

[研究報告]

Bacillus subtilis Kinema からの細胞内セリンプロテアーゼの クローニング*

小浜 恵子**、山本 忠***

ネパールの納豆類似の無塩大豆発酵食品であるキネマから分離した *Bacillus subtilis* Kinema の生産するプロテアーゼ遺伝子をカゼイン分解活性を指標としてクローニングし、塩基配列を決定した。取得した遺伝子は細胞内セリンプロテアーゼであり、331アミノ酸から構成されておりプロトンリレー系を形成する Asp, His, Ser 残基が保存されていた。*Bacillus subtilis* 由来の細胞内プロテアーゼ ISP-1 と 50.3%、*Bacillus polymyxa* 由来の細胞内プロテアーゼと 54.8% の高い相同性を示した。

キーワード：枯草菌、細胞内セリンプロテアーゼ

Cloning and Nucleotide Sequence of an Intracellular Serine Proteinase from *Bacillus subtilis* Kinema

KOHAMA Keiko, YAMAMOTO Tadashi

An Intracellular serine proteinase gene is cloned from *Bacillus subtilis* Kinema. Kinema is a traditional non-salted fermented soybean food in Nepal. Nucleotide sequence was determined. It was consisted of 331 amino acids, and conserved Asp, His, Ser residues. Amino acid sequence was 50.3% homologous to the *Bacillus subtilis* ISP-1 and 54.8% homologous to the proteinase from *Bacillus polymyxa*, respectively.

key words : *Bacillus subtilis*, intracellular serine proteinase

1 緒 言

納豆は、納豆菌 (*Bacillus natto*) により生産されるビタミンを多く含み、酵素作用によって難消化性的大豆の栄養価を高めたすぐれた発酵食品である。納豆中には、血栓を溶解する効果のある細胞外セリンプロテアーゼの一種、いわゆるナットウキナーゼが存在することが報告されており¹⁾、一方われわれは、ネパールの納豆様の無塩大豆発酵食品であるキネマから分離した *Bacillus subtilis* Kinema よりナットウキナーゼを精製した²⁾。プロテアーゼは、食品製造に用いられる他、工業的にも皮革加工などにも用いられており、耐熱性や、耐アルカリ性など変化の富んだプロテアーゼの探索が望まれている。一島らは Kinema の菌株から等電点が 3.9 である新たなセリ

ンプロテアーゼを分離しており³⁾、未知のプロテアーゼの存在も期待される。

本研究においては Kinema の菌株より新たな細胞内プロテアーゼ遺伝子をクローニングし、塩基配列を明らかにしたので報告する。

2 実験方法

2-1 *Bacillus subtilis* Kinema の染色体調製

Bacillus subtilis Kinema を LB 培地 (1% トリプトン、0.5% Yeast extract、0.5% NaCl) にて定常期まで培養し、常法により⁴⁾ 染色体 DNA を調製した。

2-2 プロテアーゼ遺伝子のクローニング

* 遺伝子情報を利用した納豆菌の改良 (第2報)

** 応用生物部

*** 企画情報部 (現在 応用生物部)

調製した染色体DNAを制限酵素Sau3AIで部分的に分解し、BamHIで分解したベクター pUC19とライゲーションさせ、Escherichia coli HB101に常法により形質転換し、2% ミルクカゼイン及び 50 μg/ml アンピシリンを含む LB 寒天培地にプレーティングし、カゼインを分解し、ハローを形成する株を取得した。

2-3 プロテアーゼ遺伝子の塩基配列決定

クローニングしたプロテアーゼ遺伝子の塩基配列は、Sanger⁵⁾らの方法により Applied Biosystems 社の DNA シーケンサーで決定した。

3 結果

得られたプロテアーゼ遺伝子断片の制限酵素地図を図1に、塩基配列を図2に示した。シグナル配列が認められない細胞内プロテアーゼであり、331アミノ酸から構成されていた。他のプロテアーゼとの相同性を検索した結果、Bacillus subtilis 由来の細胞内プロテアーゼ ISP-1⁶⁾と50.3%、Bacillus polymixia由来の細胞内プロテアーゼ⁷⁾と54.8%の相同性を有していた。

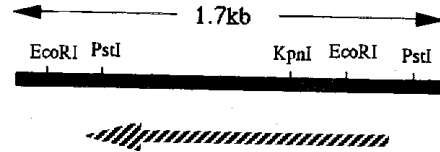


図 1 遺伝子断片の制限酵素地図

```

10      20      30      40      50      60
GGATCTTTAAGCAGTTCGGTTCCAATCATTTTTAAGATACTCATACCTGTTTACCTCCA
70      80      90      100     110     120
TGTATATCTAAGGTTTTTAGTAGTATAACATGGGGCCAACATAATGCTTTTGTCTCAC
130     140     150     160     170     180
TAAACAAGTAGTATAAAGCATTAGGACACATCTGTCGAATTCAGATTAAACAGGACA
190     200     210     220     230     240
ATATAACTGAATATCAAACATATTATGTGAGAAATTTTACAGCTGTGGTACAATCAGAAG
250     260     270     280     290     300
TGACATATATCCATATTTATCCTTACTTTATAATGCACCTATGCAGACTTTATAACAC
310     320     330     340     350     360
GAGTCTACCAAGTCGTTCTGCTACTGTGTAGGGCTCTTTTGTAAAAAAGGGGGGATAA
370     380     390     400     410     420
AAGTGATGGAGTTGCTTGAGCAGTTGTTGACGTTGTCGTAATGCTGCCACTTCTCTCT
430     440     450     460     470     480
CTACCGTCATGTTAGGTATCAAACATTTAAAAGAGATAAAAAGAAACATAAAAGAA
490     500     510     520     530     540
GACGATTCCTTGAGGAAATCGCCTATATGAGATTTTTTGCCTACGAGTAAAGTATAAT
550     560     570     580     590     600
ACCGAATAAACTAATTTATACAACAACTTTCAAATTTTCAATCTAATATAAGTGTATT
610     620     630     640     650     660
TATATTGTAAGTGTAAATGGGATATATGTCGAGCATTTTAGCACTTTTATCAAAAAAAT
670     680     690     700     710     720
TCTTATTCACTAGGGGAGTTCGCATTGAGTAAAGTGAAGCTGATCCATTCAAAGTTGAG
      M S K V S L I P F K V E
730     740     750     760     770     780
AAGGTTCTAAATGACACAAAGGTTATTCGCCCGGTATTGAAATGATGAAGCACCAGCC
      K V L N D T K V I P P G I E M I E A P A
790     800     810     820     830     840
GTATGGGAGGCTGGATATAAGGGTGGTAATACCTGTTGTAGCTGTTCTAGATACAGGGTGT
      V W E A G Y K G G N T V V A V L D T G C
850     860     870     880     890     900
GAAACGACCCACATCGAATTTAAGGATCAAATATTGACGGTCGTAACFTTACTACAGAT
      E T T H I E F K D Q I I D G R N F T T D
910     920     930     940     950     960
GATAACAGCGACCCGTGATAATGTAGAAGATTCTAACGGTCATGGTACTCACGTATGCGGA
      D N S D P D N V E D S N G H G T H V C G
970     980     990     1000    1010    1020
ACCGTTGCTGCTGTGAGAATGACAAGGGCGCTATTGGTACCGCCCAAAAAGCGAAACTG
      T V A A C E N D K G V I G T A P K A K L
    
```

```

1030     1040     1050     1060     1070     1080
CTCGTTGTAAAGGTGCTTAGCGGACAAGGGTACGGAGATACAAAATGGGTCAATTGAAGGG
      L V V K V L S G Q G Y G D T K W V I E G
1090     1100     1110     1120     1130     1140
GTTCTGTTATGCGATAAATGGCGTGGACCAACAAATGAACGAGTTCGTGTCATTTCTATG
      V R Y A I N W R G P N N E R V R V I S M
1150     1160     1170     1180     1190     1200
TCACCTCGGGGAAGAATTGATACTCCTGAACTTCATCAAGCGATAAAAACATGCTGTAGCT
      S L G G R I D T P E L H Q A I K H A V A
1210     1220     1230     1240     1250     1260
GAGGATATTTTAGTTGTATGTCAGCTGGAATGAAGGGGATGGCAATCATGACACAGAT
      E D I L V V C A A G N E G D G N H D T D
1270     1280     1290     1300     1310     1320
GAATATGCCTACCCCTGAGCTTATCCGGAAGTCGTTCAAGTAGGCTCTGTCAATCTAGAA
      E Y A Y P G A Y P E V V Q V G S V N L E
1330     1340     1350     1360     1370     1380
GGCGAGATCTCTAGATTCAGCAATACAAAATGTGCGGATGACCTTGTCCGACCAGGCGAA
      G E I S R F S N T N C A I D L V A P G E
1390     1400     1410     1420     1430     1440
GAAATATTTCACCTTATCTTAAACAACGGCTACGCTGCTTATCCGGTACTTCAATGGCT
      E I I S T Y L N N G Y A V L S G T S M A
1450     1460     1470     1480     1490     1500
ACACCGCATGTATCCGGTGGCGCAGCCCTGTTAATGAACAAGTAGAAAAGAGTTTGAA
      T P H V S G A A A L L I E Q V E K E F E
1510     1520     1530     1540     1550     1560
AGAAAGTTGACGGAAACCGAATTTTCGCACAACACTGATCAACACACCCGTTTCTCTAAC
      R K L T E P E I F A Q L I K H T V S L N
1570     1580     1590     1600     1610     1620
TTCAGCCGCGCGCACAAGGAAGCGGGCTGTTGATATTATCATCAAGCGTTGTATCAGTA
      F S R R A Q G S G L L I L S S S V V S V
1630     1640     1650     1660     1670     1680
GAGGATGCCGACTATACAGCTAGCTCTATTAAATGGAGGAACAAGGCCGCTCTATTGTA
      E D A D Y T A S S I K L E E Q G R S Y *
1690     1700     1710     1720     1730     1740
GAAGCCCTGCTCTTTATGCGAAATTTTTCCTTCTCAGCATCTCTTTTAAACCAAGT
1750     1760     1770     1780
AATAACGTGGCTACAAAAGCAACACCTGCAG
    
```

図 2 Bacillus subtilis Kinema 細胞内プロテアーゼの塩基配列

```

M-SKVS LIPFVKV LNDTKVIPPGIEMIEAPAVWEAGYKGGNTVVAVIDTGCETHLIEF
.NGEIR...YVTNEQIM.VNEL.E..KV.K..EM.AK.V..K.IK.....D.S.PDL
.ER..HI..YQ.I.QEQQVNE..R.V...Q.....NQ-TR.RGVK.....DAD.PDL
*      **          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
KDQIIDGRNFTTDDNSDPDNVEDSNHGHTHCGTVAACENDKGVIGTAPKAKLLVVKVLS
.N...G.K..SD..GGKE.AIS.Y.....A..I..NDSNG.IA.V..E.S..I...G
.AR..G.....D..EG..EIFK.Y.....A..I..T..EN..V.V..E.D..II...-
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
-GQGYGDTKWVIEGVRYAINWRGPNNERVVRVISMSLGRIDTPELHQAIKHAVAEDILVV
GEN.S.QYE.I.N.IN.-----VEQK.DI.....PS.V...EE.V.N.KNGV...
NK..S.QYD.I.Q.IY.....IEQK.DI.....PE.V...E.V.K...SQ...M
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CAAGNEGDGNHDTDEYAYPGAYPEVVQVGSVNLEGEISRFNSNTCAIDLVPAGEEIIISTY
.....DER.E.LS..A..N..IA.....SVAR.L.E...A.KE.....N.L..L
.....DDR...LG...C.N..IS..AI.FDRHA.E...S.NEV.....D.L..V
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
LNNGYAVLSGTSMTATPHVSGAAALIEQVEKEFERKLTEPEIFAQLIKHTVSLNFSRRAQ
P.KK.GK.T...A.....L..IKSYE.ES.Q...S.S.V...RR.LP.DIAKTLA
PGGK..TF.....A..L..IKQLANAS...D.....LY.....R.IP.GN.PKME
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
GSGLLILSSSVSVEDADYTASSIKLEEQGRSY
.N.F.Y.TAPDELA.K.EQSHLL-T.
.N...Y.TAVEELSRIF.TQRVAGI.STASLKVK
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

上段: *Bacillus subtilis* Kinema
 中段: *Bacillus subtilis* (ISP-1)
 下段: *Bacillus polymixia*

図 3 細胞内プロテアーゼのアミノ酸同一性

4 考 察

Bacillus 属の生産する菌体内プロテアーゼは、孢子形成期に活性が認められることから、遺伝子レベルでの活性調節機構と、孢子形成過程との関連について検討され、ISP-Iの制御機構については多くの報告がある。ISP-Iは、他の不要タンパクを分解し、孢子の特異的タンパクの新生に必要とも言われていたが、孢子形成に必須ではないとの報告が有力である⁸⁾。他の細胞内プロテアーゼISP-IIなども孢子形成には関連しているが必須ではない⁹⁾。孢子形成期の細胞内プロテアーゼの生理的役割については、今後の報告が待たれるところである。発酵食品製造、納豆製造におけるプロテアーゼの役割は、細胞外プロテアーゼによる消化が最も重要であるとは考えられるが、細胞内プロテアーゼが発酵過程の微生物内でどのような役割を果たし、食品製造に影響をおよぼしているのか興味もたれる。

最近、一島らは好アルカリ性の *Bacillus* 属から、pH 12で高い活性を有する細胞内プロテアーゼの遺伝子をクローニングし、その性質について検討しているが¹⁰⁾、今回クローニングした細胞内プロテアーゼと非常に似ており、C末側8残基が長いこと、4アミノ酸が異なる他は全く同一であった。Kinemaの菌株はpH10で生育不能であることから、アミノ酸の相違がアルカリ耐性の性質の差であると推察される。

4 結 語

Bacillus subtilis kinemaから細胞内プロテアーゼ遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。331アミノ酸から構成されており、*Bacillus subtilis* ISP-I及び*Bacillus polymixia*の細胞内プロテアーゼと高い相同性を示した。また、Alkalophilic *Bacillus* sp.の細胞内プロテアーゼと12アミノ酸の相違しかないことから、アルカリ耐性の細胞内プロテアーゼとの性質の相違について今後検討する必要がある。

本研究を実施するに当たり、キネマの菌株を分譲、併せてご指導ご助言していただいた東北大学農学部一島英治教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 須見洋行: 醸造協会誌, 85, 518(1990)
- 2) 小浜恵子: 岩手工技セ研報, 2, 83 (1995)
- 3) Tetsuya Kato et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1166 (1992)
- 4) Maniatis, T. et al.: *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York(1982)
- 5) Sanger, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463 (1977)
- 6) Koido Y. et al.: *J. Bacteriol.*, 167, 110 (1986)
- 7) Takekawa S. et al.: *J. Bacteriol.*, 173, 6820 (1991)
- 8) 村尾澤夫: 日本農芸化学会誌, 65, 56. (1991)
- 9) Sastry K. J. et al.: *J. Bacteriol.*, 153, 511 (1983)
- 10) Yamagata Y. and Ichishima E.: *Curr. Microbiol.*, 30, 357(1995)