

Bacillus subtilis Kinemaからの 細胞外セリンプロテアーゼの精製

小 浜 恵 子*、山 本 忠**

Purification of Extracellular Serine Proteinase from *Bacillus subtilis* Kinema

KOHAMA Keiko*, YAMAMOTO Tadashi**

An extracellular serine proteinase was purified from *Bacillus subtilis* Kinema. Molecular weight of the enzyme was about 30,000, and the activity was inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride. The sequence for the first 12 amino acids was AQSVPYGISQIK. It was identical to subtilisin NAT, subtilisin E and subtilisin amylosacchariticus respectively.

Keyword : *Bacillus subtilis*, Extracellular 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の大豆の栄養価を高めたすぐれた発酵食品である。最近では、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注目を浴びた⁽¹⁾。業者では独自にナットウキナーゼ高含量をうたった製品を開発販売しているが、その多くは製造法に工夫をこらしたと思われるものが多く、納豆菌自体がナットウキナーゼを高生産するものは少ないとの報告もある⁽²⁾。また、市販の納豆に使用されている納豆菌 (*Bacillus natto*) は頒布業者が限定されており、各社の製品中に含まれるナットウキナーゼは同一のものである。

我々は、ネパールで製造されている発酵大豆食品であるキネマより単離された *Bacillus subtilis* Kinema (東北大より分譲) より新たな細胞外プロテアーゼ (ナットウキナーゼ) を探索・精製し、そこから得られる情報を利用した新規の製品開発を目的として研究に着手した。

2 研究方法

2-1 プロテアーゼ活性測定法

プロテアーゼ活性はカゼインを基質として遊離する Tyr を定量する Anson らの方法を改良した一島らの方法⁽³⁾により測定した。

2-2 タンパク質の測定

タンパク量は Bradford の方法⁽⁴⁾により、BSA を標準として 595nm の吸収を測定して求めた。

2-3 *Bacillus subtilis* Kinema の生産する細胞外プロテアーゼ精製法

Bacillus subtilis Kinema を LB 培地 (ポリペプトン 10 g、酵母エキス 5 g、NaCl₂ 5 g、Distilled water 1 l) に植菌して 37℃、24 時間培養し、4℃、12,300×g、20 分間遠心して菌体を分離した。培養上清に硫酸飽和 85% となるように添加し、12,300×g、20 分間遠心分離して沈殿物を集めた。沈殿物は 2 mM 酢酸カルシウムを含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、同緩衝液に透析した。10 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した MonoQ カラム HR5/5 にアプライし、非吸着画分を集めた。集めた画分を酢酸緩衝液 (pH 5.0) に透析し、同緩衝液で平衡化した MonoS カラム HR5/5 にアプライして非吸着画分を溶出後、0.1 M NaCl を含む同緩衝液で溶出し、活性画分を分取した。

2-4 SDS ポリアクリルアミド電気泳動

電気泳動は Laemmli の方法⁽⁵⁾により行った。グラジエントゲル 10-20% を使い、クマシーブリリアントブルーにより染色して検出した。

現在 * 岩手県工業技術センター 応用生物部 岩手県盛岡市飯岡新田 3-35-2

** 岩手県工業技術センター 企画情報部 岩手県盛岡市飯岡新田 3-35-2

2-5 N末アミノ酸配列の決定

精製された細胞外セリンプロテアーゼのN末端アミノ酸の配列は Applied Biosystems 社のプロテインシーケンサー473により決定した。

3 結果及び考察

2-2に示した精製法により得られた活性画分をSDSポリアクリルアミド電気泳動により、泳動した結果をFig. 1に示した。単一のバンドとして検出され、分子量約30,000であった (subtilisin kinema)。既に精製、クローニングされている *Bacillus natto* のセリンプロテアーゼ (ナットウキナーゼ) subtilisin NAT⁽⁶⁾と同様である。また、精製された酵素の活性は、セリンプロテアーゼ阻害剤である phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 10mM存在下で完全に阻害された。得られた精製酵素の比活性は、Tyr 1 mol/mg protein · secを 1 Katとしたとき 40nKatであった。 *Bacillus subtilis* Kinemaからは、今回精製したsubtilisin kinemaの他に90kDaの分子量で等電点が3.9である細胞外セリンプロテアーゼが精製され、Bacillopeptidase Fと相同性が高いこと、等電点がこのように低いセリンプロテアーゼは例がないことが報告されている⁽⁷⁾。いわゆるナットウキナーゼと呼ばれている今回精製した細胞外酵素の基質特異性、フィブリン塊 (血栓) 溶解活性等の生理活性については今後検討する。

Fig. 2には今回精製した酵素のN末端配列を解析した結果を示した。比較として *Bacillus natto* の生産するsubtilisin NAT、及び既に報告されている各種 *Bacillus* 属の生産する細胞外セリンプロテアーゼ subtilisin E^{(8),(9)}、subtilisin amylosacchariticus⁽¹⁰⁾、subtilisin BPN⁽¹¹⁾、subtilisin Carlsberg⁽¹²⁾を示した。Fig. 2に示した通り、subtilisin NAT等のプロセッシングを受けた後、細胞外に分泌された酵素の最初の12残基と全く同一であった。これらの酵素はsubtilisinファミリーに属するものであるが基質特異性、免疫的同一性などに差異が見られることより、特性解析が今後の課題である。

4 要約

Bacillus subtilis Kinemaの生産する細胞外セリンプロテアーゼ (ナットウキナーゼ) をイオン交換クロマトグラフィーによって単一に精製した。精製した酵素のN末端12残基は *Bacillus natto* の生産するsubtilisin NATと全く同一であった。精製した酵素の特性、生理活性について現在検討している。

キーワード: 枯草菌 細胞外セリンプロテアーゼ

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。

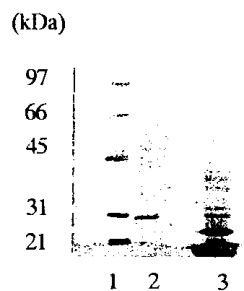


Fig. 1 SDS-PAGE of Purified Serine proteinase from Kinema.

Lane 1 : marker, Lane 2 : purified protein, Lane 3 : supernatant of Kinema cultivated broth.

	1	10
Subtilisin Kinema	<u>A</u> QSV <u>P</u> Y <u>G</u> ISQIK	
Subtilisin NAT	<u>A</u> QSV <u>P</u> Y <u>G</u> ISQIK	
Subtilisin E	<u>A</u> QSV <u>P</u> Y <u>G</u> ISQIK	
Amylosaccharitics	<u>A</u> QSV <u>P</u> Y <u>G</u> ISQIK	
Subtilisin BPN	<u>A</u> QSV <u>P</u> Y <u>G</u> VSQIK	
Subtilisin Carlsberg	<u>A</u> QTV <u>P</u> Y <u>G</u> IPQIK	

Fig. 2 Amino Acid Sequences of a Serine Proteinase from Kinema and Related Bacterial Serine Proteinases.

参考文献

- (1) 須見洋行: 醸造協会誌, **85**, 518 (1990)
- (2) 木内 幹, 鈴木英也: 食品と科学, **33**, 85 (1991)
- (3) E. Ichishima, Y. Takeda, K. Taira, and M. Takeuchi: *Biochim. Biophys. Acta.* **869**, 178 (1986)
- (4) M. Bradford: *Annal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)
- (5) V. K. Laemmli: *Nature*, **227**, 680 (1970)
- (6) T. Nakamura, Y. Yamagata, and E. Ichishima: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1869 (1992)
- (7) T. Kato, Y. Yamagata, and E. Ichishima: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1166 (1992)
- (8) M. L. Stahl and E. Ferrari: *J. Bacteriol.*, **158**, 411 (1984)
- (9) S. L. Wong, C. W. Price, D. S. Goldfarb, and R. H. Doi: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1184 (1984)
- (10) T. Yoshimoto, H. Oyama, T. Honda, H. Tone, T. Takeshita, T. Kamiyama, and D. Tsuru: *J. Biochem.*, **103**, 1060 (1988)
- (11) N. Vsantha, L. D. Thompson, C. Rhodes, C. Banner, J. Nagle, and D. Filpula: *J. Bacteriol.*, **159**, 811 (1984)
- (12) M. Jacobs, M. Eliasson, M. Uhlen, and J.-I. Flock: *Nucl. Acid. Res.*, **13**, 8913 (1985)