

好塩性プロテアーゼの実用化研究

: オートリシス制御と塩特異性

石橋松二郎

鹿児島大学 農学部 応用分子微生物学研究室

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24

e-mail: k6038120@kadai.jp

要旨

好塩性細菌が生産する好塩性酵素は、塩に強い事はもちろん可溶性が高く凝集しにくいので、通常酵素が変性して活性を失ってしまう様々な過酷な条件下でも可逆的に活性を回復する産業利用に適した優れた性質を持っている。最近我々は塩に強い好塩性プロテアーゼを分離した。現在まで好塩性プロテアーゼは市販されておらず、食品加工、塩蔵食品製造、廃棄物処理などの産業利用に有望である。本プロテアーゼの生産効率、安定化・活性化の塩特異性、自己消化反応と影響因子、本プロテアーゼと相互作用可能な分子の検索など実用化への基盤的研究を行った。

1. 緒言

鹿児島県は温暖な気候に恵まれ、農畜水産業を中心に日本有数の食料生産基地である。また鹿児島県は南北 600 Km に及び海に囲まれ、海洋資源の有効活用は産業振興における重要な分野である。

海水・塩田など高い塩分濃度環境を好んで生息する好塩性菌は特殊環境微生物の一種であり、好塩性菌が生産する「好塩性蛋白質」は、高濃度塩存在下において高い活性や安定性を示すのみならず、一般に熱や変性剤などの様々な変性作用にも耐性あるいは可逆的な活性回復を示すものが多く、産業利用に適した蛋白質と考えられる^(1,2)。プロテアーゼは最も産業利用が進んでいる酵素の一つであり、*Bacillus* 属細菌が生産するセリンプロテアーゼ・サチライシンや *Bacillus thermoproteolyticus* 由来の金属プロテアーゼ・サーモリシンは最も良く研究されているプロテアーゼである⁽³⁾。

本研究室ではサーモリシンと相同性があり、塩に強い性質をもつプロテアーゼを好塩菌から分離し、その大量調製や性質検討を行ってきた^(4,5)。今年度は、実用化に向けてさらに詳細を検討した。

2. 実験

2. 1 菌株と培地および遺伝子分離

好塩性海洋細菌 *Chromohalobacter salexigens* を使用した。培地は、1M NaCl を含む Nutrient Broth 培地を用いた。好塩性サリリシン遺伝子をデータベース情報を基にして分離し、pET3a、pET15b、pET20b の 3 種類の発現ベクター (Novagen) にクローニングして、大腸菌 BL21(DE3)株もしくは BL21star(DE3)株で大量発現させた。

2. 2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法およびアガロースゲル電気泳動法

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、Laemmli の方法で行った⁽⁶⁾。アガロースゲル電気泳動は、3.5%アガロース (アガロース 01163, ナカライテスク) 水平型平板ゲルを用い、泳動バッファーには 25 mM Tris/192 mM glycine (pH 8.4)/0.1% SDS を用いた。50 V の定電圧で 1 – 2 時間、室温で泳動した。泳動装置はミューピッドを用いた。分子量マーカーとしては、SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, Bio-Rad 161-0304 と Precision Plus Protein Unstained Protein Standards, Bio-Rad #1610363 の 2 種類を用いた。

3. 結果と考察

一般的にプロテアーゼは周りにある重要なタンパク質を非特異的に分解してしまうことを回避し、働くべき特定の場所・特定の時期に働くために最初は不活性な前駆体の形で生合成され、その後活性型に成熟化・プロセッシングされる。本研究における好塩性プロテアーゼ・サリリシンも最初は不活性な前駆体で生合成され、その後プロセッシングされ成熟型に活性化される。すなわち、Fig. 1 に一次構造を示した全長 348 アミノ酸残基からなるプロテアーゼ・サリリシンの遺伝子を海洋性好塩性細菌から分離することに成功し、大腸菌における発現系を構築して、そのプロセッシング・活性化の過程を明らかにしたところ、本プロテアーゼは、Fig. 2-1 に示したように、まずは細胞内において全長の前駆体 Pro-form (1)で生合成され、その後 TP (transient peptide)-1 (2), TP-2 (3)という二つの中間体を経て、最終的な成熟型の Mat-form (4)にプロセッシングされることが明らかになった。

```
1 MASSRRATFS GFMPPHVLDL IAVQGTERQR RCAQQTLQAD QWFLRLASPP PARDAARAVA
61 GRPDRRIHSA DHEQTLPGRL VREGQAAHG DAAVDEAYEW LGATYRFYWE VFGRDSIDDR
121 GMPLIGTVHY GRDYDNAFWN GAQMVFGDGD GDLFRRFTAA PEVVAHELTH GVIERDVGLV
181 YAGQSGALNE SLADVFGVVV KQYHAGQTAQ EADWLIGAAL LTDRVQGRAL RSMEAPGTAY
241 DDPVLGRDPQ PGHMRDFVDT QADNGGVHIN SGIPNRAFYL AAVALEAPAW ESVAPVWYAA
301 MRDDALSRES DFAAFAALTV AHARRQHGEQ SREARAVDDA WREVGVS
```

Fig. 1. Primary sequence of protease.
Closed circle shows active site residue.

3. 1. サリリシンの大腸菌での発現

サリリシン遺伝子を分離し、大腸菌発現ベクターにクローニングし、タンパク質の発現を試みた。Fig. 2-2 (A)に示したように大腸菌発現ベクターpET20b にサリリシン遺伝子をクローニングした。これを大腸菌で発現させると C-末端に His x 6-tag が付加したサリリシンが生産され、大腸菌細胞内ではすでに N 末端が 11 アミノ酸残基短くなった中間体 TP1-form で発現されることが判明した。この中間体 TP-1 は、オートリシス活性を持っているため、*in vitro* で徐々に TP-2-form、さらに Mat-form (M-form,成熟型) にプロセッシングされた。発現したタンパク質を SDS-PAGE で分析した結果を Fig. 2-2 (C)に示した。レーン 4 の 43 kDa 近辺に可溶性の新しいバンド TP1-His が検出された。レーン 5 は不溶性画分であるが、C-末端に His-tag が付加した全長サリリシンが検出されている。次に、サリリシン遺伝子を大腸菌発現ベクターpET15b にクローニングして大腸菌で発現させた (Fig. 2-2 (B))。この場合も TP1-form で発現されるため、N-末端 His-tag

も切断除去され、tag が付加しない TP1-form が発現された (Fig. 2-2 (C) レーン 6)。レーン 7 は不溶性画分であるが、N-末端に His-tag が付加した全長サリシンが検出されている。TP1-form はオートリシス活性を持ち、TP2 を経て Mat-form にプロセッシングされる (Fig. 2-2 (C) レーン 8, M バンド)。

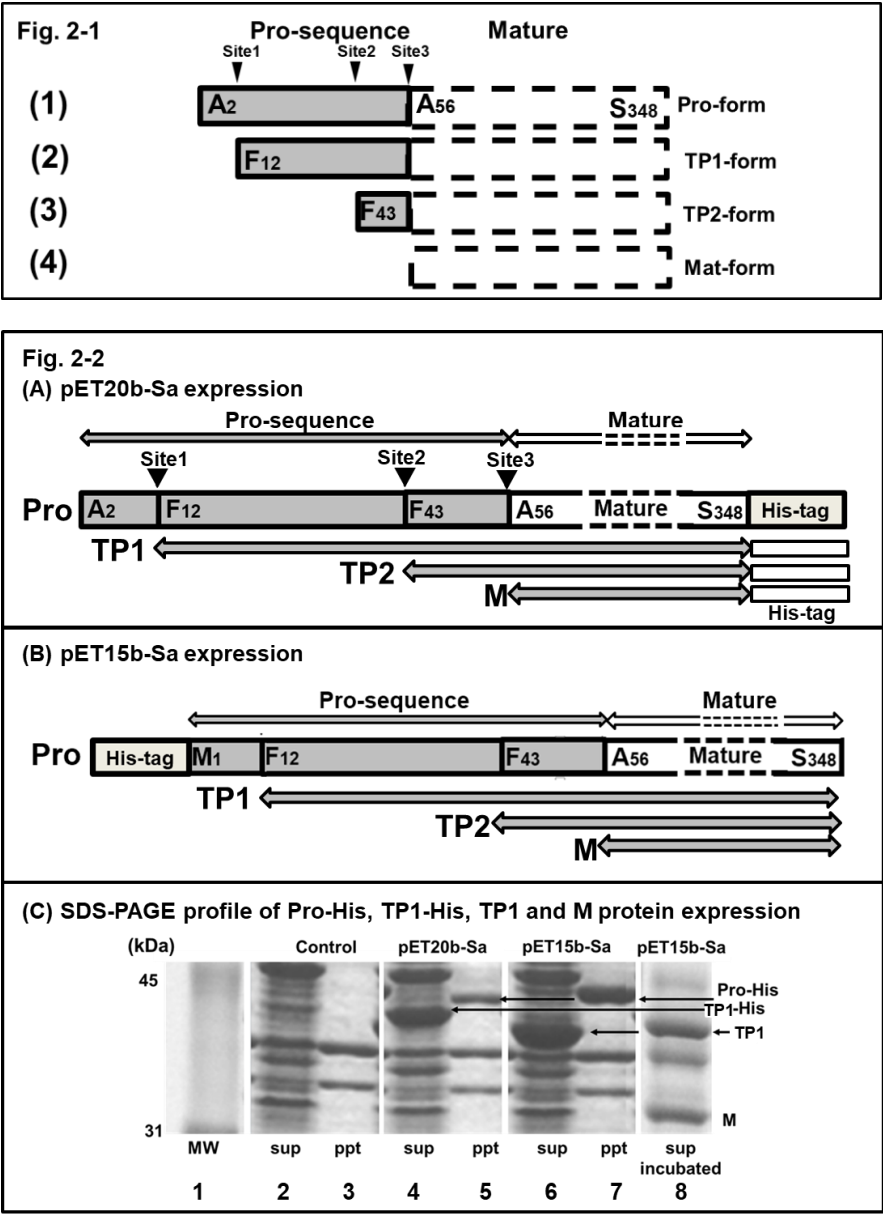


Fig. 2. Schematic structures of processing and expressions in *Escherichai coli*.

Fig. 2-1. Processing of pro-form to mature form. Fig. 2-2. Recombinant protease expressed in *Escherichia coli* with His-tag.

3. 2. 各種塩の効果

通常生物の酵素は、一般的に高濃度塩存在下ではその酵素活性は阻害されるが、好塩性生物から分離された好塩性酵素は高濃度塩存在下でも良く働き、サンケイ科学振興財団 2021 年度研究報告書に記載したとおり、サリリシンはより高濃度の食塩存在下においてより高い活性を示した。また、中間体 TP-1 から成熟型 Mat-form へのプロセッシング速度も 2 M 食塩存在下で大幅に促進され、好塩性酵素の特徴が顕著に示された。今回、この好塩性酵素の最大の特徴—塩の効果—について、さらに詳細に検討した。

高濃度の塩は、溶液中でタンパク質の構造や機能に様々な影響を及ぼすが、それらは荷電の遮蔽、塩析効果や塩入効果によるタンパク質の構造変化など、高濃度塩のタンパク質分子に対する低親和性相互作用による効果である。タンパク質が持つ荷電の周りに逆荷電を持った塩イオンが群がることで、タンパク質構造中の同種荷電間の反発を抑える効果は汎用される緩衝液に含まれる程度の濃度の塩で起こる良く知られた塩の効果である。好塩性タンパク質はマイナス荷電を持った酸性アミノ酸残基の数が非好塩性タンパク質のホモログに比べてかなり多いことが知られている酸性タンパク質である。このため酸性アミノ酸どうしの反発が強く、タンパク質の構造が緩む力が働くので、この塩による遮蔽効果は安定性に重要であり、好塩性酵素が塩を加えることによって安定化される一つの要因とされている。一方、塩には塩の種類に特異的で、タンパク質には非特異的な効果が知られており、Hofmeister 効果と呼ばれている。MgCl₂ のようなある種の塩は salting-in salt（塩入塩）と呼ばれ、タンパク質の構造を不安定化させる効果がある。また(NH₄)₂SO₄ のようなある種の塩は salting-out salt（塩析塩）と呼ばれ、タンパク質構造を安定化させる効果がある。またこれら両者に属さない中間的な塩も存在する。高濃度の塩の効果が検出される場合はこれらの効果で説明できる場合が多い。

そこで TP-1 のプロセッシングに対する各種塩添加の効果を見るために、まず TP-1 タンパク質を Ni-NTA カラムを用いて精製した。すなわち、大腸菌に Pro-form-His サリリシン遺伝子を導入し、C-末端に His-tag を付加したサリリシンを発現させた。大腸菌を集菌後、超音波で菌体を破碎し、遠心分離によってその上澄み画分を回収した (Fig. 3, S)。矢印で示したところにサリリシン TP-1 が発現している。これを Ni-NTA カラムに掛け、カラムを洗浄後 250 mM イミダゾール溶液でカラムに結合したサリリシン TP-1 form を溶出した (Fig. 3, Elution)。(注：今回は、TP-1 form より移動度が小さいタンパク質バンドが少量同時に溶出され、これは C-末端に His-tag を持った Pro-form-His タンパク質が大腸菌内で完全に切断されずに少量残存したものと思われた。)

この精製 TP-1 標品を用いて、TP-1 から成熟型 (Mat-form) へのプロセッシングを観察し、様々な塩を添加して、そのプロセッシング速度に対する影響を *in vitro* で調べた。Fig. 4 にその結果を示した。2 M 食塩の添加でプロセッシングが促進されることは前回報告したので、今回は食塩や塩析塩、塩入塩など様々な塩の添加効果を調べた。TP-1 にそれぞれ終濃度 1 M の塩を添加し、25°C、16 時間インキュベーション後、SDS-ゲル電気泳

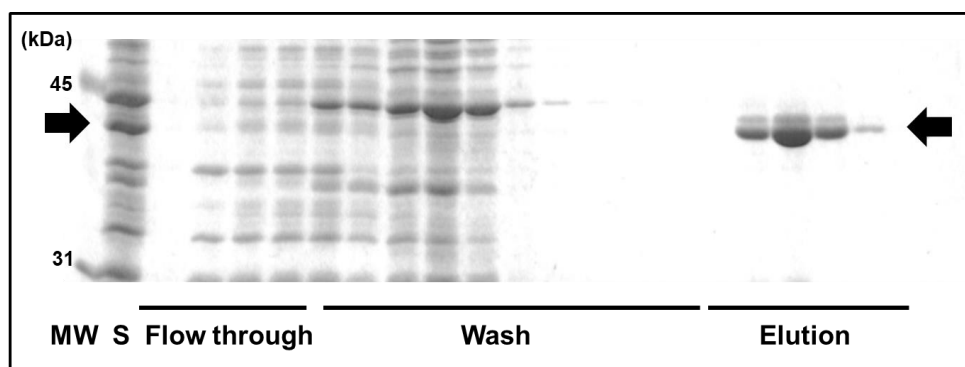


Fig. 3. Purification of TP-1 with Ni-NTA column.

動に掛け、TP-1 から Mat-form へのプロセッシングを観察した (Fig. 4 upper)。塩無添加のコントロールをレーン 1 に示したが、ごく少量の TP-2, Mat-form が検出されたが大半が TP-1 のまま残存しており、プロセッシング速度が遅い事が判明した。これに対して塩を添加した場合、NaCl (レーン 2) もしくは NH₄Cl (レーン 4) 添加では大幅にプロセッシングが進んでおり、塩添加によるプロセッシング促進効果が明瞭に示された。さらに MgCl₂, (NH₄)₂SO₄, Na₂SO₄, MgSO₄ の添加では、すべての TP-1 分子が Mat-form にプロセッシングされ、極めて高い促進効果が認められた。NaCl、NH₄Cl は弱い塩析塩と分類される。MgCl₂ は塩入塩でありタンパク質の構造を緩める効果があるのでプロセッシング速度は減少するかと思われたがそうではなく、この結果からプロセッシングの促進効果は塩析効果によるタンパク質の構造安定化効果だけではなく、Mg イオンの結合も重要な因子であることが分かった。その他の (NH₄)₂SO₄, Na₂SO₄, MgSO₄ は、いずれも強力な塩析塩であり、その添加効果は明白で塩によるタンパク質構造の強力な安定化効果が明らかである。次に塩濃度を 0.1 M に下げた場合の結果を Fig. 4 lower に示した。塩析効果は高濃度塩によって発揮されるものであり、0.1 M という低濃度ではほとんど効果がない条件である。その結果 Fig. 4 lower に示したとおり MgCl₂、MgSO₄ 以外の塩添加後のプロ

セシング速度は塩無添加のコントロール（レーン 2）とほとんど変わらず促進効果は認められない。一方、 MgCl_2 、 MgSO_4 の添加では強いプロセシング促進効果が認められ、塩析効果では説明できない Mg イオン特異的なイオン結合効果が示唆された。さらに塩濃度を 0.05 M にした結果も Fig. 4 lower に示したが、0.1 M と同様の結果となり、塩析効果ではない Mg イオンの結合効果が再度示された。

次に、サリリシンのプロセシング・成熟化を調べるにあたり、上記の TP1 form のオートリシス活性の測定法以外に、もう一つの測定法を用いた。すなわち、プロテアーゼ活性を持たない E167A 変異型サリリシンを大腸菌で発現させた。活性中心である Glu167 残基を Ala に変異させた不活性型サリリシンで、N 末端アミノ酸配列分析により N 末端は Ala2 残基と判明し、Pro 配列全長を持った不活性型 E167APro 型のサリリシンが発現された。このサリリシンは、活性型成熟サリリシン（Mat-form）を反応させると、正し

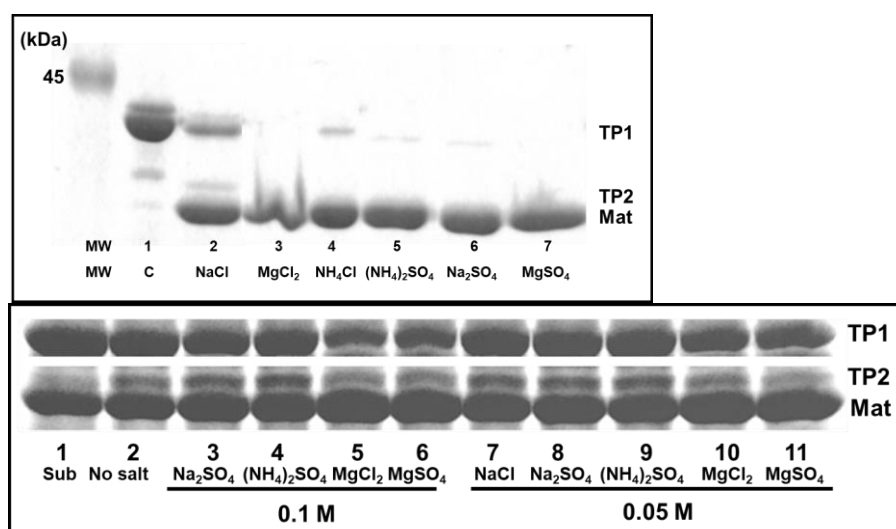
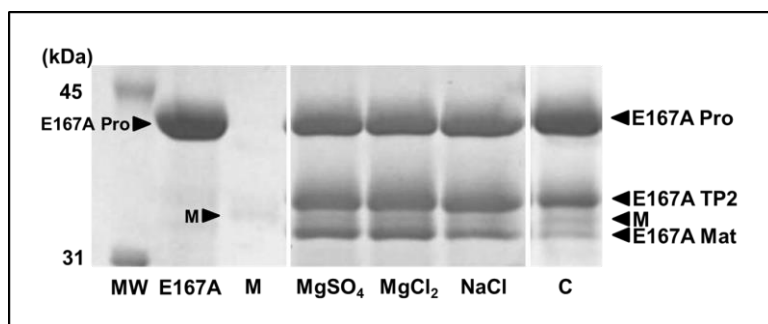


Fig. 4. Effects of various salts on *in vitro* processing of TP-1 to Mat-form.

Upper panel, effects of various salts at 1 M ; lower panel, effects of various salts at 0.1 and 0.05 M.

くプロセシングされ、E167A TP2 を経て、E167A Mat にプロセシングされた (Fig. 5, control, C)。このアッセイ系を用いて、低濃度（0.1 M）塩の添加効果を調べた。



Form	MgSO ₄	MgCl ₂	NaCl	Control
E167A-Pro	42.1	40.0	44.6	60.6
E167A-I2	38.6	41.3	42.4	32.4
E167A-M	19.3	18.7	13.0	6.9

Fig. 5. Processing of E167A Pro form to E167A Mat form in the presence of 0.1M salts (upper panel) and quantitative determination of band intensity (lower panel).

Fig. 5 のタンパク質バンドの濃さを Image J ソフトウェアで定量し、各レーンごとの存在量を%で表して下の表に示した。 塩無添加の場合、最終生産物である E167A Mat の量は 6.9%であり、未反応の E167A Pro が 60.6%を占めているのに対し、0.1 M NaCl を添加した場合には、E167A Mat の量は 13%と 1.9 倍に促進された。さらに MgCl₂、MgSO₄ の添加では、それぞれ 2.7 倍、2.8 倍に促進され、このアッセイ系でも MgCl₂、MgSO₄ の高い添加効果が明瞭に示された。

一方、TP1 はオートリシス活性を持っているので、保存中にプロセッシングが進んでしまう危険性を常にもっており、オートリシス反応を阻害する因子を明らかにできればより正確な観察が可能になると思われる。TP-1 タンパク質のオートリシス速度が使用する緩衝液に影響されるという予備的な結果を得ているので、今後詳細に検討したい。

3. 3. サリリシンの安定的な大量生産

大腸菌を用いてサリリシンを発現させると、N 末端が 11 アミノ酸残基短くなった TP1-form で発現された。 この中間体 TP1 は、オートリシス活性を持っているため、徐々に TP2-form、さらに Mat-form (成熟型) にプロセッシングされた。サリリシンを製品化するためには、自己分解を起こさない不活性な状態で保存し、必要な時に活性化して使用することがより望ましい。そこで今回はプロセッシングが起こっていない全長の Pro-form を取得することを試みた。上記のように活性中心に変異を導入した E167A-form の全長型の発現に成功しているが、これは失活型の全長前駆体なので、酵素活性の復活

は望めない。現在まで、野生型では上記のように大腸菌内ですでにプロテアーゼ活性を持ち中間体 TP1 として発現されるので、活性回復可能な不活性型の全長型前駆体 (Pro-form) の発現には何らかの工夫が必要である。

3. 3. 1. 野生型サリリシンの不活性型発現

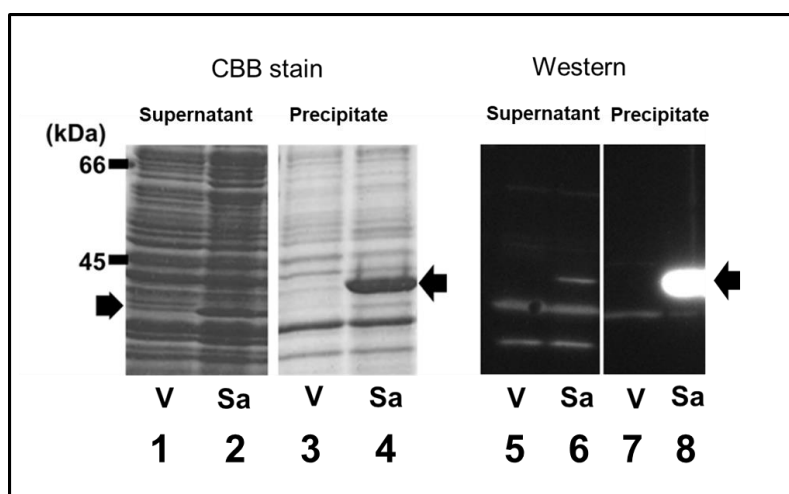


Fig. 6. Expression of whole His-Pro-form protease in insoluble fraction at 37 °C.

Crude lysate was fractionated to soluble supernatant and insoluble precipitate fractions. Vector only control (V) and pET15b-Sa (Sa) were shown. Western blotting was performed with anti-His-tag antibody.

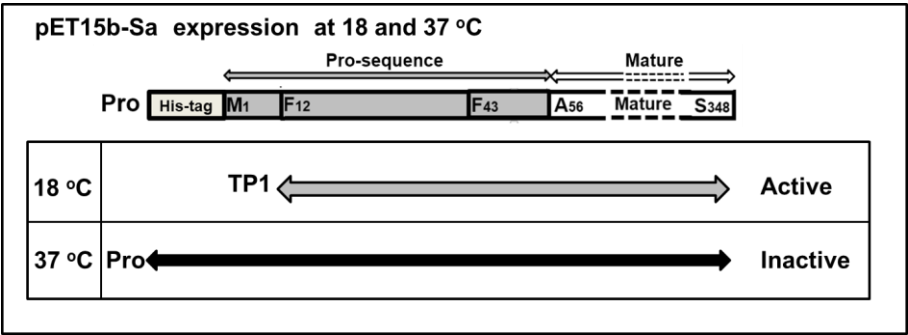


Fig. 7. Schematic structures of protease mainly expressed at different temperatures.

At 18 °C, active TP-1 was mainly expressed, while at 37 °C, inactive whole His-pro-form was expressed.

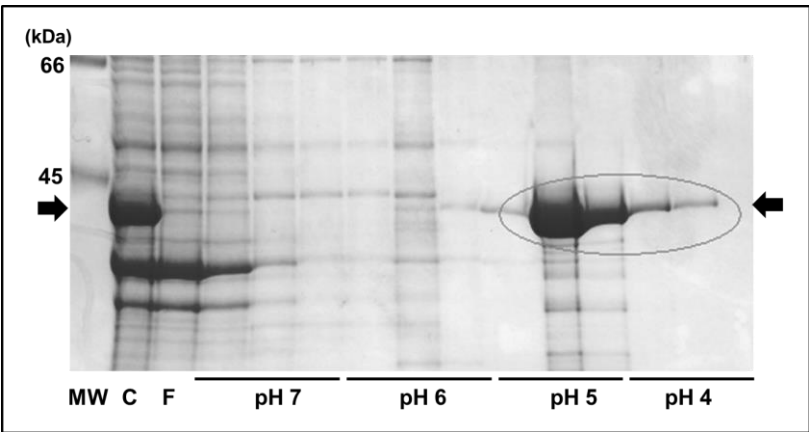


Fig. 8. Purification of His-Pro-form

Whole His-pro-form was eluted at pH 5 in the presence of 8 M urea.

菌体を超音波処理で破碎し、遠心後の沈殿画分を集めた。8 M 尿素を含む緩衝液を加えて不溶化したタンパク質を可溶化し、8 M 尿素を含む緩衝液で平衡化した Ni-NTA カラムに掛けた。His-tag を付加された His-Pro-form はカラムに吸着するので、8 M 尿素を含む緩衝液の pH を 7.0, 6.0, 5.0, 4.0 と段階的に下げて行き、目的蛋白質を溶出させた

(Fig. 8)。Fig. 8 に示したように全長 His-Pro-form は、pH 5.0 で溶出された（丸で囲んだ部分が精製された His-Pro-form）。

3. 3. 2. 可溶化された不活性野生型サリリシンの活性化

可溶化された野生型サリリシンは、尿素の添加で三次元構造を失っているため、酵素活性は示さない。このサンプルに何らかの方法で正しい三次元構造をとらせる活性化を試みた。予備的な実験として、尿素で可溶化した不活性野生型サリリシンを様々な pH の緩衝液に透析、もしくは希釈して、活性の巻き戻りを試みたが、今のところ成功しておらず、今後さらに、シクロアミロースのような化学シャペロンや、以下に述べる HSP100 タンパク質のような分子シャペロンを使って構造巻き戻し・活性化の検討が必要である。

3. 4. サリリシンと相互作用する可能性が考えられる因子について

3. 4. 1. サリリシンに対するタンパク質性阻害剤候補因子の検索

プロテアーゼ分子と特異的に結合して、その活性を特異的に阻害するタンパク質性阻害剤—トリプシン・インヒビター、ペプシン・インヒビター、サチライシン・インヒビターなど—の存在が広く知られている。サリリシンのホモログとして知られているプロテアライシンの研究において、最近プロテアライシンの阻害剤として働くエムフォーインタンパク質が報告された⁷⁾。エムフォーインをコードする遺伝子の発現は、プロテアライシンと同じプロモーターの下流にあり、協調的に発現制御されていると考えられている。この報告を基にして、サリリシンに対するエムフォーインホモログ遺伝子を検索したところ 116 アミノ酸からなるホモログ遺伝子をコードしていると考えられる候補遺伝子を確認した。プロテアライシン・エムフォーインタンパク質は NMR による構造解析が報告されて阻害機序が解析されているが、サリリシン・エムフォーイン候補タンパク質の構造を α Fold ソフトで予測したところ非常に似通った構造が導き出され、同様の機能を持っている可能性が強く示唆された。今後遺伝子クローニング等を検討したい。



Fig. 9. Structure of candidate protein estimated by alpha-Fold.

3. 4. 2. 変性凝集したタンパク質を巻き戻す分子シャペロン分子

細胞内でストレスによって変性したタンパク質は、分解もしくは再生されることによって細胞の恒常性が維持されている。この分解か再生かの分岐点においては、プロテアーゼや変性蛋白質に作用する様々な協働因子（分子シャペロン、阻害因子など）が働きその経路が選択されるが、細胞の生存にとっては分解よりも再生の方がタンパク質の利用の観点からは有利である。変性したタンパク質を ATP のエネルギーを使って巻き戻すタンパク質(分子シャペロン)の研究は細胞生物学、タンパク質化学の主要な課題として多くの研究がなされてきた。多くの分子シャペロンはいわゆる熱ショックタンパク質に属しているものが良く調べられていて、主要分子シャペロンとして HSP60, HSP70 そして HSP100 分子が良く知られている。HSP は Heat Shock Protein の略でそのあとの数字は分子量（HSP60 は約 60 kDa のタンパク質）に因んでいる。これらの中でも HSP100 分子シャペロンは変性して凝集してしまった標的タンパク質を HSP70 分子と共同して巻き戻すことができる因子として注目されている⁽⁸⁾。サリリシンの生理的役割は未だ明らかではないが、この強力なプロテアーゼの周りで分子シャペロンが機能している可能性は否定できない。今回、サリリシンの生理的役割を研究する一環として本好塩菌の主要分子シャペロンの一つ HSP100 分子の研究を開始した。本菌のゲノム情報を検索

（GenomeNet: <https://www.genome.jp/ja/>）し、HSP100 分子をコードする Csal_0499 遺伝子を見つけた。860 個のアミノ酸残基からなる分子量 94,729 のタンパク質である。

本菌ゲノム DNA から本遺伝子を PCR 法で増幅し、大腸菌発現ベクター pET15b にクローニングした。大腸菌 BL21(DE3)に導入し、N-末端に His x6-tag を付加した HSP100 タンパク質を発現させた。発現菌体を集め、超音波処理で破碎後、遠心分離により粗抽出液を得た。これを IMAC (Immobilized metal ion affinity column chromatography)に通して、His-HSP100 タンパク質を分離・精製した。精製標品の SDS-PAGE 像を Fig. 10, lane 4 に示した。遺伝子配列から計算した tag を付加した分子量は 96,890 であり、推定通りの大きさのタンパク質バンドが検出されている。真核生物や大腸菌などの既報の HSP100 は、ドーナツ型の 6 量体を形成し、この構造が変性タンパク質の凝集をほどこき正常な構造に巻き戻らせるために必須であると考えられている。そこで化学架橋剤グルタルアルデヒド (GA) で架橋し、本好塩菌由来の HSP100 タンパク質のサブユニット構造を検討した。HSP100 を 40 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) buffer, pH7.4, 0.15 M KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM ATP 緩衝液に溶かし、0.1% GA を加えて、25℃で30分間架橋反応させた。反応後 7.5% SDS-PAGE にかけたところ、タンパク質は電気泳動ゲルのトップにとどまり、泳動されなかった (Fig. 10A, lane 3, 矢印)。これは 7.5% SDS-PAGE のゲル網目の大きさに侵入できない大きな分子が生成されていることを示唆している。そこで取り扱える最も低アクリルアミドゲル濃度 5.5% の SDS-PAGE で分析した。今回は、0.2, 0.1, 0.05, 0.01% (lanes 2-5)と GA の濃度を変化させ

で架橋した。Fig. 10B, lane 2-4 に示したように、0.2~0.05%の GA で架橋した場合には、濃縮ゲル(5.0%)に少し侵入した位置にバンドが検出されたが、この状態でも泳動距離は最少レベルであり、満足な分析ができているとは言えない状態であった。さらに架橋効率を落として、0.01%GA で架橋したところ、弱いバンドが6本検出された(lane 5)。これらのバンドは、低濃度の GA により部分的に架橋されたサブユニット構造を表していると考えられ、それぞれ6量体~1量体と解釈できた。この結果から、本好塩菌の HSP100 分子も他の生物由来のものと同様6量体を形成していることが強く示唆された。Lane 1 は、非架橋の HSP100 サンプルで1量体 97kD の大きさを示している。

HSP100 タンパク質の6量体は約 600 kDa の大きさであり、アクリルアミドゲル分析には大きすぎて、Fig. 10 のようにほとんどゲル内で移動せずきれいな分離は不可能なことが判明した。

そこでより大きな分子に対しても分子ふるい効果を持つと考えられるアガロースゲルをアクリルアミドゲルに代わって使用することを考えた。Fig. 11 は、SDS-3.5%アガロースゲル電気泳動図である。レーン1と2は、分子量マーカであり、14~250 kDa のスタンダードタンパク質がきれいに分離している。レーン3は0.1%GA で化学架橋した HSP100 タンパク質を流したもので、Fig. 10A, レーン3、Fig. 10B、レーン3に比べて6量体はゲル全長の1/3程度まで泳動されていて良好な分離を示している。最も濃い明快なバンド(●)が6量体であり、その上部に薄いバンドが検出され、6量体の2量体(12mer)の可能性が示唆される。分子シャペロンは様々な分子と相互作用しやすい性質を持っているので、6量体が相互作用して12量体が存在する可能性が考えられる。

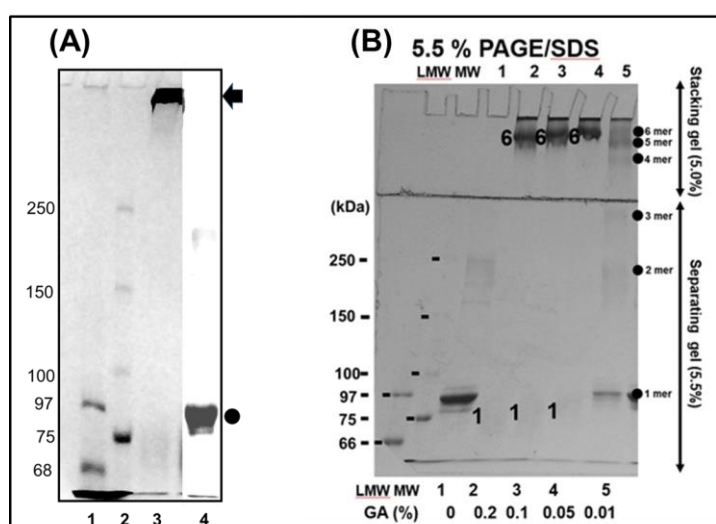


Fig. 10. SDS-PAGE analysis of HSP100 chemically cross-linked with glutaraldehyde.

(A) 7.5% polyacrylamide gel. (B) 5.5% polyacrylamide gel.

レーン 4 は HSP100 タンパク質の濃度を 3 倍高くして、同条件で化学架橋をした結果であるが、より明確な 6 量体バンドに加えて、6 量体の 2 量体、6 量体の 3 量体、さらに 6 量体の 4 量体と思われるバンドも検出されている。今後は、電気泳動だけでなく、超遠心分析、質量分析、光散乱分析など分子量を測定する機器分析を用いた詳細な分析が必要と思われる。レーン 5, 6 はそれぞれ、0.01% と 0% (control) GA で架橋したサンプルを示している。

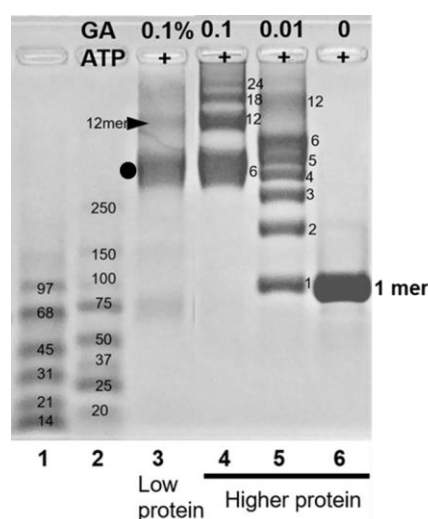


Fig. 11. SDS-Agarose gel electrophoresis of chemically cross-linked HSP100.

4. 結論と今後の課題

好塩性細菌から好塩性プロテアーゼ・サリリシン遺伝子を分離し、大腸菌で発現精製して、安定化・活性化の塩特異性、自己消化反応の塩による促進と影響因子、相互作用可能な阻害タンパク質や巻き戻しに必要な分子シャペロンなどについて検討した。プロテアーゼは自己分解作用を持っているので、安定的な供給のためには不活性な形で生産し、使用する直前に簡単な操作で活性化することができれば理想的である。簡単に活性化できる安定な製品を大量に生産する方法が当面の課題と考えられる。好塩性タンパク質は可溶性が高く、高温や溶媒条件などの様々な変性ストレスでいったん変性してもまた活性を回復することができる柔軟な性質が特徴であり、この有利な特徴を生かした産業利用を推し進めたいと考えている。

5. 謝辞

本研究を実施するにあたり、公益財団法人サンケイ科学振興財団より研究助成をいただきました。本研究を実施できたのは、この貴重なご援助の賜物であり心から感謝申し上げます。また研究室の多くの皆様のご協力をいただきました。心からお礼申し上げます。

6. 引用文献

- (1) Arakawa T, Yamaguchi R, Tokunaga H, Tokunaga M. Unique Features of Halophilic Proteins. *Curr Protein Pept Sci.* (2017)18, 65-71.
- (2) 徳永正雄, 徳永廣子, 石橋松二郎, 荒川 力, 好塩性酵素：マイナス荷電が決める好塩性. *生化学*, (2000) 第81巻, 401-406.
- (3) Inouye K, Kusano M, Hashida Y, Minoda M, Yasukawa K. Engineering, expression, purification, and production of recombinant thermolysin, *Biotechnol Annu Rev.* (2007) 13, 43-64.
- (4) Tanaka R, Yamasaki S, Ishibashi M, Tokunaga H, Arakawa T, Tokunaga M. Salt-enhanced processing, proteolytic activity and stability of halophilic thermolysin-like proteinase, salilysin, isolated from a moderate halophile, *Chromohalobacter salexigens* DSM3043. *Int. J. Biol. Macromol.* (2020) 164, 77-86.
- (5) Ishibashi M, Tanaka R, Yamasaki S, Tokunaga H, Arakawa T, Tokunaga M. Salt Mediated Modulation of Autolysis of Thermolysin-Like Proteinase, Salilysin, Isolated from a Moderate Halophile, *Chromohalobacter salexigens* DSM3043. *Protein J.* (2021) 40, 223-233.
- (6) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, (1970) 227, 680–685.
- (7) Chukhontseva KN, Berdyshev IM, Safina DR, Karaseva MA, Bozin TN, Salnikov VV, Konarev PV, Volkov VV, Grishin AV, Kozlovskiy VI, Kostrov SV, Demidyuk IV. The protealysin operon encodes emfourin, a prototype of a novel family of protein metalloprotease inhibitors. *Int J Biol Macromol.* (2021) 169, 583-596.
- (8) A. Mogk, E. Kummer and B. Bukau, Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation, *Front. Mol. Biosci.*(2015) 2, 22

Study of halophilic protease for potential industrial application
: effects of salts on autolysis

Matsujiro Ishibashi

Applied and Molecular Microbiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University
1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan
e-mail: k6038120@kadai.jp

Salt-enhancing or salt-tolerant proteases are desired for salty-food industry (soy sauce, soybean paste etc.), food processing, and possible waste treatment processes under salty conditions to prohibit spoilage. We have isolated a gene encoding halophilic thermolysin-like protease from moderate halophile and succeeded in cloning, expression, purification and characterization of this halophilic protease. We reported production, salt effects on processing and maturation, and possible inhibitory effects on autolysis of the protease. Autolytic processing of this protease *in vitro* was enhanced with the addition of salts in parallel to valency and salting-out effects. Mg salts showed the highest efficiency in enhancing autolysis to mature form, suggesting importance of Mg ion binding. We also reported proteins which might interact with this protease.