Lys	4.5	5.3
His	ND	0.7
Arg	ND	1.5

[a] Not detected.

が 36 mol % と最も高く，ついで Ser, Glu, Pro および Ala が 10 mol % 以上と多く，逆に含有されていないアミノ酸も多く，Met, Ile, Tyr, Phe, His, Arg および Cys は検出されなかった。 従って，このプロテイナーゼ I は 10 種という数少ないアミノ酸により構成される酵素であるという特徴を示した。 一方，プロテイナーゼ II は Gly 含有率が 54.7 mol % と異常に高く，全構成アミノ酸の半分以上を占めており，逆に含有率が低いアミノ酸は，Met, Tyr, His および Cys であった。 また，タンパクの立体構造に関係する Pro がプロティナーゼ I では 12.9 mol %，II では 1.9 mol % とその含有率が大きく異なる結果を示した。 CPM-D3 菌体内プロテイナーゼ I および II は前述したように耐熱性プロテイナーゼであり，これら両酵素における Gly 含有率の高さ，あるいは逆に含有率の低いアミノ酸 Met, Tyr, His および Cys など，これらのアミノ酸組成の特徴と酵素の耐熱性とに関わりがあるとすれば興味深い。

3-9. まとめ

V.logei CPM-D3 菌体内プロテイナーゼ I および II の性質をまとめて Table 16 に示した。これらプロテイナーゼ I および II の分子量はそれぞれ 62,000 および 54,000 と推定され，ともに monomer であると考えられる。 カイインの加水分解に対する比活性は両酵素ともに低い結果を示した。 これら両酵素は NaCl 濃度によりその活性は影響を受け，NaCl 濃度がゼロの時に最も活性が高く，この時の値を 100 % とすると，3 % NaCl 濃度ではそれぞれ 12 および 18 % の活性を示し，NaCl 濃度の増加とともに活性が著しく阻害された。 プロテイナーゼ I および II の至適 pH は 9.8 とアルカリ側にあり，最適活性を示す温度はそれぞれ 60 および 50 °C であった。 これら両酵素の最も著しい特徴はその耐熱性であり，100 °C, 60 分の熱処理では失活せず，121 °C, 15 分のオートクレーブ処理でもプロテイナーゼ I は 66 % の活性を示し，一方，プロテイナーゼ II はまったく失活しない。 これら両酵素は 150 °C, 15 分の熱処理で失活した。 プロテイナーゼ I および II はともに EDTA により阻害されず，前述の菌体外プロテイナーゼと性質を異にした。 Orthophenanthroline はこれら両酵素の活性を阻害したが，phosphoramidon は阻害効果を示さなかった。 アミ

Table 16. Properties of the Proteinases from Vibrio logei CPM-D3

Molecular weight;	I	62,000, monomer
	II	54,000, monomer
Specific activity; (units/mg of protein)	I	4
	II	5
Relative activity; (at 3 % NaCl/at 0 % NaCl)	I	12 %
	II	18 %
Optimum pH;		9.0
Optimum temperature;	I	60 °C
	II	50 °C
Thermal stability; (remaining activity)	100 °C, 60 min	
	I	100 %
	II	100 %
	121 °C, 15 min	
	I	64 %
	II	100 %

ノベプチダーゼおよびロイシンアミノペプチダーゼの阻害剤である actinonin, amastatin および bestatin はこれら両酵素を阻害しなかった。 金属イオン Hg^{2+} および Ni^{2+} はこれら両酵素に対して阻害効果を示した。

これらの結果から、CPM-D3 菌体内プロテイナーゼ I および II は、前述の菌体外プロテイナーゼと性質を異にし、metal-chelator-sensitive ではないが、metallo-proteinase に分類されると考えられる。 CPM-D3 プロテイナーゼ I は Ala-pNA および Leu-pNA に対して僅かに加水分解活性を示し、アミダーゼ活性を示すと考えられるが、一方、プロテイナーゼ II はこれらの pNA 合成基質に対して全く加水分解活性を示さなかった。 Dipeptide に対する加水分解においては、プロテイナーゼ I は His-Leu, Gly-Leu および Leu-Gly を加水分解し、一方、プロテイナーゼ II は His-Leu, Gly-Leu, Gly-Phe, Leu-Gly および Gly-Gly を加水分解し違いがみられた。 Insulin chain B に対しては、両酵素ともに Phe-Tyr(25-26 残基目)部位を加水分解し、この部位に対する基質特異性は高いと考えられる。 アミノ酸組成の分析の結果、プロテイナーゼ I は Gly 含有率が 36 mol % と最も高く、逆に含有しないアミノ酸が多く、10 種のアミノ酸で構成されるという特徴のある酵素であった。 一方、プロテイナーゼ II は Gly 含有率が 54.7 mol % と異常に多く、全構成アミノ酸の半分以上を占めるという結果を示した。 これら両酵素におけるアミノ酸組成の特徴が、酵素の耐熱性とに関わりがあるとすれば興味深い。

4. 考察

本研究は発光細菌 V. splendidus FLE-2 および V. harveyi FLH-108 の菌体外プロテイナーゼおよび V. logei CFM-D3 の菌体内プロテイナーゼについて、それぞれの性質、特徴について研究し、またこれ以外の他の発光細菌由来のプロテイナーゼの性質とも比較検討した。

一般的に、プロテイナーゼに関する分類としては、serine proteinase, aspartic proteinase, cysteine proteinase および metal proteinase の 4 つに大別されている[1]。さらに、Maribara[2]は微生物に由来するプロテイナーゼに関して、metallo-proteinase について metal-chelator-sensitive proteinase を示し、最適活性を示す pH にもとずきさらにこれを neutral proteinase および alkaline proteinase に分類をしている。 Table 17 に単離したプロテイナーゼの諸性質を示したが、V. splendidus FLE-2[3] および V. harveyi FLH-108[4] の 3 種のプロテイナーゼと、V. splendidus ATCC 33125[5] および V. harveyi FLA-11[5] の 2 種のプロテイナーゼ、これら 4 株の詳細性発光細菌由来の 5 種の菌体外プロテイナーゼは EDTA により阻害され、至適 pH がアルカリ側にあることから、metal-chelator-sensitive alkaline proteinase に分類されると考えられる。 一方、マダイの腸内フローラから分離した発光細菌 V. logei CFM-D3 の菌体内プロテイナーゼ I および II は EDTA による阻害は受けず、前述の菌体外プロテイナーゼとは性質を異にした。しかし、metallo-proteinase に分類されている海産細菌の Serratia marcescence[2] および Vibrio B-30[3] のプロテイナーゼも同様の阻害剤による影響を受けることから、CFM-D3 の 2 種の菌体内プロテイナーゼも metal-

Table 17. Properties of the Proteinases from Marine Luminous Strains

	FLE-2	FLH-108	CFM-D3
Molecular weight:	50,000	I 49,000 II 46,000	I 62,000 II 54,000
Specific activity: (units/mg of protein)	1,888	I 418 II 972	I 4 II 5
Relative activity: (at 3 % NaCl/at 0 % NaCl)	75(%)	60～65(%)	12～18(%)
Optimum pH:	8.0	8.0～9.0	9.0
Optimum temperature:	55 °C	50 °C	50～60 °C
Thermal stability: (remaining activity)	< 40 °C	< 45 °C	100 °C, 60 min I 100 % II 100 % 121 °C, 15 min I 66 % II 100 %
Inhibited by:	o-PT* Hg^{2+}, Ni^{2+} EDTA phosphoramidon Cu^{2+}	o-PT* Hg^{2+}, Ni^{2+} EDTA phosphoramidon Cu^{2+}	o-PT* Hg^{2+}, Ni^{2+}

* o-PT; orthophenanthroline

chelator-sensitive ではないが、metallo-proteinase に分類されるものと考えられる。

両健細菌もしくは好塩細菌の生産する酵素の活性における NaCl 濃度の影響については、Fig. 22. に示すごとく 3 つの Type に分けられという報告もある[18]の

報告がある。 Type 1 は NaCl を加えないときに最も活性が高く、NaCl を加えるとその濃度の増加とともに酵素活性は阻害される。 Type 2 は NaCl を加えなくてもかなりの活性を示し、NaCl の添加によって活性化されるが、3 % NaCl 濃度を超えるとその活性は再び低下し活性の阻害を示す。 Type 3 は NaCl を加えないとほとんど活性を示さず、NaCl の添加で活性化される。

これらの Type の具体的な例として、海洋細菌 Vibrio alginolyticus 由来の酵素について報告されており、Type 1 としてはコハク酸デヒドロゲナーゼ、フマラーゼ等[32]、Type 2 としてはアコニターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ等[32]、Type 3 としては 3'-ヌクレオチダーゼ等[33]が知られている。

本研究における発光細菌由来のプロテイナーゼは Fig. 5, 13 および 18 に示したように Type 1 に属するものと考えられる[9,21,24,25]。 一方発光細菌由来の他の菌体外酵素、agarase[17] は Type 3 に、また、結製した chitinase (Fukasawa らの in preparation)は Type 2 に属すると考えられる。 Type 1 に属するこれら酵素の NaCl 濃度による活性の阻害は海洋細菌にとっては不利であるように思われる。 しかし、魚類等の脈管内で生息する微生物を考えてみると、魚のようには NaCl を排除する機能を有しておりその消化管(腸内)では NaCl 濃度は生理食塩水レベルまたそれ以下の濃度であると考えられており(杉田治男、 personal communication)、脈内フローラの一部として存在する微生物が生息するこれらの酵素の活性はさほど強い阻害は受けないと考えられる。

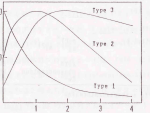

Fig. 22.
Patterns of the Effects of NaCl Concentration on the Activity of Enzymes from Marine Bacteria.

発光細菌由来のプロテイナーゼの中ではカゼインを基質として活性測定すると

Table 18. Comparison of Specific Activities on Casein Substrate

Enzyme	Relative activity	pH	Source
Thermolysin	6.2	7.5	Bacillus thermoproteolyticus
FLE-2 Proteinase	2.0	8.0	Vibrio splendidus
Bispase*	1.2	7.5	Bacillus polymyxa
Subtilisin	1.0	8.0	Bacillus subtilis
Pepsin*	0.8	2.0	Porcine gastric mucosa
Ficin*	0.4	7.0	Ficus carica

* Data reduced from catalogue.

B. subtilis FLR-2 プロテイナーゼが最も高い比活性を示した(Table 17)。そこで、市販されているタンパク分解酵素に関して、同じくカゼインを基質とした比活性の値をもとに比較検討した(Table 18)。 枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来のプロテイナーゼ[16]として良く知られているズブチリシンの比活性を 1.60 とした相対比で示すと、同じく枯草菌 *Bacillus thermoproteolyticus* のプロテイナーゼ[35]であるサーモライシンでは 6.2 と最も高く、次いで FLR-2 プロテイナーゼが 2.0 と高く、これ以外のプロテイナーゼに比べて明かに高い値を示した。 この表から同るようにサーモライシンに次いで、FLR-2 プロテイナーゼはカゼインを基質とした比活性がこの他のプロテイナーゼに比べて最も高く、すでに報告されている海洋細菌由来のプロテイナーゼの中でも最も高い比活性を示した。 このことから、FLR-2 プロテイナーゼはタンパク分解活性が高く、しかも、簡単な精製方法で純化できることから有用性があると考えられる。 なお、* 印のプロテイナーゼに関しては資料に示された値を用いて相対比を求めた。

海棲微生物由来のプロテイナーゼについては基質特異性に関する報告がほとんど見られない[18]ことから、pNA(p-nitroanilide)合成基質、dipeptide および insulin chain B に対する基質特異性および加水分解活性に関する実験を行い、その結果をまとめてそれぞれ Table 19, Table 20 および Fig. 23. に示した。FLE-2 および FLM-10B の 3 種の固体外プロテイナーゼは Leu-pNA, Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA および Pyr-Phe-Leu-pNA に対して加水分解活性を示し、特に、FLM-10B プロテイナーゼ I は Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA に対して 836 μ moles per min per mg of protein という加水分解活性を示し、FLE-2 プロテイナーゼおよび FLM-10B プロテイナーゼ II に比べて 120 倍あるいはそれ以上という著しく高い値を示した(Table 19)。 この FLM-10B プロテイナーゼ I は Suc-Ala-Ala-Ala-pNA をはじめ他の pNA 合成基質に対しても加水分解活性を示したが、その値は小さく、Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA に対する特異性は高いと

Table 19. Hydrolysis of p-Nitroanilide Substrates by the Proteinases from Marine Luminous Strains

	Units[a]
FLE-2	
Proteinase	
Leu-pNA	3.7
Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	1.6
Pyr-Phe-Leu-pNA	1.1
FLM-10B	
Proteinase I	
Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	836
Leu-pNA	12
Suc-Ala-Pro-Ala-pNA	4.0
Pyr-Phe-Leu-pNA	3.2
Proteinase II	
Leu-pNA	5.7
Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	5.0
Pyr-Phe-Leu-pNA	1.3
CFM-B3	
Proteinase I	
Ala-pNA	tr[b](0.10)
Leu-pNA	tr (0.04)
Proteinase II	
Ala-pNA	nd[c]
Leu-pNA	nd

[a] μ moles of p-nitroaniline per min per mg of protein.
[b] Trace.
[c] Not detected.

いえる。 これら 3 種の菌体外プロテイナーゼは Leu-pNA に対してともに加水分解活性を示すことからアミダーゼ活性を示すものと考えられる。 一方、CPM-03 菌体内プロテイナーゼ I および II はこれらの pNA 合成基質をほとんど加水分解しなかった(Table 19)。

次に、dipeptide を基質とした場合、Table 20 に示すように、これら 3 種の菌体外プロテイナーゼは Leu-Gly および His-Leu を加水分解したが、Gly-Leu、Gly-Phe、Gly-Gly、Gly-Pro および Glu-Glu は加水分解しなかった。 また、FLE-2 プロテイナーゼおよび FLH-105 プロテイナーゼ II は His-Leu よりも Leu-Gly に対する加水分解活性が高く、FLH-105 プロテイナーゼ I は逆に His-Leu に対する加水分解活性が高く、相違がみられた。 CPM-03 プロテイナーゼ I は His-Leu、Gly-Leu および Leu-Gly を加水分解し、一方、CPM-03 プロテイナーゼ II はプロテイナーゼ I が加水分解しない Gly-Phe および Gly-Gly に対しても加水分解活性を示した。 これら 5 種のプロテイナーゼはいずれも Gly-Pro および Glu-Glu は加水分解しなかった。

Table 20 の( )内の値は FLE-2 プロテイナーゼがカゼインを基質としたときの、1 unit の酵素が Leu-Gly を加水分解した活性値を 1.0 として表わして求めた相対比である。 この値が大きいほど dipeptide に対する加水分解の相対活性が高いことを示しており、この値を用いて相互に比較ができると考える。 FLH-105 プロテイナーゼ I は His-Leu に対するこの相対比が 159 と大きく、同じく FLE-2 の His-Leu に対する相対比 0.4 と比べるとその差は大きくなり、タンパク分解活性のみならず dipeptidase 活性も示すと考えられる。 FLH-105 プロテイナーゼ II はこの相対比がいずれも小さく、FLE-2 プロテイナーゼと同じく dipeptidase 活性よりもタンパク分解活性が高い傾向を示している。 CPM-03 プロテイナーゼ I および II はカゼインに対する比活性が低いという結果は Table 17 に示したが、それぞれの dipeptide に対してこの相対比が大きく、特に、His-Leu についての相対比を FLE-2 プロテイナーゼの値 0.4 と比べるとそれぞれ 101 および 161 という値となり、活性の高さはやく、ともに dipeptidase 活性が高い傾向を示している。

Insulin chain B に対するこれら 5 種のプロテイナーゼの加水分解部位の実験結果はまとめて Fig. 23. に示したが、ここでは特異生物 *B. subtilis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Aspergillus oryzae*、*Serratia* sp および *Mycobacter* 由来のプロテイナーゼによる加水分解活性の結果も合わせて記載した20)

Table 20. Hydrolysis of Dipeptides by the Proteinases from Marine Luminous Strains

	Leu-Gly	His-Leu	Gly-Leu	Gly-Phe	Gly-Gly	Gly-Pro	Glu-Glu
V. splendidus FLE-2 Proteinase	100 (1)[a]	42 (0.4)	–	–	–	–	–
V. harveyi FLH-105 Proteinase I	10 (16)	100 (159)	–	–	–	–	–
Proteinase II	100 (6.3)	65 (2.8)	–	–	–	–	–
V. logei CPM-03 Proteinase I	56 (161)	100 (101)	61	–	–	–	–
Proteinase II	26 (42)	100 (161)	44 (71)	28 (45)	15 (24)	–	–

[a] Relative ratio of the activity of FLE-2 proteinase on Leu-Gly, as a standard, for other proteinase activities.

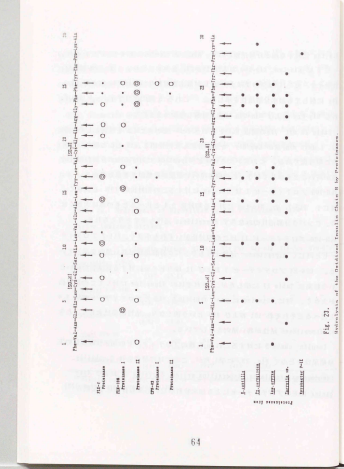

Fig. 23.
Sequences of the Oxidized Insulin Chain B by Proteinases.

比較検討した。なお、B. thermoproteolyticus のプロテイナーゼが insulin chain B を加水分解する部位は B. subtilis の結果と同様であった[20]。

発光細菌由来の 3 種の菌体外プロテイナーゼ FLE-2、FLM-108 プロテイナーゼ I および II が、insulin chain B に対して最も高い加水分解活性を示す部位を ⑩ 印で記したが、それぞれ違いが認められた。しかし、これら 3 種のプロテイナーゼは insulin chain B を加水分解する部位が多く、広い基質特異性を示すものと考えられる。 Myxobacter を除いたズブチリシンを初めとする 4 種のプロテイナーゼもまた Fig. 23. に示したように insulin chain B を加水

Table 21. The Amino Acid Composition of the Proteinases from Marine Luminous Strains (mol %)

	FLE-2	FLM-108		CPA-55	
	Proteinase	Proteinase I	Proteinase II	Proteinase I	Proteinase II
Asp	3.4	3.3	10.0	6.4	6.5
Thr	3.6	2.7	4.7	3.2	2.8
Ser	6.7	2.6	5.9	11.9	2.6
Glu	3.5	3.5	10.3	10.9	3.2
Pro	4.7	4.2	3.7	3.8	5.4
Gly	9.1	6.1	10.7	10.1	14.7
Ala	3.2	3.9	5.2	10.5	11.9
Cys	trace	1.6	1.4	ND	ND
Val	8.1	3.3	7.2	4.6	3.5
Met	3.6	1.1	1.8	ND	1.8
Ile	3.9	2.7	2.6	ND	1.0
Leu	5.0	2.2	5.1	2.6	3.2
Tyr	7.4	1.0	0.6	ND	0.9
Phe	7.1	1.3	5.9	ND	1.0
Lys	5.0	3.6	1.4	ND	5.7
His	3.7	1.1	1.4	ND	1.5
Arg	3.2	5.0	1.4		
Glucosamine	ND	25.7	ND	ND	ND
Galactosamine	ND	25.2	ND	ND	ND

a Not detected.

分解する部位が多い。ここで述べた酵素の加水分解部位を比較すると、発光細菌由来のこれら 3 種の菌体外プロテイナーゼの加水分解部位と放の 4 種の酵素の分解部位とは かなり類似していることがわかる。一方、CPM-D3 プロテイナーゼ I および II は insulin chain B の Phe-Tyr(25-26 残基間)部位を特異的に加水分解する結果が得られた。Insulin chain B に対するこのような基質特異性は Myxobacter のプロテイナーゼにおいて Pro-Lys(28-29 残基間)部位に見られる。

Table 22. Numbers of Amino Acid of the Proteinases from Marine Luminous Strains

	FLR-2	FLR-108		CPM-D3	
	Proteinase	Proteinase I	Proteinase II	Proteinase I	Proteinase II
Asp	32	15	58	32	31
Thr	23	9	29	23	16
Ser	38	8	35	35	16
Glu	36	11	62	77	22
Pro	41	13	16	34	15
Gly	61	19	58	252	372
Ala	41	10	58	20	12
Cys	6	1	13	7	2
Val	39	11	29	34	28
Met	10	4	11	0	5
Ile	18	6	21	0	0
Leu	27	7	21	20	22
Tyr	33	3	27	0	5
Phe	32	6	26	0	1
Lys	23	5	15	20	41
His	17	2	10	0	5
Arg	16	0	6	0	10
Glucosamine	0	55	0	0	0
Galactosamine	0	13	0	0	0
Total	445	322	412	328	600

発光細菌由来のそれぞれのプロテイナーゼについて、アミノ酸組成の分析を行いその結果を Table 21 および 22 に示した。Table 5 に示したように、FLR-2 と ATCC 33125 の菌体外プロテイナーゼのアミノ酸組成には類似性が認められた。また、FLR-108 プロテイナーゼ II と FLR-11 プロテイナーゼのアミノ酸組成においても類似性があると考えられる。FLR-108 プロテイナーゼ I はアミノ酸(グルコサミンおよびガラクトサミン)を含有しており、しかもそれらの含有率は高いが、同じ Y. harveyi に属する菌株の FLR-77 菌体外プロテイナーゼ[36]のアミノ酸組成の分析結果でも、アミノ糖(グルコサミンおよびガラクトサミン)を 37.2 mol % 含有していたことから特性な例ではないと考えられる。CPM-D3 菌体内プロテイナーゼ I および II のアミノ酸組成においては含有率の高い数種のアミノ酸と低いアミノ酸にはっきり分かれ特徴が認められ、温度安定性との関係については今後検討する必要がある。

本研究において、CPM-D3 のプロテイナーゼを菌体内プロテイナーゼと定義しているが、このプロテイナーゼの菌体内の局在性に関して検討を行った。

Kuback らの方法[37]にしたがってペニシリンを用いて CPM-D3 菌を処理し、スフェロプラストを調製し、また、浸透圧破砕および遠心分離により分離し、それぞれの画分における耐熱性プロテイナーゼ活性の測定を行った結果、菌体 suspension における活性を 100 % とすると、ペリプラズム画分における活性は 70 %、菌体内膜画分における活性は 40 % および菌体内可溶性画分では 140 % とそれぞれに活性が認められた。このことから、CPM-D3 菌体において耐熱性プロテイナーゼは各画分に存在している結果が得られ、この局在性を含めて、この酵素の存在意義についてさらに検討が必要であると考えられる。

発光細菌由来のプロテイナーゼの温度安定性に関しては Table 17 に示したよ

うに、FLM-2 および FLM-108 の菌体外プロテイナーゼはいずれも 45 °C 以下の温度では安定であるが、60 °C 以上では失活した。 ⅰ)に C ATCC 33125 および FLA-11 の菌体外プロテイナーゼもまた 60 °C 以上では失活した。 一方、CPM-D3 菌体内プロテイナーゼ I および II は 100 °C、60 分の熱処理では失活せず、121 °C、15 分のオートクレーブ処理でも、プロテイナーゼ I は 66 % の活性を示し、プロテイナーゼ II ではほとんど失活しない。 これら両酵素は 150 °C、15 分の熱処理ではじめて失活した。 耐熱性プロテイナーゼとして知られているサーモライシンは 80 °C、60 分の処理でその活性の 50 % が失活することが知られており[35]、明かに CPM-D3 プロテイナーゼ I および II は既知の耐熱性プロテイナーゼと比べても著しい耐熱性を示すことがわかる。 この酵素を持つ B. lonar は海浸細菌で、4～25 °C で生育可能な低温生育細菌であり、これまでに報告されている耐熱性酵素は高温生育微生物由来であることから考えて新しい知見である。

発生細菌由来のプロテイナーゼのアミノ酸組成の分析の結果、 前述のごとく CPM-D3 プロテイナーゼ I および II はアミノ酸組成に特徴を示したことから、耐熱性酵素サーモライシンのアミノ酸組成[35]と比較し、耐熱性酵素としての特徴について考察する。

Table 23 に示したように、サーモライシンのアミノ酸組成[35]はいわゆる一般的なプロテイナーゼと比較しても特徴的な差異はないといわれている。 例えば、 耐熱性のない FLM-108 プロテイナーゼ II のアミノ酸組成と比べても、Met の含有率が低着てやや高めであることは共は、この四プロテイナーゼのアミノ酸組成に殆ど違いが認められない。 しかし、一方、121 °C の熱処理でも活性を示す CPM-D3 プロテイナーゼ I および II ではアミノ酸組成に特徴がみられた(Table 23)。 すなわち CPM-D3 プロテイナーゼ I では Gly 含有率が 16 mol % と最も高く、ついで Ser、Glu、Pro および Ala が多く存在し、逆に含有していないアミノ酸は Met、Ile、Tyr、Phe、His、Arg、Trp および Cys と 8 種が数えられる。 従って、10 種類という少ないアミノ酸により構成される酵素であるという特徴があり、このように数少ないアミノ酸から構成されている酵素はこれまでに知られていない。 一方、特に耐熱性に関しているプロテイナ

Table 23. The Amino Acid Composition of CPM-D3 Proteinase, Thermolysin and FLM-108 Proteinase II (mol %)

	CPM-D3		Thermolysin	FLM-108
	P-I	P-II		P-II
Asp	4.4	4.6	13.5	10.8
Thr	3.2	2.8	7.3	4.7
Ser	11.0	2.4	7.3	5.9
Glu	10.6	3.2	6.3	10.3
Pro	12.9	1.9	2.5	4.0
Gly	16.0	14.7	11.4	10.7
Ala	10.8	11.8	8.0	9.7
Cys	ND[a]	ND	ND	2.4
Val	4.6	2.9	7.5	7.2
Met	ND	0.8	0.6	5.0
Ile	ND	1.8	5.7	2.6
Leu	2.8	3.2	5.4	5.1
Tyr	ND	0.8	5.1	5.6
Phe	ND	1.0	3.2	5.3
Lys	6.5	6.9	3.8	3.9
His	ND	0.7	2.8	4.4
Arg	ND	1.5	3.2	1.4
Trp	ND	ND	1.8	–

[a] Not detected.

ーゼ II は Gly 含有率が 54.7 mol % と異常に高く、全構成アミノ酸の半分以上を占めており、逆に含有率が低いかもしくは含有していないアミノ酸としては Met, Ile, Tyr, Phe, His, Arg, Pro, Trp および Cys であった。このプロテイナーゼのように一種類のアミノ酸の含有率が全構成アミノ酸の半分以上を占める酵素については他に例を見ない。さらに 121 °C 熱処理でも失活しない耐熱性を示す酵素はこれまでに報告が見られないことから、アミノ酸組成について比較することはできないが、このような両酵素のアミノ酸組成における Gly 含有率の異常な高さがお酵素に高い耐熱性を与えているのではないかとも推察され、誠に興味深い。また、タンパクの立体構造に関係する Pro の含有率がプロテイナーゼ II に比べて I では高く、同じく耐熱性を示すことをあわせて、構造解析等、今後さらに検討してゆく必要があると考えられる。

発光細菌がなぜ光るのか、という設問に関して、明確な回答はないものの、暗気的環境下にあった原始地球上で発生した微生物が徐々に好気的環境へ移行してゆく中で、防禦としての酵素を獲得するための手段として bacterial bioluminescent system が獲得されて来き、今日のまとして存在しているのかも知れない、という考え方がある。このような視点から、CPM-D3 プロテイナーゼ I に見られるアミノ酸組成は原始地球上で比較的生成され易かったアミノ酸 (Gly, Ala, Ser, Gln, Pro 等) の含有率が高く、逆に生成し難かったアミノ酸 (Met, His 等) は含有率が低く、この点についても興味ぶい。また、*V. logei* は海様の低温生育細菌であることから、外的刺激が少ない環境とも考えられ、しかも低温生育ゆえに世代交代時間が長く微生物の進化の上で原始的な遺伝情報を残している細菌と考えられるかもしれない。このような低温生育細菌が生産する他の耐熱性酵素のアミノ酸組成および遺伝情報の検索および比較検討もまた興味ぶい研究対象であると考えられる。

最後に、本研究は海様細菌群の一部のスクリーニングから得られたものであり研究を進めることによりさらに種々の酵素活性のより高いプロテイナーゼ、基質特異性に特徴をもつ酵素が見いだされるものと期待される。また、phosphatase agarase および chitinase を生産する発光細菌株も分離しており、本研究は種々の特徴ある酵素の供給源として発光細菌のみならず、海様細菌に期待されるものが大きいことを示すものであると考える。

5. 緒言

海産発光細菌の菌体外酵素に関する検索から、V. splendidus および V. harveyi に属する菌株が菌体外プロテイナーゼを産生することを見いだした。

陸棲生物由来のプロテイナーゼに関する報告は多いが、海棲生物由来のプロテイナーゼに関する報告は非常に少なく、発光細菌のプロテイナーゼについての報告はまったくない。そこで、それぞれの菌株の中で最も高いプロテイナーゼ産生能を有する菌株 V. splendidus FLE-2 および V. harveyi FLM-108 を選び、これらの菌株のプロテイナーゼを精製しその特徴、性質を検討した。さらに、これまで分離されていなかった魚の腸内フローラより初めて発光細菌を分離したがザイの腸内フローラより分離した菌株の中に培養上清液中にプロテイナーゼ活性が認められず、遠心洗菌させた菌体の suspension にプロテイナーゼ活性を示す菌株 V. logei CPM-93 を見いだした。この菌株を sodium deoxycholate 添液で処理することによりプロテイナーゼを菌体から溶出し精製しその特徴、性質を検討した。なお、このような条件で得られた酵素を菌体内プロテイナーゼと呼ぶことにした。

V. splendidus FLE-2 の菌体外プロテイナーゼの分子量は 50,000、V. harveyi FLM-108 の菌体外プロテイナーゼ I および II の分子量はそれぞれ 49,000 および 46,000 であった。これら 3 種の菌体外プロテイナーゼはその至適 pH は 8.0~9.0 で、いずれも EDTA により阻害されることから、metal-chelator-sensitive alkaline proteinases に分類できると考えられる。一方、CPM-93 の菌体内プロテイナーゼ I および II の分子量は 62,000 および 54,000 で、両酵素の至適 pH は 9.0、EDTA により阻害されず orthophenathroline により

阻害され、菌体外プロテイナーゼとは性質を異にするが、metallo-proteinase に分類されると考えられる。これら発光細菌 3 株由来の 5 種のプロテイナーゼは NaCl 濃度により活性に影響があり、NaCl 濃度がゼロの時に最も活性が高く NaCl 濃度の増加とともにその活性は阻害された。3 % NaCl 濃度における活性は、NaCl 濃度がゼロの時の活性を 100 % とすると、3 種の菌体外プロテイナーゼは 60~75 %、2 種の菌体内プロテイナーゼは 12~10 % と今旧、NaCl の阻害に違いが見られた。

FLE-2 プロテイナーゼはカゼインを基質とした時の比活性が高く、スブチリシンに比べて 2 倍の値を示し、簡単な精製方法で純化できることからタンパク分解酵素として有用性があると考えられる。FLE-2 プロテイナーゼと ATCC 31125 プロテイナーゼはその性質および構成アミノ酸組成に類似性が見られることから、免疫学的交叉反応性を検討したところ両酵素は共通の抗原決定基を持っているという結果を得た。 興味を同じくする菌により生産される二つの酵素の性質に若干の相違はあるものの、共通の抗原性を有することはこれらの菌属の両酵素が起源を同じにするのではないかという面白に富む興味ある結果を得た。

海棲発生物由来のプロテイナーゼについての基質特異性に関する報告はほとんどないことから、発光細菌のこれらのプロテイナーゼについて pNA 合成基質、dipeptide および insulin chain B に対する基質特異性および加水分解活性に関する検討を行った。

FLE-2 プロテイナーゼおよび FLM-108 プロテイナーゼ I および II は Leu-pNA を加水分解し、アスターゼ活性を示した。また、pancreatic elastase の合成基質である Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA に対して、FLM-108 プロテイナーゼ I は特異的に高い加水分解活性を示した。これは、発光細菌由来の菌のプロテ

イナーゼの活性の 128 倍という値であった。 CPM-83 プロテイナーゼ I および II は pNA 合成基質に対してほとんど活性を示さなかった。 Dipeptide については、 これら 3 種の固体外プロテイナーゼは Leu-Gly および His-Leu を加水分解した。 FLM-108 プロテイナーゼ I はタンパク分解活性のみならず、 His-Leu に対して高い加水分解活性を示し、dipeptidase 活性を有することが判った。 FLM-108 プロテイナーゼ II は dipeptide に対する活性は低く、FLM-2 プロテイナーゼとともにタンパク分解活性をもつことを示した。 CPM-83 菌体内プロテイナーゼ I は His-Leu、Gly-Leu および Leu-Gly を加水分解し、一方プロテイナーゼ II は His-Leu、Gly-Leu、Gly-Phe、Leu-Gly および Gly-Gly を加水分解した。 これら両酵素はタンパク分解活性は低いが、His-Leu に対して FLE-2 酵素の 181 および 161 倍という高い活性があり、dipeptidase 活性が高い結果を示した。 Insulin chain B に対しては、これら 2 種の菌体外プロテイナーゼは加水分解部位に違いが認められるものの、いずれも部水分解する部位が多く広い基質特異性を示した。 一方、CPM-83 菌体内プロテイナーゼ I および II は insulin chain B の Phe-Tyr(25-26 残基間)部位を特異的に加水分解した。

温度安定性に関する結果は、これら 3 種の菌体外プロテイナーゼはいずれも 65 °C 以下で安定であり、60 °C 以上では失活した。 一方、CPM-83 菌体内プロテイナーゼ I および II は 100 °C、60 分の熱処理では失活せず、121 °C、15 分の熱処理はでも、プロテイナーゼ I は 66 % の活性を示し、プロテイナーゼ II はまったく失活しなかったことから、これら両酵素は耐熱性プロテイナーゼであると考えられ、既に報告されているプロテイナーゼのうちで最も高い耐熱性を有することが分かった。

発光細菌由来の各プロテイナーゼのアミノ酸組成の分析の結果、CPM-83 プロテイナーゼ I は Gly 含有率が 35 mol % と最も高く、次いで、Ser、Glu、Pro および Ala が多く存在し、逆に存在しないものは、Cys、Met、Ile、Tyr、Phe、His、Trp および Arg であった。 このようにわずか 10 種類のアミノ酸で構成されている酵素であり、構成アミノ酸の種類がこのように少なく限られた酵素についての報告は見られない。 また、CPM-83 プロテイナーゼ II は Gly 含有率が 54.7 mol % と全構成アミノ酸の半分以上を占める異常な多さであり、このような酵素に関する報告も見られない。 このようなアミノ酸組成における Gly 含有率の異常な高さは CPM-83 プロテイナーゼ I および II の耐熱な特徴であった。 この酵素の高い耐熱性が特徴あるアミノ酸組成に由来するものであるならばそれは誠に興味深いものであり、酵素の耐熱性と構造との関係を解明するのに役立つであろうと考えられる。

2. 実 験 の 部

実験材料および方法

2-1. 発光細菌の採取および分離

浮遊性発光細菌の分離は、まず、採取した海水あるいはその海水を滅菌3％NaCl 溶液にて適当に希釈し、MM(Modified Nealson's)agar[11,28]上において広げる(50 μl per plate)。次に、この MM agar を 20 °C にて 24～48 時間インキュベートし、生育したバクテリアのコロニーのなかで、発光しているものを選び分離培養することにより発光細菌株を得た。 この MM agar は栄養豊富な海水培地で、その組成は、天然の海水 700 ml、蒸留水 300 ml、Bacto-peptone (Difco) 5 g、yeast extract(Difco) 3 g、glycerol 3 g、1 M Tris-HCl buffer (pH 7.8) 50 ml および agar 15 g から成る。 各地沿岸海水の採取場所および菌株番号は Table 24 に示した。 付着性発光細菌については、生のイカと滅菌3％NaCl 溶液にひたし、20 °C にて 24～48 時間インキュベートした後、その体表に生じる発光コロニーから菌を単離し、上記と同様に分離培養することにより発光細菌株を得た(Surface contaminant of squid; SC-1～SC-200)。 片利共生(腸内フローラ)発光細菌は腸内フローラから分離するので、魚を解剖して腸を取り出し、1 cm 単位で切り離して、滅菌3％NaCl 溶液を用いてホモジネートし、その希釈液を MM agar 上において広げ、20 °C にて 48 時間インキュベートし発光細菌株を分離した(Table 25)。 なおマダイの腸管における発光細菌の分布に関する実験結果としてその一例を Fig. 24. に示したが、腸内に於ける消化盲嚢の存在する部分に腸内細菌数が多く、その特徴に伴って分布しているこ

Table 24. Isolation of Luminous Bacteria (Free-Living) from Seawater in Various Parts of Coasts

Place	Abbreviation	Numbers of Isolated Luminous Strains
Onjuku, Chiba	FLA	28
Itoh, Shizuoka	FLB	55
Iura, Yamagata	FLC	68
Iwamizaki, Niigata	FLD	3
Terashmaki, Niigata	FLE	251
Okinawa		
Chinenhantoh	FLF	73
Ikeijima(pool)	FLG	10
Ikeishibuki	FLJ	55
Sesoganjima(pool)	FLL	41
Sesoganjima(coast)	FLM	6
Kuttyudoro	FLN	141
Ikeijima(coast)	FLO	16

Table 25. Isolation of Luminous Bacteria (Commensal Forms) from Intestine of Marine Fish

Host		Abbreviation	Numbers of Isolated Luminous Strains
Pagrus major	A	CFM-A	85
	B	CFM-B	99
	C	CFM-C	44
	D	CFM-D	7
Sphyraenichus fasciatus	A	CDF-A	3
	B	CDF-B	195
Sphyraenichus lucullus	A	CDT-A	217

とがわかった。共生発光細菌と宿主との関係を Fig. 25. に示した[5]。宿主と共生発光細菌との間には種特異性が成り立っている。本実験に用いた共生発光細菌は共生菌を有する魚を水揚げする魚市場を探して、これを入手し、解剖し

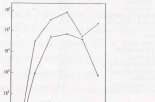

Fig. 24.
Distribution of Luminous Bacteria in Intestinal Microflora.

The intestine was cut 1 cm a piece, crushed in an aliquot of sterile 3 % NaCl solution with a homogeniser. The cell suspension was spread on MB agar mediums. After the agar medium was incubated for 24~48 hr at 28~25 °C, the numbers of colonies were counted.
o—o : numbers of luminous bacteria. ▲—▲ : total numbers of bacteria.

Table 26. Isolation of Luminous Bacteria (Symbiotic Forms) from Marine Fish

Host	Abbreviation	Species
Physiculus japonicus	PJ	P. phosphoreum
Coelorynchus kishinouyei	CK	P. phosphoreum
Chlorophthalmus albatrossis	CA	P. phosphoreum
Trachichthodes reinhardi	TR	P. phosphoreum
Acropoma sp. cf. japonicum	AJ	P. phosphoreum
Apogonichthys perdix	PE	P. leiognathi
Apogonichthys ocellatus	OE	P. leiognathi
Monocentris japonicus	MJ	V. fischeri
Cleidopus gloriamaris	CG	V. fischeri

Fig. 25.
The "Ichthylicht" [4]

A diagramatic fish used here to indicate the approximate locations, size and openings of light organs of the various groups of luminescent fishes.

Fig. 25.
Electron Micrograph of the Luminous Bacterium FLS-2.

Negatively stained. The maker represents 1 μm.

て発光菌株を取り出し、以下凡利共生菌と同様に HM xzer を用いて発光細菌株を分離した(Table 26)。発光細菌の Type Strain は ATCC (American Type Culture Collection; Rockvill, Marrland, U.S.A)より入手した。

6-2. 発光細菌の分類・同定

発光細菌株の同定は Reichelt and Baumann[7]、Baumann and Baumann[1]、Jensen et al.[8]、Yang et al.[9] 及び Baumann et al.[10] の方法に従って行なった。

Table 27. Phenotypic Characterization of Luminous Bacteria[a]

a) Previously Reported Characterizations[b]

| Strain | Photobacterium leiognathi ATCC 25521 | Photobacterium leiognathi ATCC 27562 | Photobacterium leiognathi ATCC 27561 | Photobacterium leiognathi ATCC 25520 | Photobacterium leiognathi ATCC 25519 | Photobacterium phosphoreum ATCC 11040 | Photobacterium phosphoreum ATCC 11041 | Photobacterium phosphoreum ATCC 25521 | Photobacterium phosphoreum ATCC 25522 | Photobacterium phosphoreum ATCC 25523 | Photobacterium phosphoreum ATCC 25524 | Photobacterium phosphoreum ATCC 25525 | Photobacterium phosphoreum ATCC 25526 | Photobacterium phosphoreum ATCC 25527 | Photobacterium phosphoreum ATCC 25528 | Photobacterium phosphoreum ATCC

b) Characteristics of isolated Luminous Strains

Traits	FLE-1	FLM-108	CFM-03
Luminescence	+	+	+
Pleomorphism	+	+	+
Rod-pleomorphism	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	+
Growth at 4 °C	+	+	+
20 °C	+	+	+
30 °C	+	+	+
35 °C	+	−	−
40 °C	+	−	−
Growth on basal media with carbon and energy sources:			
Maltose	+	+	+
Cellobiose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
D-Glucose	+	+	+
D-Glucuronate	+	+	+
D-Lactate	+	+	+
L-Proline	+	+	+
Peptone	+	+	+
Tryptone	+	+	+
Casamino acids	+	+	+
L-Asparagine	+	+	+
Salicin	+	−	−
Salicylate	+	−	−
Polysaccharides			
Production of extracellular enzymes:			
Amylase	+	+	+
Gelatinase	+	+	+
Lipase	+	−	+

その結果は Table 27 に示した。 また、*V. splendidus* FLE-2 strain の透過型電子顕微鏡写真を Fig. 25. に示した。 これらの結果をまとめると(Table 27. b))、 FLE-2 strain は curved rod の発光する細菌でありその極に鞭毛を有し、poly-β-hydroxybutyrate の蓄積は見られず、D-glucose の発酵においてはガスの発生はなく、arginine dihydrolase 活性を示す。 この菌株は 4, 20, 30 °C で生育可能であるが 35 °C では生育しない。 単一炭素・エネルギー源として多くの化合物を用いて生育可能であるが、D-glucuronate、DL-β-hydroxybutyrate、sucrose、salisin、caprylate または pelargonate は利用できない。 菌体外酵素としては amylase、gelatinase および lipase を生産する。 これらの結果は、FLE-2 strain が *Vibrio splendidus* biotype 1 であることを示した。 一方、FLM-108 strain に関する生物学的、生化学的試験の結果は、以下に示す通りである(Table 27. b))。 この菌株は straight rod の発光する細菌であり、その極に鞭毛を有し、poly-β-hydroxybutyrate の蓄積はなく、D-glucose の発酵ではガスの発生はなく、arginine dihydrolase 活性を示さない。 この菌株は 4 °C では生育できないが、20, 30, 35 °C および 40 °C で生育可能である。 単一炭素・エネルギー源として多くの化合物を利用可能であるが、FLM-108 strain は DL-β-hydroxybutyrate、salicin を利用できない。 さらに、菌体外酵素として amylase、gelatinase および lipase を生産する。 これらの結果、FLM-108 strain は *Vibrio harveyi* であると判定された。

深層マダイの脳背から分離された発光細菌 CFM-03 strain は Table 27. b) に示すごとく、4, 20 °C では生育可能であるが、30 °C では生育しない。 単一炭素・エネルギー源として、maltose、cellobiose、mannitol あるいは L-proline を利用できるが、D-glucunate、D-glucuronate、DL-lactate、

D-α-alanine, DL-β-hydroxy-butycrate, acetate, propionate, L-tyrosine, pyruvate, α-ketoglutarate, salicin, caprylate あるいは pelargonate はいずれも利用できない。 菌体外酵素としては、lipase のみを産生する。 これらの結果から、CPM-83 strain は Vibrio logei であると考えられる。

6-3. 菌体外プロテイナーゼ産生菌の検索

菌体外プロテイナーゼ活性は milk seawater agar-seawater agar two layer plates を用いることによって検出した。 この培地は、milk agar-marine agar two layer plates[39] を改良したものである。 下層は二つの部分からなり、一方は蒸留水 300 ml に skim milk 29 g を溶解し、他方は 700 ml の海水に 9 ml の 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.8)と 15 g の agar を加えた。 これらを別々にオートクレーブで滅菌した後、55 °C に冷却後に無菌的に混合し、ディッシュに注入した。 この下層培地が固まった直後に、NM agar をその上層に注入して二層培地を作製した。 このプロテイナーゼ試験培地を用いて菌株を培養(20～25 °C, 24～48 時間)すると、コロニーの周辺に透明なゾーンが出現することによりて菌体外プロテイナーゼの生産が判別できる。 V. splendidus FLE-2 株を用いてのこの検出を Fig. 27. に示した[33]。 この方法を用いて、菌体外プロテイナーゼ産生菌のスクリーニングを行なった。

6-4. 菌体内プロテイナーゼ生産菌の検索

菌体外プロテイナーゼ産生菌の検索の際に、培養上清液中にプロテイナーゼ活

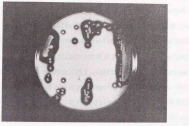

Fig. 27.
Behavior of the Proteolytic Luminous Bacterium FLE-2 on a Milk Seawater Agar-Seawater Agar Two Layer Plate.

性はないが、菌体そのものを含んだ培養液を用いるとプロテイナーゼ活性を示す菌株を見つけた。 この培養液を遠心分離し、その菌体沈殿を 3 % NaCl を含む 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.6)に懸濁し、この懸濁液を用いてプロテイナーゼ活性測定を行うことにより、菌体内プロテイナーゼ生産菌のスクリーニングを行った。

6-5. 試薬

Casein(Hammersten)は Merck(Darmstadt, Germany)社製を用いた。 Sephadex

G-100, Sephadex G-100 superfine, DEAE-Sephacel および SDS-PAGE 用分子量マーカーは Pharmacia(Uppsala, Sweden)製、また、ゲルろ過用分子量マーカーは Boehringer Mannheim(Mannheim, W.Germany)製を使用した。 Phosphoramidon, pepstatin A, leupeptin, antipain, chymostatin, actinonin, amastatin および bestatin は ペプチド研究所(大阪, 日本)から入手した。 PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride), PCMB(p-chloromercuribenzoate) IAA(iodoacetic acid), TPCK(p-tolunesulfonyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone), DTNB(5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid))およびその他の試薬は和光純薬(大阪, 日本)から入手した。 合成基質, S-benzyl-L-Cys-pNA(pNA; p-nitroanilide, 以下同じ), Glt-L-Phe-pNA(Glutaryl-L-Phe-pNA)は ナカライテスク(京都, 日本)から、Hw-Bz-DL-Lys-pNA(Bz; Benzoyl 以下同じ), N-Acetyl-DL-Phe-pNA は和光純薬(大阪, 日本)から、Bz-L-Arg-pNA, Bz-Tyr-pNA, Bz-DL-Arg-pNA, Suc-Ala-Ala-Ala-pNA(Suc; Succinyl, 以下同じ), Suc-Ala-Pro-Ala-pNA, Slu-pNA, Suc-Ala-Ala-pNA, Ala-pNA, Leu-pNA, Tyr-Phe-Leu-pNA(Tyr; L-Tyrosylamide), Glt-L-Phe-pNA, Z-Ala-Ala-Leu-pNA(Z; carbobenzoxy, 以下同じ), Suc-Ala-pNA, Z-Gly-Gly-Leu-pNA, Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA および dipeptide は ペプチド研究所(大阪, 日本)からそれぞれ入手した。 Insulin chain B は Sigma(St.Louis, U.S.A.)社製を用いた。

6-6. 培養

PLE-2 および FLN-108 strain は 500 ml フラスコに 120 ml の BGPY(basal glycerol peptone yeast extract)[18]培地を用いて培養した。この培地の組成は、人工海水(1 liter 当り、NaCl 35.1 g, KCl 1.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 24.7g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2.9 g を含む)500 ml、蒸留水 444 ml, 10 % ammonium ferric citrate 溶液 1 ml, 7.5 % K_2HPO_4 溶液 1 ml, 20 % NH_4Cl 溶液 5 ml, 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.8)50 ml, glycerol 3 g, Bacto-peptone(Difco)5 g および yeast extract(Difco)3 g から成っている。 培養は 23 ℃ にて 24~76 時間、振とうして行った。 培養後、遠心分離(12,000 r.g, 15 min)により菌を除き、その上清液を酵素液を精製した。

CPM-D3 strain は同じく BGPY 培地を用いて 5 liter に培養し、培養液を遠心分離して得られた菌体浅藍物を、3 % NaCl を含む 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.8)に懸濁して酵素液とした。

6-7. プロテイナーゼ活性測定

プロテイナーゼ活性測定は Hagihara et al.[40] の方法に従って行った。活性測定には、2 % casein(Hammarsten)溶液 0.25 ml, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) 0.25 ml に、酵素溶液 0.25 ml を加え、30 ℃, 10 分間酵素反応後、8.5 % trichloroacetic acid(TCA) 0.75 ml を加えて反応を停止し、遠心分離(15,000 r.g, 5 min)した上清の吸光度(A_{280nm})を Shimadzu UV-120-02 分光光度計を用いて測定した。 ブランクは TCA 溶液を加えた後に酵素溶液を加え、遠心分離した上清を用いた。 酵素活性の 1 unit は酵素溶液 1 ml 当り、1 分間当り、1 ug の tyrosine 相当量とした。 また、基質として、Hemoglobin を用いる場合、Anson[41] の方法に従って、100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) を用いて、2 % hemoglobin(sigma H-2625)溶液を作製して用いた。 活性測定法

は casein を基質として用いた時と同様に行なった。

6-8. タンパク質の定量

タンパク質濃度は牛血清アルブミン(BSA)を標準タンパクとして用い Lowry et. al.[42] の方法に従って行なった。

6-9. プロテイナーゼの精製

菌体外プロテイナーゼの精製は培養液を遠心分離(12,000 x g, 15 min)し、その上清液に硫酸アンモニウムを加えて 100 % 飽和とし、その遠心分離(12,000 x g, 30 min)沈殿を少量の 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.8)に溶解し、5 mM Tris-HCl buffer(pH 7.8)に対して 4 °C で透析をした。 透析後、酵素溶液に DEAE-Sephacel を加えて混合し、酵素を吸着させた後にカラムにつめ、10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.8)を用いて洗浄した後、 時々の濃度の NaCl を含む buffer を用いてステップ・ワイズに NaCl 濃度を高めて酵素を溶出した。 V. splendidus FLH-2 strain からのプロテイナーゼは、この段階で、0.6 M NaCl 濃度にて溶出された。 V. harveyi FLH-108 strain からのプロテイナーゼは、この段階で 0.4 M と 1.0 M NaCl 濃度で酵素が4それぞれ溶出されたことから、proteinase I および II と名づけた。これらのプロテイナーゼ活性をもつフラクションを集めて、それぞれ Sephadex G-100 column chromatography を行なった。 いずれのプロテイナーゼもこの段階では single peak であった。

菌体内プロテイナーゼの精製に関しては、培養、遠心分離の後菌体重量の 5 倍量の 0.5 % Sodium deoxycholate と 3 % NaCl を含む 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.8)を加えて 4 °C にて 1 晩撹拌し、表面活性剤(sodium deoxycholate)によりプロテイナーゼを菌体から遊離し、酵素精製用の溶液とした。その後の酵素精製の手順は菌体外プロテイナーゼと同様に行った。 DEAE-Sephacel を用いての精製の段階で、 CM-33 プロテイナーゼは FLH-108 プロテイナーゼと同様に、 0.4 M および 0.8 M NaCl 濃度で 2 種の酵素が溶出されたことから、それぞれをプロテイナーゼ I、および II と名付けた。 これらのプロテイナーゼ活性をもつフラクションを集めて、次に Sephadex G-100 column chromatography を行った。 これらのプロテイナーゼもまた、この段階で single peak であった。

6-10. 電気泳動

Polyacrylamide disc gel electrophoresis(PAGE)は Davis[43] の方法に従って行なった。 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)は Weber and Osborn[44] の方法に従って行なった。 プロテイナーゼの活性染色は、泳動の終わった gel を 2 % hemoglobin 溶液につけ、氷中にて 30 分置き、次に 30 °C にて 15 分間インキュベートした。 この後、12.5 % trichloroacetic acid(TCA) に溶解した 0.2 % Coomassie brilliant blue 溶液を用いて染色した後、 10 % TCA 溶液で非色をとと、酵素活性の存在した部分は透明ゾーンとして現われた[21]。

6-11. 分子量の測定

精製されたそれぞれのプロテイナーゼの分子量は SDS-PAGE と、Determann and Michel[45] の方法による Sephadex G-100 superfine gel filtration により求めた。

6-12. アミノ酸組成の分析

精製したプロテイナーゼを連結乾燥し、0.01 % 2-mercaptoethanol を含む 5.7 N HCl を加えて減圧下にて 110 °C で 24 時間加水分解した。この加水分解物をアミノ酸分析機(Model 6300, Beckman Instruments Inc.)にて分析した。アミノ酸組成は mol % で示した。Asp は Asp と Asn、Glu は Glu と Gln の値を示している。

6-13. アミノ酸配列の決定

精製した FLE-2 および 33125 プロテイナーゼは polybrene 存在下で、アミノ酸シーケンサー(Model 890C, Beckman Instruments Inc. あるいは、Model PIQ-1 protein sequencer, Shimadzu Instruments Inc.)を用いて自動エドマン法にて分析を行った[22]。アミノ酸の Phenylthiohydantoin 誘導体は高速液体クロマトグラフィーシステム(Waters Inc.)を用いて同定した。

6-14. 合成基質(p-Nitroanilide 誘導体)に対する基質特異性および加水分解活性

それぞれ合成基質は 0.2～1.0 mM の濃度で、5 % N,N'-dimethylformamide を含む 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.8)に溶解した。この基質溶液 1.0 ml に酵素溶液 0.5 ml を加えて混合し、25 °C で反応させ、この時の 410 nm 吸光度の増加を測定し、p-nitroaniline の $\varepsilon_{410\,nm}$ における極値線を用いて、酵素タンパク 1 mg 当り、1 分間当りに生成される p-nitroaniline の μ moles で酵素活性を示した。

6-15. Dipeptide に対する基質特異性および加水分解活性

それぞれの dipeptide を 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.8)に溶解して 5 mM 溶液を作製し、この dipeptide 基質溶液 0.1 ml に酵素溶液 0.1 ml を加えて 25 °C で 20 時間反応させた後、0.2 ml の 0.5 % トリクロロ酢酸溶液を加えて反応を停止し、遠心分離により上清液を得た。この上清液に 0.8 ml の Sodium citrate buffer(pH 2.2)を加えろ過(0.45 μm, filter)後、アミノ酸分析機(JEOL JLC-200A)を用いて分析した。

6-16. Insulin chain B に対する加水分解部位の決定

Insulin chain B を 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.8)に溶解して 1 mM 溶液を作製し、この基質溶液 0.6 ml に、自己消化によるペプチドを透析により除いた

酵素溶液 0.6 ml を加えて、25 °C にて 10、30、60 分間および 5、20 時間反応させ、限外ろ過(モルカット、M.W. 10,000)した後に、高速液体クロマトグラフィー(Capcell Pak C_{18}、TPA pH 2.0、220nm)にて分離し、それぞれの分解を 110 °C、24 時間酸加水分解し、sodium citrate buffer(pH 2.2)に溶解した後にアミノ酸分析機(日立 JLC-200A)にて分析し、プロテイナーゼによって加水分解された各断分から insulin chain B の加水分解部位を決定し、酵素反応時間および それら断分の量比から加水分解し易い部位を決定した。

6-17. 抗体の調製

精製した FLE-2 および ATCC 33125 プロテイナーゼは Sephadex G-25 coarse を用いたカラム・クロマトグラフィ及び限外ろ過(ミニモジュール NM-3 型)により脱塩、濃縮した。 この両酵素は生理食塩水にて 400 μg/ml とした後、抗原として用いた。 各々の酵素溶液 0.5 ml を等量のフロインドのコンプリート・アジュバントと混合し乳化した後、 家兎(約 3 Kg、雄)の前・後肢及び背部皮下に 2 週間間隔で 3~5 回注射した[16]。 最終注射後 10 日目に麻酔下頸動脈より採血し、FLE-2 および ATCC-33125 プロテイナーゼに対する抗血清とした。 これら抗血清は分注し使用まで −20 °C で保存した。

6-18. ゲル内沈降反応による免疫学的交叉反応性の検討

ゲル内沈降反応は Ouchterlony[23] の方法により行なった。 用いたアガロース板(厚さ 1 mm)は 0.075 M バルビタール-緩衝液(pH 8.5, μ=0.05)にアガロースを 1.2 % になるように加熱溶解し、最終濃度 0.05 % の NaN_3 を加え作製した。 このアガロース板の所定の位置に直径 2 mm の穴を明け、それぞれの抗血清と各プロテイナーゼ(1 mg/ml)溶液 8 μl を穴に注入した後、湿箱中に入れ室温にて静置した。 結果は経時的に記録し、9 時間後の結果を示した。

6-19. 免疫電気泳動

免疫電気泳動は 1.2 % のアガロース板の所定の穴に FLE-2 および ATCC 33125 のプロテイナーゼ(1.0 mg/ml) 8 μl を注入した後、上述のバルビタール緩衝液を泳動用緩衝液として用い、アガロース板 1 cm 当り 2 mA、1 時間、室温で行なった[17]。 その後、1 % 山の湯に抗プロテイナーゼ血清を満たした後、湿箱中に入れ室温にて静置した。 結果は経時的に記録し、5 時間後の結果を示した。

6-20. 固体内プロテイナーゼの結在の検討

W.Iogei CPM-D3 耐熱性プロテイナーゼの固体内の局在性に関する検討を行った。 CPM-D3 菌体を前述の BGPY 培地[19] を用いて培養後集菌し 3 % NaCl 溶液を用いて洗浄した。 この菌体を 3 % NaCl を含む 0.02 M phosphate buffer (pH 7.2)に懸濁し、Vibrogen 振動破砕機を用いて菌体を破砕し、あるいは Omni mixer を用いてホモジナイズし、 遠心分離(12,000 xg、20 min)により分画した。 また、Koback の方法に従い[27]、ペニシリン G を用いて CPM-D3 のスフェロプラスト調製し菌糸膜下で膨潤し、さらに浸透圧破砕後遠心分離により分

謝辞

本研究に際し、終始御指導 並びに 御鞭達を賜りました城西大学薬学部 倉田宗司 教授に深く感謝の意を表わします。 また、本研究に関し御指導、御助言を賜りました城西大学薬学部 久恒和仁 助教授、土屋晴何 助教授、桑江豊保 講師 近藤誠一 講師 に深謝申し上げます。 さらに、この研究に御協力頂いた日本女子大学 大隅正子 教授、東京医科歯科大学 高木守 講師、城西大学理学部 岡すよし子 助手に感謝申し上げますとともに、本研究にご協力頂きました城西大学薬学部生理化学教室、微生物学教室、薬品製造工学教室をはじめ各研究室の皆様に感謝致します。

そして、膨大な数の発光細菌の採取、分離培養、スクリーニングをはじめ、本研究に関わって頂きました城西大学理学部生化学研究室の学生諸君に感謝致します。 最後に、終始本研究を支えて頂いた城西大学理学部 米谷清正 教授に厚く感謝致します。

1) 門田 元, 多賀 信夫, "海洋微生物研究法," 学会出版センター (1985).

2) J. W. Hastings, Ann. Rev. Biochem., 37, 597 (1968).

3) E. H. Healson and J. W. Hastings, Microbiol. Rev., 43, 496 (1979).

4) P. Baumann and L. Baumann, "The Prokaryotes," ed. by M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows and H. G. Schlegel, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, 1981, p. 1301, Chapter 104.

5) J. W. Hastings and K. H. Nealson, "The Prokaryotes," ed. by M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows and H. G. Schlegel, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, 1981, p.1332, Chapter 105.

6) J. W. Hastings, J. Mol. Evol., 13, 309 (1983).

7) J. L. Reichelt and P. Baumann, Arch. Mikrobiol, 94, 283 (1973).

8) M. J. Jansen, H. M. Tebo, P. Baumann, K. Mandel and K. H. Nealson, Cur. Microbiol., 2, 311 (1980).

9) Y. Yang, L. Yeh, Y. Cao, L. Baumann, P. Baumann, J. S. Tang and B. Beaman, Cur. Microbiol., 8, 95 (1983).

10) P. Baumann, N. R. W. Schubert, A. L. Furniss, J. Y. Lee and L. Baumann, "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," Vol. 1, ed. by N. R. Kreig and J. G. Holt, Williams and Wilkins, Baltimore and London, 1984, p.516.

11) S. Fukasawa and P. V. Dunlap, Agric. Biol. Chem., 50, 1645 (1986).

12) S. Fukasawa, T. Suda and S. Kubota, Agric. Biol. Chem., 52, 258 (1988).

13) J. L. Reichelt, K. H. Nealson and J. W. Hastings, Arch. Microbiol. 112, 157 (1977).

14) E. G. Ruby and K. H. Nealson, Biol. Bull., 151, 574 (1976).

15) J. W. Fitzgerald, Arch. Microbiol., 112, 153 (1977).

16) S. Fukasawa, P. V. Dunlap, M. Baba and K. Osumi, Agric. Biol. Chem., 51, 265 (1987).

17) S. Fukasawa and H. Kobayashi, Agric. Biol. Chem., 51, 269 (1987).

18) 岐木 力, "好塩微生物," 堺井 正男, 大西 博, 岐木 力, 振動微培養, 1979, p. 205.

19) S. Fukasawa, S. Aoki, M. Gawazawa and M. Osumi, Agric. Biol. Chem., 52, 427 (1988).

20) K. Merihara, "Advances in Enzymology," ed. by A. Meister, An Interscience Publication, John Willey and Sons, New York, London, Sydney and Toronto, 1974, p. 179.

21) S. Fukasawa, K. Takagi and M. Kurata, Chem. Pharm. Bull., 37, 1372 (1989).

22) P. Böman, Arch. Biochem. Biophys., 72, 475 (1949).

23) O. Ouchterlony, "Progress in Allergy," Vol. 6, ed. by P. Kallos and B. H. Waksmann, Karger Bessel and New York, 1958, p.30-154.

24) S. Fukasawa, K. Nakamura, M. Miyahira and M. Kurata, Agric. Biol.

Chem., 52, 3009 (1988).
25) S. Fukasawa, K. Nakamura, A. Kamil, Y. Ohyama and K. Osumi, Agric. Biol. Chem., 52, 435 (1988).
26) W. W. Kielley and L. B. Bradley, J. Biol. Chem., 218, 653 (1956).
27) B. T. Kaufman, J. Biol. Chem., 239, PC 668 (1964).
28) S. Fukasawa, S. Takei, H. Satou, H. Shima and K. Kurata, Chem. Pharm. Bull., 28, 1644 (1990).
29) I. J. Mcdonald and A. K. Chambers, Can. J. Microbiol., 9, 871 (1963).
30) J. R. Merkel and T. Sipos, Arch. Biochem. Biophys., 143, 121 (1971).
31) 一島 英治, "プロテアーゼ," 学会出版センター, 1988.
32) R. A. MacLeod and A. Hori, J. Bacteriol., 80, 464 (1960).
33) T. Umemoto and M. Hayashi, Biochim. Biophys. Acta, 171, 89 (1969).
34) F. S. Markland Jr. and E. L. Smith, "The Enzymes," Vol. 3, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, New York and London, 1971, p. 561.
35) H. Matsubara, "Methods in Enzymology," Vol. 19, ed. by G. E. Perlmann and L. Lorand, Academic Press, New York and London, 1970, p. 642.
36) S. Fukasawa, M. Hiyahira, H. Hosoda and M. Kurata, Chem. Pharm. Bull., 37, 204 (1989).
37) H. A. Kuback, "Methods in Enzymology," Vol. 22, ed. by W. B. Jakoby, Academic Press, New York and London, 1971, p. 99.

38) K. H. Nealson, "Methods in Enzymology," Vol. 57, ed. by M. A. DeLuca, Academic Press, New York, 1975, p. 153.
39) R. K. Sizemore and L. H. Stevenson, Appl. Microbiol., 20, 991 (1970).
40) 荻原 立二, "酵素研究法," Vol. 2, 志賀内郎, 朝倉書店 (1956).
41) M. L. Anson, J. Gen. Physiol., 22, 79 (1938).
42) O. H. Lowry, M. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
43) B. J. Dabis, Ann. New York Acad. Sci., 121, 404 (1964).
44) K. Weber and M. Osborn, J. Biol. Chem., 244, 4406 (1964).
45) H. Determann and W. Michel, J. Chromatogr., 25, 303 (1966).
46) T. Katubashi and M. Unui, Nature New Biol., 245, 213 (1973).
47) P. Grabar and C. A. Williams Jr., Biochim. Biophys. Acta, 10, 193 (1953).

本研究の内容に関する論文

① S. Fukasawa, S. Aoki, M. Sawazawa and M. Osumi (1988). Purification and Properties of a Proteinase from a Marine Luminous Bacterium, Vibrio splendidus Strain FLE-2. Agric. Biol. Chem., 52, 427-433.

② S. Fukasawa, K. Nakamura, A. Kamii, Y. Ohyama and M. Osumi (1988). Purification and Properties of a Proteinase from a Marine Luminous Bacterium, Vibrio harveyi Strain FLA-11. Agric. Biol. Chem., 52, 435-441.

③ S. Fukasawa, K. Nakamura, M. Mizuhira and M. Kurata (1988). Some Properties of Two Proteinases from a Luminous Bacterium, Vibrio harveyi Strain FLM-108. Agric. Biol. Chem., 52, 3009-3014.

④ S. Fukasawa, K. Takagi and M. Kurata (1988). Properties of the Proteinase from a Luminous Bacterium, Vibrio splendidus ATCC 33125. Chem. Pharm. Bull., 37, 1372-1374.

⑤ S. Fukasawa, S. Takei, K. Satou, H. Shima and M. Kurata (1990). Thermostable Proteinases from a Luminous Bacterium, Vibrio logei Strain CPK-03. Purification and Some Properties. Chem. Pharm. Bull., 38, 1644-1647.