

# 塩に強い好塩性プロテアーゼの 化学的・生理的特徴とその産業利用

徳永正雄

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: tokunaga@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

## 要旨

現在までに食品製造に用いられる蛋白質分解酵素（プロテアーゼ）は数多く知られているが、いずれも高濃度食塩存在下ではその活性が阻害され、食品製造などに必要な「塩に強い好塩性のプロテアーゼ」は未だ市販されていない。塩に強い好塩性プロテアーゼは、みそ・醤油・魚醤などの塩蔵食品、肉・魚など食品類の製造加工、さらに廃棄物処理や再利用など調味と共に腐敗を防止する食塩存在下での産業利用に有望と考えられる。多くの通常細菌が生息できない特殊環境で生き抜く極限能力を持った「極限環境生物」の一種である好塩性海洋細菌は、高濃度塩存在下で生育できる特殊能力を持っているので、塩に強い酵素を生産することが知られている。本研究では、好塩菌のゲノム情報を利用して分離したプロテアーゼ遺伝子を用いて、各種発現ベクターを構築して発現条件を検討し、発現した蛋白質の性質を検討した。

## 1. 緒言

温暖な気候の鹿児島県は、農畜産業を中心に日本有数の食料生産基地である。また南北 600 Km に及び海に囲まれ、豊かな漁業・海洋資源の宝庫である。日本の国土は小さいが、その領海・排他的経済水域は世界第 6 位の広さを誇っており、海洋資源の有効活用は重要な課題である。好塩性菌は海水・塩湖・塩田など高い塩分濃度に適応している極限環境微生物の一種であり、好塩性菌が作る「好塩性蛋白質」は、高濃度塩に対して強い性質を持ち、また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、その産業利用が期待されている<sup>(1,2)</sup>。プロテアーゼは最も産業利用が進んでいる酵素であり、中でも *Bacillus thermoproteolyticus* 由来のサーモリシンや、*Bacillus* 属細菌が生産するサチライシンは最も良く研究されているプロテアーゼである<sup>(3)</sup>。本年度は、産業的に最も利用が進んでいる酵素の一つである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 プロテアーゼの活性測定

プロテアーゼ活性測定には 1.2 ml の反応系を用い、1 % カゼイン、50 mM リン酸緩衝液 pH7.5 と酵素を加えて 37°C で 30 分反応させた。0.12 ml の 100 % トリクロロ酢酸 (TCA) を加えて反応を停止させるとともに未消化の基質を変性沈殿させた。遠心後、上澄の A<sub>280</sub> を測定して活性とした。

アゾカゼインを基質として用いた場合は、0.3 ml の反応系に 1 % アゾカゼイン、50 mM リン酸緩衝液 pH7.5 と酵素を加えて 37°C で 30 分反応させた。0.4 ml の 10 % TCA を加えて反応を停止し、遠心後 0.5 ml の上澄に 0.1 ml の 5 M NaOH を加えて、A<sub>450</sub> を測定し活性とした。

好塩性酵素の特徴は、高濃度の塩存在下で活性や安定性が促進される事であるが、カ

ゼインやアゾカゼインは高濃度塩存在下では、不溶性となり正確に酵素活性を測定できないと考えられた。そこで、新たな蛋白質基質として、高濃度塩存在下でも非常に良く溶解する我々が研究してきた好塩性蛋白質「金属結合性蛋白質 (HP)」を反応基質として用いることにした。まず消化を良くするために、基質 HP を 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 pH7.5、5 mM 塩化カルシウム、0.1 % SDS 存在下で 95°C で 5 分間変性させた。40  $\mu$ l の反応系に基質として 20  $\mu$ g の HP、50 mM トリス-塩酸緩衝液 pH7.5、0-3.2 M NaCl を加えて 37°C で 1-3 時間反応させた。終濃度 10 % になるように TCA を加えて反応を停止させ、沈殿を集めて中和後 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にかけて分析した。

### 2. 3. N-末端アミノ酸配列分析

蛋白質の N-末端アミノ酸配列分析は、プロテインシークエンサー (ProCise, Applied Biosystems) を用いて行った。蛋白質試料を SDS-PAGE で分離し、プロブロット膜 (Applied Biosystems) に転写、染色後、目的の蛋白質バンドを切り出し分析を行った。

### 2. 4. 予備的な 3 次構造予測

予備的な 3 次構造予測を The Rosetta (Robetta; <http://new.rosetta.org/>) プログラムを用いて行った。また構造の比較や分析には MolFeat (v4.0.1.15) を用いた。

## 3. 結果・考察

### 3. 1. サリリシンの一次構造と産業酵素サーモリシンの相同性

好塩性海洋細菌 *C. salexigens* のデータベースをプロテアーゼ遺伝子を中心に検索し、サーモリシンに相同性を持つプロテアーゼをコードしている遺伝子を見出した。塩基配列から推定されるこのプロテアーゼ (サリリシンと名付けた) の一次構造を Fig. 1 に示した。全 348 アミノ酸残基からなる蛋白質である。

```
1 MASSRRATFS GFMPPHVLDL IAVQGTERQR RCAQQTLQAD QWFRLRASPP PARDAARAVA
61 GRPDRRIHSA DHEQTLPGRL VREEGQAAHG DAAVDEAYEW LGATYRFYWE VFGRDSIDDR
121 GMPLIGTVHY GRDYDNAFWN GAQMVFQDGD GDLFRRFTA APEVVAHEALTH GVIERDVGLV
181 YAGQSGALNE SLADVFGVVV KQYHAGQTAQ EADWLIGAAL LTDRVQGRAL RSMEAPGTAY
241 DDPVLGRDPQ PGHMRDFVDT QADNGGVHIN SGIPNRAFYL AAVALEAPAW ESVAPVWYAA
301 MRDDALSRES DFAAFAALTV AHARRQHGE G SREARAVDDA WREVGVVVS
```

Fig. 1. Primary sequence of protease.

Closed circle shows active site residue. Inactive mutant protease was constructed with changing this Glu to Ala.

この配列と工業的に利用されている *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko 由来のサーモリシンの相同性を Fig. 2 に示す。サリリシンは、*B. thermoproteolyticus* Rokko 由来サーモリシンと 38% の相同性、 77% の類似性を示した。

```

Cs  1'          A RAVAGRPDRR IHSADHEQTL PGRL-VREEG
                                     ** ** * . . . .
Bt  1" ITGTSTVGVG RGLVDQKNI NTTYSTYYL QDNTRNGIF TYDAKYRRTL PGSLWADADN

Cs  31' Q--AAHGDA A VDEAYEWLGA TYRFYWEVFG RDSIDDRGMP LIGTVHYGRD YDNAFWNGAQ
      * * . . . . * ** * . * * * . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *
Bt  61" QFFASYDAPA VDAH-YAGV TYDYYKNVHN RLSYDGNNA A IRSSVHYSQG YNNAFWNGSQ

Cs  89' MVFGDGDGDL FRRFTA APEV VAHELTHGVI ERDVGLVYAG QSGALNESLA DVFVGVVVKQY
      ** . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . *
Bt  120" MVYGDGDGQT FIPLSGGIDV VAHELTHAVT DYTAGLIYQN ESGAINEAMS DIFGTLVK-F

Cs  149' HAGQTAQEAD WLIGAALLTD RVQGRALRSM EAPGTAYDDP VLGRDPQPGH MRDFVDTQAD
      . * . . . . * * . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . *
Bt  179" YA---NKNPD WEIGEDVYTP GISGDSLRS M SDPAK-YGD- ----PDH-Y SKRYTGTQ-D

Cs  209' NGGVHINSGI PNRAFYL---- ----AAVALE APAWESVAPV WYAAMRDDAL SRESDFAAFA
      ***** * * * * . * . . . . . * * . . . . * . . . . * . . . . *
Bt  227" NGGVHINSGI INKAAYLISQ GGTHYGVSVV GIGRDKLGKI FYRAL-TQYL TPTSNFSQLR

Cs  262' ALTVAHARRQ HGEGRREARA VDDAWREVG V VS.
      * . * * . * . * * . * . * * . . . . *
Bt  286" AA AVQSATDL YGSTSQEVAS VKQAFDAVGV K
  
```

Fig. 2. Sequence alignment with thermolysin from *B. thermoproteolyticus* Rokko.

Cs, *C. salexigens*; Bt, *B. thermoproteolyticus* Rokko. \*, shows identity. ., shows similarity.

Closed circle shows Glu residue in active site.

### 3. 2. サリリシンの大腸菌における発現

本遺伝子を PCR 法で増幅し、大腸菌発現ベクター pET3a, pET15b, pET20b にクローニングし、大腸菌で発現させた。pET20b に組み込んだ場合は C 末端に His-tag が付加した状態のサリリシン (Sa) が発現する。Fig. 3 に発現したサリリシン分子の SDS-PAGE

分析結果を示す。ベクターのみ (V, lanes 1 and 3) とサリリシン (Sa, lanes 2 and 4) を発現させた菌体の粗抽出液を遠心で上澄 (S) と沈殿 (P) に分け SDS-PAGE に掛けた。コントロール (lane 1) にはない○で示したバンドが lane 2 に認められた。この分子は予想される全長分子より分子量が小さかったので、中間体 1 (TP-1) とした。lane 4 に△で示した lane 3 には無いバンドが少量検出され、予想された全長 (Pro 型) 分子に相当する分子量であった。Pro 型分子のバンドは TP-1 より PAGE 上の移動度が小さく分子サイズが大きいと考えられる。またサーモリシンの相同性比較によりサリリシンの活性中心として 167 番目の Glu を推定した。このアミノ酸残基を Ala に変えた E167A 不活性型変異体を発現させるために、遺伝子変異キットを用いて E167A 変異遺伝子発現ベクターを構築し、この変異型蛋白質 E167A も同様に発現させた。それぞれの発現サンプルを SDS-PAGE にかけて、プロット後、別に調製した抗サリリシン抗血清を用いて免疫染色法を行い、各々のサリリシンバンドが特異的に染色されることを確認した。

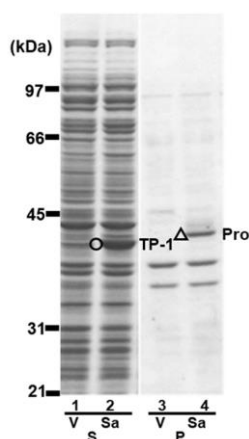


Fig. 3. Expression of halophilic protease in *E. coli*.

V, vector control; Sa, expression of Sa; S, supernatant; P, pellet.

### 3. 3. サリリシンの精製とプロセッシング

サリリシン発現菌体を 50mM リン酸緩衝液 pH7.5 に懸濁し、超音波破碎を行ったサンプル (Fig. 4, lane 1)と、その遠心後の上澄画分 (Fig. 4, lane 2) を得て SDS-PAGE で分析したところ、大量の TP-1 バンドが発現されていた。このサンプルを同緩衝液で平衡化した Ni-NTA カラムに掛け、洗浄後、250 mM イミダゾール/リン酸緩衝液で溶出した画

分を lane 3 に示した。大量の TP-1 バンドが精製できた。さらにこれを一夜 4°C でリン酸緩衝液に透析したサンプルの SDS-PAGE 結果を lane 4 に示した。TP-1 バンドとともに、極少量の分子量が小さい TP-2 と Mat と名付けた蛋白質バンドが検出された。一般的にプロテアーゼは、プロ型と言われる前駆体型で生成され、後に一次配列のトリミングが起こって活性型の成熟型になることが知られている。サーモリシンもこの経路（プロセシング経路）を辿ることから、Fig. 4 の結果より、サリリシンも同様にプロセシングされることが予想された。そこで透析後のサンプルを 25°C で一夜保温して、成熟過程を *in vitro* で追跡し、その結果を lane 5 に示した。TP-1, TP-2 型は完全に消失し、分子量が小さいバンド Mat に完全に変換され、それ以上長く保温を続けても変化が見られなかった。このことから、このバンド Mat が最終的な成熟型の活性型サリリシンと思われた。

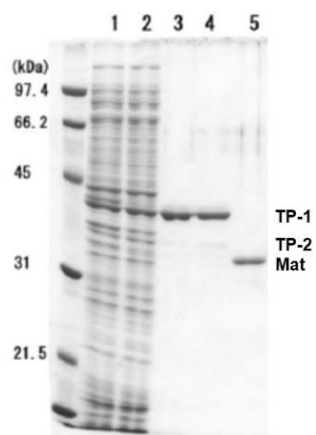


Fig. 4. Expression, purification and *in vitro* processing.

Lane 1, crude homogenate; lane 2, crude supernatant; lane 3, eluted fraction from Ni-NTA column; lane 4, dialyzed fraction; lane 5, prolonged incubated fraction at 25°C. TP-1, transient peptide 1 form; TP-2, transient peptide 2 form; Mat, mature form.

### 3. 4. サリリシンのプロセシングや酵素活性に対する塩の影響

高塩濃度という特殊な環境に生息する好塩性菌が生産する好塩性酵素は、一般的に塩に強く、塩の添加によって活性が促進される傾向がある。プロセシング経路上での蛋白質構造のトリミングは、プロテアーゼ自身の酵素活性に依存していることが知られているので、前項で精製した TP-1 分子（保存中に生成した少量の TP-2、Mat 分子を含む）を保温してプロセシングを観察する際に NaCl を添加して、その効果を検証した (Fig. 5)。

Lane 1 の保温していないバンドがコントロールであるが、大量の TP-1 バンドと少量の TP-2 と Mat バンドが見える。これを 37°C で 1~8 時間保温すると、lanes 2-5 に示したように、保温時間と共に TP-1 バンドと TP-2 バンドが減少し、Mat バンドが増加し、プロセッシングが進行していることが示された。これに対して、2 M NaCl を添加すると、lane 10-13 に示したように、Mat バンドが 1 時間の保温ですでに大量に生成し、TP-1 バンドが大きく減少した。2 時間以降は TP-1、TP-2 バンドは認められず、すべて成熟型にプロセッシングされていた。塩の添加によって明らかにプロセッシングは大きく促進された。

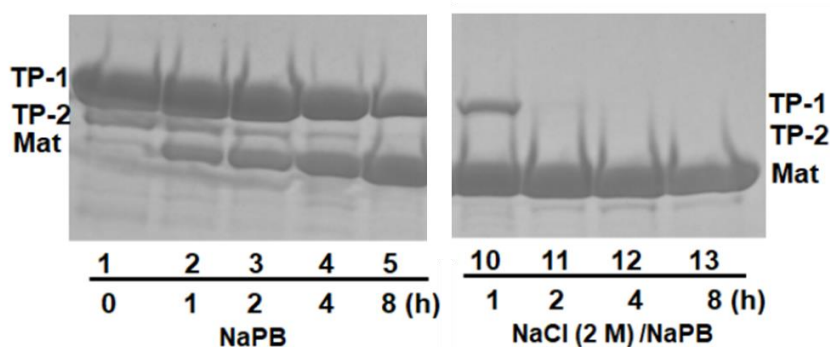


Fig. 5 Effects of NaCl on processing rate.

TP-1, transient peptide 1 form; TP-2, transient peptide 2 form; Mat, mature form.

成熟型のサリリシンが得られたので、基本的な酵素化学的性質を調べた。カゼインもしくはアゾカゼインを基質にして、成熟型の活性を測定したところ、最適反応温度は約 60°C、最適反応 pH は 7.5 であった。また酵素を 10°C から煮沸温度までの各種温度で 5 分間熱処理し、その後活性を測定したところ 60°C まで安定であった。

次に、蛋白質消化活性に対する塩添加の効果を調べた。カゼインやアゾカゼインは高濃度塩存在下では不溶性で、基質として正確な活性測定には使用できなかったため、新しい活性測定法を検討し、高濃度塩存在下でも非常に良く溶解する我々が研究してきた好塩性蛋白質「金属結合性蛋白質 (HP)」を基質に用いることにした。HP とサリリシンを 37°C で 3 時間反応し、HP の分解を SDS-PAGE で分析した (Fig. 6)。Lane 1 (C) は、サリリシンを加えていない未分解の基質サンプルであり、lane 2 より、サリリシンと NaCl を 0-3.2 M まで添加した時の SDS-PAGE の結果である。塩の濃度が上昇するに伴って、HP の量が減少していることが分かる。サリリシンの蛋白質消化活性は、塩によって濃度依存的に促進されることが分かった。

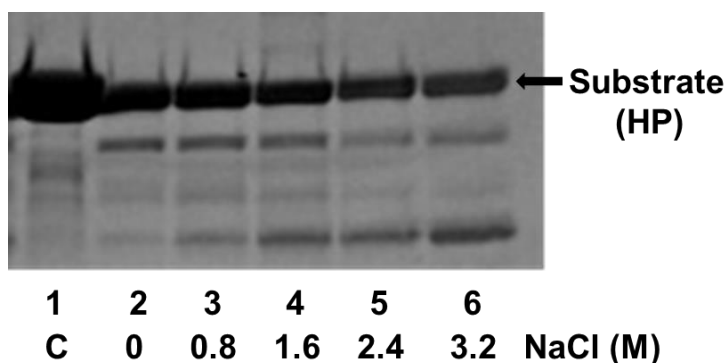


Fig. 6. Enhancing effects of NaCl on proteolytic activity.

### 3. 5. プロセッシングで生成した分子の N-末端配列の分析

発現時およびプロセッシング経路において複数のサリリシン分子が検出されたので、これらの N-末端アミノ酸配列分析を行った。まず、大腸菌菌体内で大量に発現されたバンド TP-1 の N 末端を調べたところ FMPPHV という結果が得られ、これは Pro 型全長サリリシンの 12-17 残基の配列に相当することが分かった (Fig. 1)。次に、E167A 変異体を発現させた際に可溶性画分に検出されたバンド Pro-E167A の N-末端配列は ASSRRA と判明し、全長サリリシンの 2-7 残基の配列に相当した (Fig. 1)。このデータより、サリリシン Pro 型は大腸菌内ですでにプロセッシングされ 11 アミノ酸だけ短い TP-1 型になっていることが判明した。また、不活性型の E167A 変異体蛋白質を発現させた場合は、翻訳開始メチオニンのみがはずれた全長の Pro 型の形で発現していることが判明した。不活性型変異蛋白質では、11 個のアミノ酸配列が切断されていないことより、大腸菌内で起こる野生型サリリシンの第一段階目のプロセッシングは、大腸菌由来のプロテアーゼ活性によるものではなく、サリリシン自身の切断活性によることが示唆された。

次に大腸菌で発現させた TP-1 を *in vitro* で保温した際に得られた Mat バンドの N-末端配列を調べたところ、ARAVAGR となりこの配列は全長の 56-62 残基の配列と一致した (Fig. 1)。この結果から、成熟型サリリシンは、全長 Pro 型より 55 個のアミノ酸が切断されて生じていることが判明した。TP-2 バンドも検出されることより、全体で 3 段階のプロセッシングが起り、前駆体に特有な配列、いわゆる Pro 配列は 55 個のアミノ酸からなることが決定された。以上のデータをまとめたプロセッシングモデルを Fig. 7 に示した。



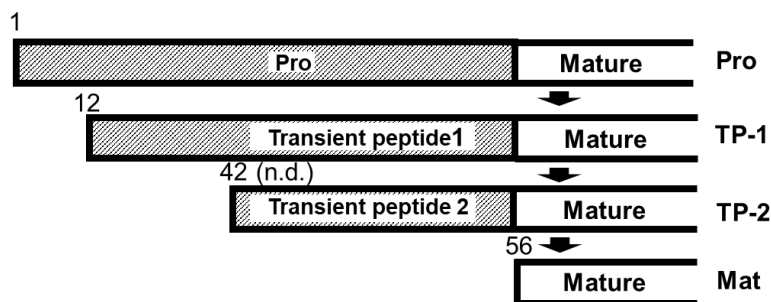


Fig. 7. Processing of N-terminal sequence of Pro-region.

Number shows position of amino acid residue in primary sequence of Pro-form (see Fig. 1).

N-terminal sequence of TP-2 was not determined (n. d.) and tentatively identified by sequence homology with protealysin.

### 3. 6. *in vitro* プロセシングの分析—分子内消化と分子間消化の可能性の解析

*B. thermoproteolyticus* Rokko 由来のサーモリシンは分泌酵素であり Prepro 構造を持っている。Pre (シグナル配列) 構造により培地中に不活性な Pro 型として分泌され、分泌後 Pro 型分子内で自分自身の活性で Pro 構造が切断されて活性型の成熟型となることが報告されている (分子内消化)。そこでサリリシンも自分自身の Pro 配列を分子内で切断するのか (分子内消化)、または他の活性型サリリシン分子が他動的に Pro 配列部分を切断することができるのか (分子間消化) を検討した。分子間消化を検証するために、自分自身ではプロセシングが起きない不活性型 E167A 変異体前駆体蛋白質を精製し、これを基質として野生型の活性型成熟サリリシンを添加し、そのプロセシングが起こるかどうか検討した。結果を Fig. 8 に示した。Lane 2 はコントロール実験で未反応の基質 E167A 蛋白質である。Lane 3 は、添加した野生型で消化活性を持つ成熟型サリリシンである (□)。これをトリス緩衝液中で 37°C で 1, 2, 4 時間保温して SDS-PAGE で分析した (lanes 4-6)。時間の経過とともに Pro 型 (Pro-E167A) が減少し、TP-2 型 (TP-2-E167A)、成熟型 (Mat-E167A) と思われる蛋白質バンドが増加した。これは、前駆体型サリリシンが、活性を持った成熟型サリリシンで分子間消化されていることを明確に示したものである。また硫酸ナトリウムを添加して塩の添加効果を調べたところ (lanes 7-9)、TP-2-E167A から Mat-E167A へのプロセシングが著しく促進され、塩の顕著な促進効果がここでも観察された。またこの生成された変異体の成熟型蛋白質の N-末端アミノ酸配列を調べたところ ARAVAGR となり野生型と同じ部位で正しく切断されていることが分かった。

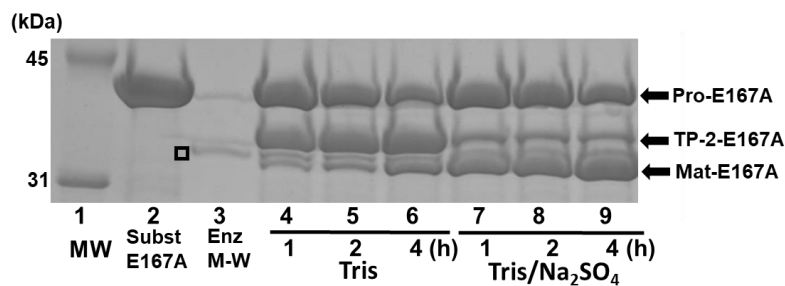


Fig. 8. Processing of E167A mutant with mature form.

MW, molecular weight marker; Subst E167A, substrate E167A protein; Enz M-W, enzyme of wild-type mature form.

以上の結果から、サリリシンのプロセッシングにおいては、分子間 (*trans*) 消化が起こっていることが示された。Fig. 9 に示したプロセッシングモデル図の上段 (*trans*) に当たる。ただし、ある程度の分子内 (*cis*) 消化 (モデル図下段 *cis*) も起こっている可能性は今回の実験結果だけでは否定できないと思われる。何故分子間消化が起こるのか、何らかの生理的意義があると思われるが、今のところその意義は推測の域を出ない。例えば、分泌型のプロテアーゼの場合は、分泌がプロセッシングへの構造形成のきっかけになると考えられているが、サリリシンのような原核細胞における細胞内プロテアーゼの活性化メカニズムは未解明で、多段階消化・分子間消化などの特徴との関連性は極めて興味深い点であり、今後の重要な検討課題である。

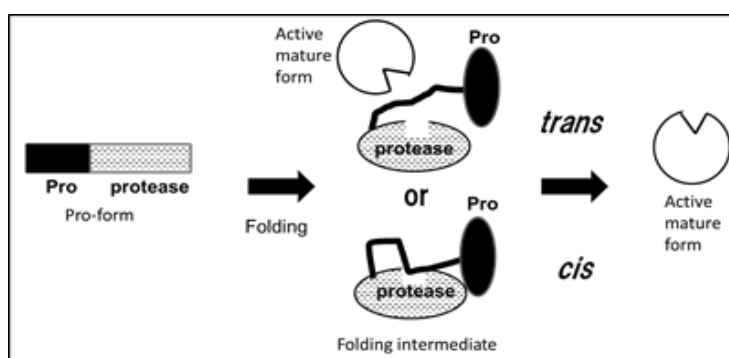


Fig. 9. Inter-molecular (*trans*) and intra-molecular (*cis*) processing models.

Inter-molecular processing (*trans* processing), active mature form digests pro-sequence of transient form; intra-molecular processing (*cis* processing), folding intermediate digests own pro-sequence.

### 3. 7. サーモリシンの3次構造を基にしたサリリシン構造の考察

サリリシンは Fig. 2 に示したように、そのアミノ酸配列の類似性からサーモリシン様プロテアーゼ (TLP) ファミリーの一員であると考えられる。サーモリシンは、316 アミノ酸残基からなり、金属プロテアーゼファミリー (M4 プロテアーゼファミリー) を代表する酵素で、その構造や機能が最もよく調べられているプロテアーゼの一つである<sup>(4)</sup>。また、甘味料アスパルテームの原材料の酵素的合成など産業的利用においても重要な酵素である<sup>(4)</sup>。亜鉛を含んだ金属プロテアーゼの中で最も早く結晶構造が解明され、3次元構造について多数の詳細な解析が報告されている<sup>(4)</sup>。Fig. 10 (A)に、3次元構造の模式図 (PDB: 8TLN) を示した。サーモリシンの立体構造は、2つのドメインから構成されている。図の向かって右側の水色と赤色の部分が、この蛋白質の N-末端を含む N-末端ドメイン (残基番号 1-136) で、向かって左側の紫色と水色の部分が C-末端を含む C-末端ドメイン (残基番号 153-316) である。この2つのドメインに挟まれた谷 (クレフト) の底に当たる部分にこの2つのドメインを連結している  $\alpha$ -ヘリックス領域 (残基番号 137-152, 黄色) があり、活性中心 Glu143 残基 (黒色) が存在する。基質である蛋白質やペプチドは、このクレフトにある基質結合部位に取り込まれて、加水分解もしくは脱水ペプチド合成反応が起きる。

TLP ファミリーのプロテアーゼはそのアミノ酸配列の類似性から、一般的に、原型とも言えるこのサーモリシンと同様な立体構造をとっていると考えられている。本研究のサリリシンも Fig. 2 に示したようにこのサーモリシンと有意な類似性を示すプロテアーゼである。サーモリシンとサリリシンの配列アラインメント (Fig. 2) から、サリリシンのドメイン領域を推定すると、プロ領域 (残基番号 2-55)、N-末端ドメイン (残基番号 56-160)、連結  $\alpha$ -ヘリックス領域 (残基番号 161-176)、そして C-末端ドメイン (残基番号 177-348) と考えられた。これらの領域の中でも N-末端領域の後半部分 (赤色の領域) と連結部分 (黄色の領域) さらに C-末端領域の前半部分 (紫色の領域) に於いては、特に高い類似性を示し、80%の類似性と 44%の相同性を持っている (Fig. 10A, B)。よって、立体構造も2つのドメイン構造とクレフトを持ったサーモリシンと同様な基本構造を取っていると推察された。上述した特に相同性が高い領域は、Fig. 10B に示したように、N-末端領域の後半部分 (Thr75-Ala160, 赤色の領域) と連結部分 (Pro161-Asp176, 黄色) さらに C-末端領域の前半部分 (Val177-Leu280, 紫色の領域) の合計 206 アミノ酸残基である。

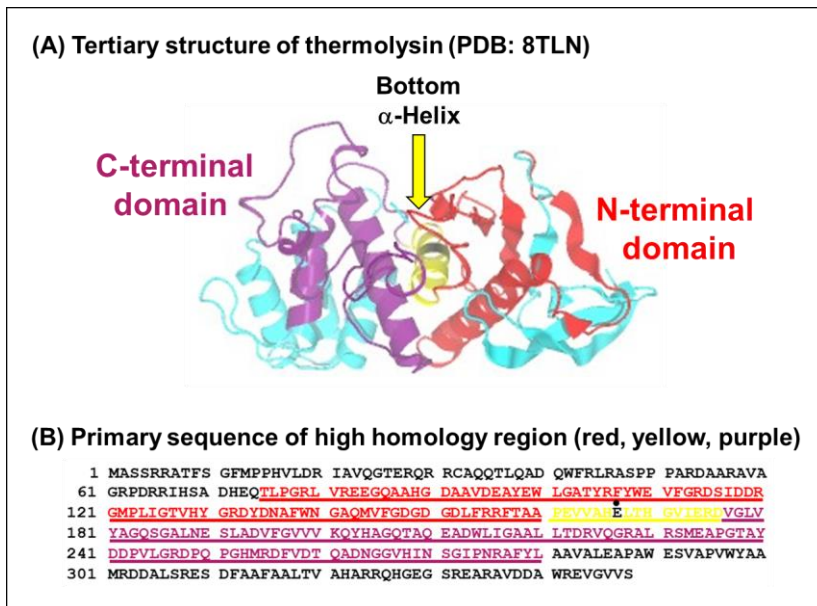


Fig. 10. Tertiary structure of thermolysin and high homology region of halophilic protease.

(A) Tertiary structure (PDB: 8TLN) of thermolysin. N-terminal domain (red + blue), connective  $\alpha$ -helix region (yellow) and C-terminal domain (purple + blue) regions were shown. (B) Primary sequence of high homology region between thermolysin and halophilic protease Sa. Active site E167 was shown by dot.

近年、目的蛋白質と高い相同性を示し、すでに3次元結晶構造が解明されている蛋白質が鋳型として使用可能な場合は、コンピューター解析（モデリング）によって、その鋳型構造を基に目的タンパク質の3次元構造を予測することができるようになってきている。上記のサリリシンの206残基長の部分領域は、サーモリシンの当該領域と80%の類似性と44%の相同性を示すので、サーモリシンを鋳型にしてこのモデリング手法が可能と判断できた。予備的にモデリングのソフトウェアを使用してモデルの構築を試みたところ、Fig. 11に示した予想構造（赤色のリボン構造）が導かれた。構造比較のため、Fig. 11では、サーモリシンの構造をチューブ構造（サリリシンとの相同性が高いThr49-Leu243領域は緑色で、その他の領域は白色で示している）で、サリリシンの予測構造を赤色のリボン構造で示し、両者を同時に表示している。緑色と赤色の領域は良く重なり合っていて、サリリシンもサーモリシン同様の2つのドメインとそれらに挟まれたクレフト構造という基本構造を持っていることが示唆された。

今回行った予備的な構造予測では、モデリングのソフトウェアで計算が可能と言う

事で、一応その範囲の妥当性を示しているものと解釈できるが、より厳密にはその計算の妥当性の程度（かなり確度の高い予測ができているのか、それともかなり確度の低い予測にとどまっているのか）を検証する別の手段、例えば検証用のソフトウェアによる評価が必要であると思われる。今回はそのような検証用のソフトウェアを用いた妥当性レベルの検証には至っておらず、この結果はあくまで初歩的な予備的試行であることに留意していただく必要があると考えられる。今後より詳細な検討を進めていく予定である。

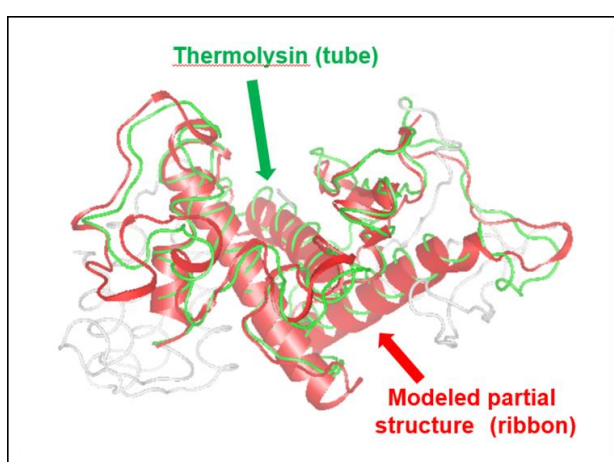


Fig. 11. Superposition of thermolysin and modeled partial structure.

Thermolysin structure was shown by tube (green and white). Modeled structure was shown by ribbon (red). This tentative modeled structure is quite preliminary results, requiring more precise modeling and validation.

#### 4. 結論と今後の課題

##### 4. 1. 大量発現、大量調製および性質

好塩菌由来の塩によりプロセシングが促進され、また塩により活性が促進されるプロテアーゼ・サリリシンの性質について詳細に検討した。プロテアーゼは、細胞内でまず不活性型の前駆体で生成され、分泌やその他のコンフォメーション変化によって、微弱的な自己消化活性を持つようになり、プロ領域が切断されて活性型の成熟型になることが知られている。このプロ配列の切断過程をプロセシングと呼ぶが、サリリシンにおいて

は三つの特徴が認められる。① 塩によるプロセシングの促進、② 3段階のプロセシング、③ 分子間消化によるプロセシングである。サーモリシンの場合は、この三つの特徴が認められず、サリリシンはユニークなプロセシング過程を経て成熟型になると結論できる。中でも特筆すべきは、「塩によるプロセシングの促進現象」である。食品産業などにおいて、この塩に強い性質をもつサリリシンの塩存在下での利用が期待される。また塩存在下では熱安定性が 10°C 近く上昇するという予備的な結果も得ており、さらに詳細な性質検討により産業利用への現実的な道が開けるものと思われる。

#### 4. 2. サリリシンの生理的役割と協働蛋白質因子の検討

生体細胞は「有用蛋白質の合成」と「不用・有害蛋白質の分解」のバランスを調節しながら生きている。近年の大隅博士のノーベル賞受賞研究は、真核生物における分解調節機構「オートファジー」に関するものであった。また、アルツハイマー病、パーキンソン病など老化を要因とした分解されにくい有害蛋白質の蓄積による多くの疾病が大きな社会問題となっている。原核細胞においては分解に関与する上記のようなオルガネラは存在せず、プロテアーゼと協働蛋白質因子(シャペロン分子など)がその役割を担っている。機能が失われた蛋白質は、協働蛋白質因子により発見されて、①構造・機能が回復されるか、②新しい機能蛋白質に生まれ変わるために分解されるか、のどちらかのルートで処理される。そのためこれら協働因子と細胞内プロテアーゼは細胞の恒常性にとって極めて重要な役割を果たしていると考えられる。サリリシンと協働因子との相互作用や生体環境応答の解明によって、極限環境に生きるこの微生物内でのサリリシンの生理的役割を調べる事が出来ると思われる。良く知られている協働蛋白質因子としては、分子量が 6 万、7 万、10 万の三種類のシャペロン分子の研究が進んでいる。我々はすでに各種好塩菌において、分子量 6 万と 7 万の蛋白質について報告してきた<sup>(5)</sup>。当研究室で分離登録された *Chromohalobacter japonicus* からは、分子量 6 万の蛋白質を精製し、変性蛋白質の機能を回復させるという結果を得ている<sup>(6)</sup>。今回は、分子量 10 万の協働蛋白質因子をデータベースで検索し、分子量約 10 万の分子シャペロン 100 (プロテアーゼクリップ-ATP 結合サブユニット蛋白質)を見出した。これは他の菌種において、変性した蛋白質の凝集体に結合すると言われているシャペロン分子の相同分子と思われる。今後この蛋白質を分離精製して、サリリシンとの相互作用を検討して行きたい。現在、大腸菌を用いて予備的な発現を試み、良好な結果を得つつある。また、サリリシンと相同性

を持つサーモリシン・ファミリーのプロテアーゼの幾つかは、細胞外で他の細胞との相互作用に働いているという知見もあり、サリリシンの細胞内外の局在性、塩環境との相互作用も興味ある課題である。

## 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。本研究を実施できましたのは、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。また本研究の遂行にあたって、鹿児島大学・農学部・応用分子微生物学研究室の石橋松二郎教授より多大なご援助・ご助言を賜りました。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8 1 巻, 401-406.
- (3) Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiol Mol Biol Rev.* (1998) 62, 597-635.
- (4) 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.
- (5) Tokunaga M, Matsuoka K, Tokunaga H. Identification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequences of DnaK and groEL homologues in moderate eubacterial halophiles. *Biosci Biotechnol Biochem.* (1997) 61, 1388-1390.
- (6) Tokunaga M, Miyawaki H, Shiraishi Y, Tokunaga H. Purification and characterization of a GroEL homologue from the moderately eubacterial halophile *Pseudomonas* sp. #43. *FEMS Microbiol Lett.* (1997) 152, 321-326.

Protein chemical and physiological characterization of halophilic protease  
and potential industrial application

Masao Tokunaga

Applied and Molecular Microbiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University  
1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan  
e-mail: tokunaga@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

Several proteases have been applicable for food production, however, these proteases were salt-sensitive under the conditions of high salt concentration. Salt-enhancing or salt-tolerant proteases are desired for salty-food industry, such as for miso (fermented soybean paste), soy sauce and salty fish sauce, food processing for meats and fishes, and waste treatment processes under salty conditions to prohibit spoilage. Halophilic microorganisms, one of the extremophiles to live or even thrive under high concentration of salts, have been known to produce halophilic, salt-enhancing and salt-stable, proteins. In the present study, halophilic protease was characterized through database search, gene isolation and cloning to expression vectors, and expression and purification.